การคัดแยกและใช้แบคเทอริโอเฟจยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล

Isolation and utilization of bacteriophage to inhibit *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia

ตระหนัก สมเนตร*, เกศินี จันทรโสภณ และเสรี จันทรโสภณ

Tranuk Somnate*, Kesinee Chantharasophon and Seree Chantarasopon

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani, 34000

* Corresponding author: 045-352000, FAX 045-352070, E-mail: stranuk@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและใช้แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล ผลการศึกษาพบว่า คัดแยกได้แบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ แบคเทอริโอเฟจ AE86 (เฟจ AE86) และเป็นเชื้อที่ไม่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียก่อโรคตัวบ่งชี้ 10 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา ผลการศึกษาสมบัติของเฟจ AE86 พบว่ามีสมบัติเป็นชนิดไลติกเฟจและมีความคงตัวสูงสุดที่ค่าพีเอชเป็น 7 ความเข้มข้นของ เฟจ AE86 ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้มากที่สุดคือที่สัดส่วน moi เท่ากับ 100 เมื่อใช้เฟจ AE86 ลดอัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อพบว่า กลุ่มที่ใช้เฟจ AE86 และกลุ่มควบคุมมีการตายสะสมเป็นร้อยละ 70.0 และ 93.34 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่าเฟจ AE86 มีศักยภาพในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลได้

คำสำคัญ : ปลานิล แบคเทอริโอเฟจ ไลติกเฟจ *A. hydrophila*

Abstract

The objectives of this research were to isolate and utilize bacteriophage which was specific to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia. The results revealed that 1 strain of bacteriophage which was specific to *A. hydrophila*, but not to other 10 strains of indicated pathogenic bacteria namely bacteriophage AE86 (phage AE86) was isolated. The properties of phage AE86 were studied. Phage AE86 exhibited as lytic phage type and showed the highest stability at pH 7. The highest inhibition zone to *A. hydrophila* in moi rate of phage AE86 was 100. The use of phage AE86 to reduce the mortality of infected Nile tilapia was carried out. The cumulative death of the phage AE86 treated groups and the control groups were 70.0%, and 93.34%, respectively. These results indicated that phage AE86 could be expressed therapeutic agent potential to treat *A. hydrophila* infection in Nile tilapia.

Keywords: Nile tilapia, Bacteriophage, Lytic phage, *A. hydrophila*

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในแหล่งน้ำ แหล่งน้ำที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์มักพบว่าแบคทีเรียสกุลนี้ก่อให้เกิดโรคระบาดได้ โดยเฉพาะในแหล่งที่เพาะเลี้ยงปลานิลอย่างหนาแน่น จะพบว่าเชื้อ *A. hydrophila* เจริญเติบโตได้ดี (Wangkahart and Rattanasena, 2012; Kamgar *et al.,* 2013) และเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคระบาดได้ทุกฤดู ในกรณีที่มีโรคระบาดและปลานิลทยอยตาย เกษตรกรจะใช้สารปฏิชีวนะในการรักษา แต่มักใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจุลินทรีย์ก่อโรคจึงดื้อยาต้องเพิ่มปริมาณสารปฏิชีวนะ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและมีสารปฏิชีวนะตกค้างในผลผลิต (Chantharasophon and Prawitthana, 2015) ทางเลือกที่ไม่ต้องใช้สารปฏิชีวนะในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคระบาดในการเพาะเลี้ยงปลาคือ การควบคุมแบบชีววิธีซึ่งมีหลายแบบ หนึ่งในวิธีการควบคุมแบบนี้ คือ การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ จุลินทรีย์ตัวที่ใช้ควบคุมมีทั้งที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และไวรัส เฉพาะที่เป็นการใช้ไวรัสคือใช้ไวรัสของแบคทีเรียที่เรียกว่า แบคเทอริโอเฟจ (Bacteriophage) หรือเฟจ (Phage) เข้าทำลายเชื้อก่อโรคโดยตรง เนื่องจากมีความจำเพาะกับแบคทีเรียเป้าหมายเท่านั้น ไม่มีผลไปทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น Golkar *et al.* (2014) รายงานว่า แบคเทอริโอเฟจมีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางชีวโมเลกุลและใช้ในการต่อต้านแบคทีเรียมาตั้งแต่ปี 1966 แต่เนื่องจากในช่วงที่ผ่านมาการใช้ยาปฏิชีวนะง่ายกว่าจึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ต่อมาเกิดปัญหาแบคทีเรียก่อโรคมีการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา จึงทำให้หันกลับมาให้ความสำคัญและมีการศึกษาทดลองเพื่อใช้แบคเทอริโอเฟจทดแทนยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะการใช้ต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแบบ multidrug-resistant เมื่อพบว่ามีการปรับตัวของเชื้อก่อโรคต่อการเข้าทำลายแบบจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจได้ จึงมีการใช้แบคเทอริโอเฟจผสมหลายสายพันธุ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค นอกจากนี้มีการใช้แบคเทอริโอเฟจป้องกันการเสื่อมเสียของอาหาร ผักและผลไม้ด้วย (Golkar *et al.,* 2014) เช่นเดียวกับ Pal (2015) ที่กล่าวถึงการใช้แบคเทอริโอเฟจว่าได้รับการรับรองความปลอดภัยจากหน่วยงาน Food and drug administration (FDA)US Environmental Protection Agency (EPA) และFood Standards Australia and New Zealand (FSANZ) ว่าไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ทั้งที่เป็นมนุษย์และสัตว์เนื่องจากออกฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียเป้าหมายที่จำเพาะเท่านั้นโดยไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์อื่นรวมถึงสิ่งแวดล้อม สำหรับการรักษาโรคในสัตว์น้ำ มีงานวิจัยที่ใช้แบคเทอริโอเฟจควบคุมโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในสัตว์น้ำหลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. plecoglossicida*, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum* *V. parahaemolyticus*, และ *Lactococcus garvieae* แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ (Pal, 2015) ทำให้ลดอัตราการตายของสัตว์น้ำได้ (Pelon *et al*. 2005; Imbeault *et al*. 2006; Pal, 2015) นอกจากนี้ยังได้รายงานถึงข้อดีข้อเสียของการใช้แบคเทอริโอเฟจโดยเฉพาะข้อกังกลเรื่องที่อาจมีการถ่ายทอดยีนที่ไม่พึงประสงค์ เพราะการที่มีวงชีวิต 2 แบบคือแบบ Lytic phage (ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก) และ Lysogenic phage (เข้าไปอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย) ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์จะต้องนำเฉพาะแบคเทอริโอเฟจในแบบ Lytic phage เท่านั้นจึงเป็น

การตัดโอกาสที่จะเกิดการถ่ายทอดยีนที่ไม่พึงประสงค์ได้ (Pal, 2015) การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกและใช้แบคเทอริโอเฟจที่เป็น Lytic phage เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* ในปลานิล

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์: จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ดังนี้

2.1 เชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Host strain) 1 สายพันธุ์คือ *A. hydrophila* TISTR 1321 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.2 เชื้อแบคทีเรียตัวทดสอบ 10 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, St. epidermidis, Serratia marcescens, Escherichia coli, E. coli* O157:H7, *Klesbsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium* และ *Flavobacterium columnare* KJ720207

2.2 การคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของ *A. hydrophila* จากตัวอย่างน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงปลานิลและตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล

นำตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงปลานิล 2 แหล่ง (ฟาร์มของนายสง่า วรรณแสง 161 หมู่ 4 บ้านแพง อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี และฟาร์มของนายศักดินา นักรำ 5 หมู่ 3 ตำบลหนองไฮ อำเภอสำโรง จังหวัดอุบลราชธานี) และตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี มาตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธี Spot test (Adam, 1959) ดังนี้ นำตัวอย่างน้ำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำ Supernatant กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ส่วนที่กรองได้ในขั้นนี้เรียกว่า Filtrate 1 จากนั้นนำ Filtrate 1 จำนวน 5 มิลลิลิตรเติมลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB ที่มีความเข้มข้นสองเท่า) 5 มิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อ *A. hydrophila* TISTR ที่บ่ม 12-18 ชั่วโมง จำนวน 100 ไมโครลิตรลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ส่วนใสที่กรองได้ในขั้นนี้เรียกว่า Filtrate 2 นำไปตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* โดยนำ TSA sloppy agar ไปต้มเพื่อให้วุ้นหลอมเหลว แล้วทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเชื้อ *A. hydrophila* ที่บ่ม 12-18 ชั่วโมงจำนวน 100 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆ เททับลงไปบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทิ้งไว้ 10-15 นาทีเพื่อให้ TSA sloppy agar แข็งตัว จากนั้นหยด filtrate 2 จำนวน 10 ไมโครลิตรลงไปบนผิวหน้าของ TSA sloppy agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ให้สังเกตจากบริเวณใสหรือ Clear zone ตรงบริเวณที่หยด Filtrate 2 หากมีบริเวณใสเกิดขึ้นแสดงว่ามีแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila*

นำ Filtrate 2 ที่ให้บริเวณใสจากการทำ Spot test มาตรวจนับและศึกษาลักษณะ Plaque ด้วยวิธี Double layer agar plaque assay (Lu, *et al*., 2003) โดยนำตัวอย่าง Filtrate 2 มาทำการเจือจางแบบ Serial dilution ครั้งละ 10 เท่า ด้วยอาหาร TSB จากนั้นนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจที่ระดับความเจือจางต่างๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงไปในอาหาร TSA sloppy agar ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการเติมเชื้อ

A. hydrophila ปริมาตร 100 ไมโครลิตรไว้แล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆ เททับลงไปบนผิวหน้าของอาหาร TSA จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนและสังเกตลักษณะ Plaque ของแบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นบนอาหาร จากนั้นเพิ่มปริมาณของแบคเทอริโอเฟจโดยลอกเอา Plaque บน TSA sloppy agar เติมลงในอาหาร TSB ที่มี *A. hydrophila* เจริญในระยะ log phase อยู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ส่วนใสที่กรองได้ในขั้นตอนนี้เรียกว่า Phage lysate นำ Phage lysate ที่กรองได้มาตรวจสอบลักษณะ Plaque อีกครั้งด้วยวิธี Double layer agar plaque assay ให้ทำแบบนี้ 3-4 ครั้งจนได้ Plaque ที่มีลักษณะเดียว

2.3 ศึกษาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อแบคทีเรียทดสอบ 10 สายพันธุ์โดยวิธี Spot test

2.4 การศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอเฟจที่พีเอชต่างกัน

นำ Phage lysate ไปเจือจางในอาหาร TSB ที่ปรับ pH ให้มีค่าตั้งแต่ 2-12 โดยมีแบคเทอริโอเฟจเริ่มต้นหลังการเติม $1x10^6$ PFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับแบคเทอริโอเฟจที่คงเหลือด้วยวิธี Double layer agar plaque assay

2.5 ทดสอบการยับยั้ง *A. hydrophila* โดยแบคเทอริโอเฟจที่ความเข้มข้นต่างกัน

แบ่งการทดสอบเป็น 4 ชุด แต่ละชุดเติม *A. hydrophila* ($1x10^5$ CFU/mL) ในอาหาร TSB เติม Phage lysate ที่ความเข้มข้นแบบ Multiplicity of infection หรือ moi ต่างกันดังนี้ ชุดที่ 1 เติม $1.0x10^5$ PFU/mL (moi=1) ชุดที่ 2 เติม $1x10^6$ PFU/mL (moi=10) ชุดที่ 3 เติม $1x10^7$ PFU/mL (moi= 100) ชุดที่ 4 กลุ่มควบคุมไม่เติม Phage lysate บ่มที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมงจากนั้นนับจำนวนเชื้อ *A. hydrophila* บนอาหาร TSA ด้วยวิธี Spread plate method

2.6 การใช้แบคเทอริโอเฟจลดอัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*

นำปลานิลจากฟาร์มปลาของนายศักดินา นักรำ 5 หมู่ 3 ตำบลหนองไฮ อำเภอสำโรง จังหวัดอุบลราชธานี น้ำหนัก 30-40 กรัม จำนวน 100 ตัว ไปเลี้ยงในห้องทดลอง ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี เพื่อให้ปลาปรับตัวในถังพลาสติกขนาด $1x1.2x1.5$ เมตร^3 ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลาเป็นเวลา 14 วัน แบ่งปลานิลที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ในถังเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 250 ลิตร ระดับน้ำลึก 50 เซนติเมตร ให้อากาศในปริมาณที่มากพอ เปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน ให้อาหารร้อยละ 3 ของน้ำหนักปลา ให้ปรับตัวเป็นเวลา 14 วัน จึงฉีดเชื้อ *A. hydrophila* จำนวน $1x10^5$ CFU/fish แบบ intraperitoneal ของปลาทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ หลังจากนั้น 30 นาที ในชุดทดสอบจะฉีด phage lysate ความเข้มข้น $1x10^7$ PFU/fish และชุดควบคุมฉีดอาหาร TSB ปลอดเชื้อเข้าที่ช่องท้องของปลา จากนั้นนับจำนวนปลาที่มีชีวิตรอดภายในระยะเวลา 7 วัน

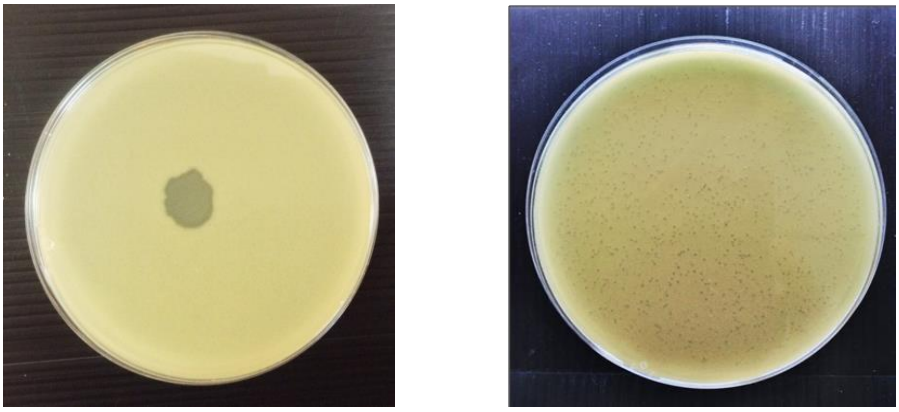
2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ: วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ One-way analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ Duncan's new multiple range test

ผลการทดลอง

3.1 ผลการคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของ *A. hydrophila* จากตัวอย่างน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงปลานิลและตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาล

การคัดแยกแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี พบการเกิดบริเวณใสที่ Filtrate 2 แสดงถึงความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจต่อเชื้อ *A. hydrophila* (ภาพที่ 1: A) ในขณะที่ตัวอย่างน้ำเลี้ยงปลาจากฟาร์มอีก 2 แห่งไม่พบการเกิดบริเวณในที่ Filtrate 2

เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจที่บริสุทธิ์ตรวจลักษณะ Plaque ด้วยวิธี Double layer agar plaque assay พบว่า Plaque ของแบคเทอริโอเฟจมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1: B) แบคเทอริโอเฟจที่พบมีลักษณะเป็นชนิด ไลติกเฟจ ให้ชื่อเป็น AE86



(A) (B)

Figure 1 Clear zone of Bacteriophage which was specific to *A. hydrophila* from Filtrate 2 of The waste water sample from Sappasitthiprasong Hospital by Spot test method (A) Bacteriophage AE86 Plaque on TSA which was small and circular shape and ~1 mm diameter size (B)

3.2 ผลการศึกษาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ

เมื่อศึกษาความจำเพาะของแบคเทอริโอเฟจ AE86 ต่อแบคทีเรียตัวทดสอบ 10 สายพันธุ์ด้วยวิธี Spot test เปรียบเทียบกับ เชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 พบว่า แบคเทอริโอเฟจ AE86 ที่คัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 เท่านั้น

3.3 ผลการการศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอเฟจที่พีเอชต่างกัน

นำ phage lysate ในอาหาร TSB ปรับ pH ให้มีค่า 2-12 พบว่า ที่ค่า pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 สามารถตรวจนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจได้เป็น $4.7\pm0.15\times10^{2}$, $1.53\pm0.26\times10^{3}$, $1.06\pm0.15\times10^{6}$,

$2.74 \pm 0.21 \times 10^5$, $5.69 \pm 0.22 \times 10^4$, $6.22 \pm 0.31 \times 10^3$ และ $1.06 \pm 0.17 \times 10^6$ PFU/mL ตามลำดับ คิดเป็นความคงตัวที่ระดับร้อยละ 43±45, 48.93±0.81, 97.91±0.76, 89±0.0, 79.40±0.71, 68.07±6.14 และ 51.12±0.33 ตามลำดับ ความคงตัวสูงสุดพบที่ pH 7 ส่วนที่ pH 2-4 และ pH 12 เฟจไม่มีความคงตัว เนื่องจากไม่สามารถตรวจไม่พบแบคเทอริโอเฟจ

3.4 ผลการทดสอบการยับยั้ง *A. hydrophila* โดยแบคเทอริโอเฟจที่ความเข้มข้นต่างกัน

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* โดยเฟจ AE86 ในหลอดทดลองที่ระดับ mois ต่างกันคือ 1, 10 และ 100 พบว่า ที่สัดส่วนของเฟจกับแบคทีเรีย moi 100 เฟจ AE86 ยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้สูงที่สุด โดยในช่วง 9 ชั่วโมงแรกแบคทีเรียมีจำนวนลดลงประมาณ 2.9 $\log_{10}$ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่หลังจากนั้นจำนวนของ *A. hydrophila* กลับมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น (Fig. 2)

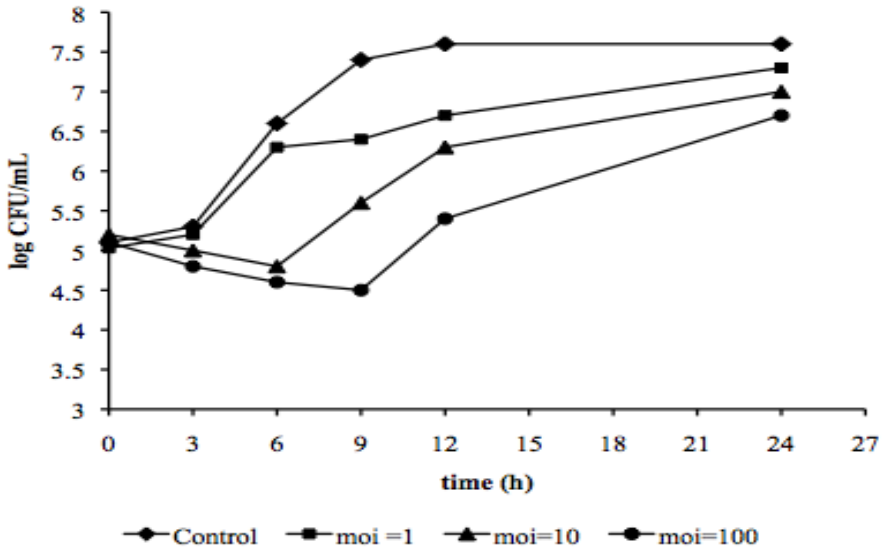


Figure 2 Inhibitory effect of Bacteriophage on *A. hydrophila* at mois of 1, 10 and 100

3.5 ผลการใช้แบคเทอริโอเฟจลดอัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*

เมื่อฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากนั้นในชุดทดสอบจะฉีด phage lysate ความเข้มข้น 1×10^7 PFU/fish และชุดควบคุมฉีดอาหาร TSB ปลอดเชื้อเข้าที่ช่องท้องของปลา เมื่อนับจำนวนปลาที่มีชีวิตรอดภายในระยะเวลา 7 วัน พบว่า ชุดทดสอบ คือ ปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* และได้รับการรักษาด้วยเฟจ AE86 มีอัตราการตายในช่วงวันแรกร้อยละ 67 เมื่อครบวันที่ 7 ชุดทดสอบมีการตายสะสมเป็นร้อยละ 70 ชุดควบคุม คือปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* และไม่ได้รับการรักษาด้วยเฟจ AE86 มีอัตราการตายในช่วงวันแรกสูงถึงร้อยละ 87 เมื่อครบวันที่ 7 ชุดควบคุมมีการตายสะสมเพิ่มเป็นร้อยละ 93.34 (Fig. 3)

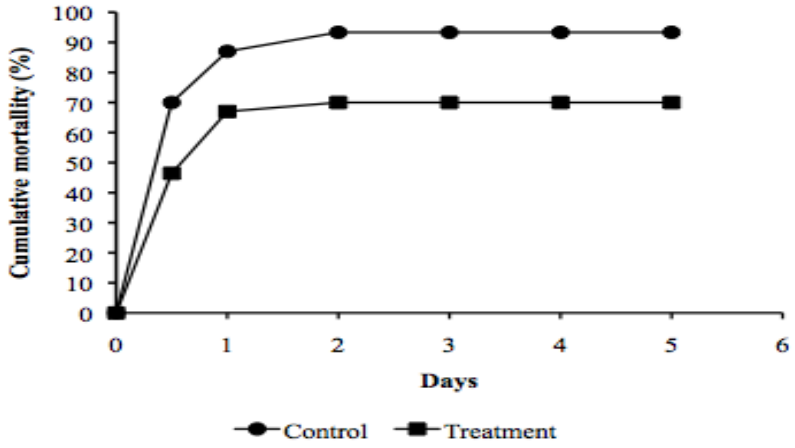


Figure 3 The cumulative death of the phage AE86 treated groups (Treatment) and the control groups at days 7 post challenge

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เฟจ AE86 ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* คัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล ในขณะที่ตามหลักการของการพบเฟจโดยทั่วไปแล้ว จะพบและคัดแยกได้จากแหล่งมีที่เชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นอาศัยอยู่ คือเชื้อ *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบริเวณผิวหนังและในตัวปลา แต่เฟจ AE86 คัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล ซึ่งแสดงให้เห็นความไม่สัมพันธ์กันระหว่างแหล่งที่อยู่ของเฟจและแบคทีเรียเจ้าบ้าน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายเรื่อง เช่น เฟจของเชื้อ *Serratia marcescens* คือ เฟจ KSP20 และเฟจ KSP100 คัดแยกได้จากแหล่งบำบัดน้ำเสีย แต่เฟจ SM8 คัดแยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย (Matsushita *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามการที่ไม่สามารถคัดแยกเฟจจากแหล่งน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาได้นั้น ไม่ได้หมายความว่าในแหล่งน้ำดังกล่าวจะไม่มีเฟจที่ต้องการ แต่อาจเป็นเพราะว่าปริมาณเฟจในแหล่งดังกล่าวมีน้อยเกินกว่าที่จะสามารถคัดแยกออกมาได้ คาดว่าหากทำการ Challenge ปลาในแหล่งที่ต้องการศึกษาด้วยเชื้อ *A. hydrophila* ก็จะทำให้มีโอกาสคัดแยกเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อนี้ออกมาจากแหล่งนั้นๆ ได้

การศึกษาโฮสต์เรนจ์ของเฟจ AE86 พบว่าเฟจมีช่วงการทำลายโฮสต์แคบ เพราะไม่สามารถทำลายแบคทีเรียสายพันธ์อื่นๆ ได้นอกจากเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฟจ AE86 มีความจำเพาะกับแบคทีเรียเจ้าบ้านสูง ความจำเพาะนี้เหมือนกับรายงานที่มีมาก่อนนี้ของ Jun *et al.* (2013) คือ เฟจ pAh1-C และเฟจ pAh6-C จำเพาะกับ *A. hydrophila* เท่านั้น การมีช่วงโฮสต์แคบเป็นข้อได้เปรียบในการนำเฟจไปประยุกต์ใช้งานรักษาโรค เพราะเฟจจะไม่บุกรุกแบคทีเรียประจำถิ่นอื่นๆ จึงไม่เกิดผลกระทบต่อสมดุลของเชื้ออื่นในสิ่งแวดล้อมที่ศึกษา

การศึกษาความคงตัวของเฟจที่ระดับ pH ต่างกัน พบว่าเฟจ AE86 มีความคงตัวสูงสุดที่ค่า pH 7.0 โดยความคงตัวของเฟจจะลดลงตามค่า pH ที่ต่ำกว่า 7 ลงไป และไม่คงตัวที่ค่า pH 4 เป็นต้นไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากมีการประยุกต์ใช้เฟจในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา เฟจ AE86 อาจไม่เหมาะกับการรักษาโรคผ่านการกิน เพราะเฟจต้องผ่านระบบย่อยอาหารของปลาซึ่งมีค่า pH เป็นกรดอาจทำให้ปริมาณเฟจลดลงจนไม่สามารถมีผลในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* โดยเฟจ AE86 ในหลอดทดลองที่ระดับ mois ต่างกัน พบว่าการใช้เฟจความเข้มข้นสูง (moi เท่ากับ 100) มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *A. hydrophila* ได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้ยังพบว่าการใช้เฟจ AE86 ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อ *A. hydrophila* ให้หมดไปได้ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเชื้อ *A. hydrophila* มีการปรับตัวเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเฟจ (phage-resistant bacteria) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า *A. hydrophila* JUNAH มีการปรับตัวเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเฟจ pAh1-C หลังจาก 12 ชั่วโมง ที่ทุกระดับ mois (Jun *et al.*, 2013) แต่ผลการทดลองที่ได้ต่างจากการทดลองของ Martínez-Díaz and Hipólito-Morales (2013) ที่ได้ศึกษาการใช้เฟจเพื่อรักษาเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยได้ทดลองใช้เฟจ vpms**1** ในการกำจัดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่อยู่ในไรน้ำเค็ม ซึ่งผลการทดลองได้พบว่าเฟจ vpms1 สามารถกำจัดเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* ในไรน้ำเค็มได้ทั้งหมดเมื่อใช้เฟจในสัดส่วนความเข้มข้นที่เท่ากันกับเชื้อก่อโรค แต่หากใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้การกำจัดเชื้อจะไม่ได้ผล อีกประการหนึ่งคือเมื่อนำเฟจ AE86 ไปรักษาปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 พบว่า สามารถลดอัตราการตายของปลาลงได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่อัตราการตายสะสมของปลายังสูงถึงร้อยละ 70 ภายในระยะเวลา 7 วันหลังจากได้รับเฟจ (โดยไม่พบการตายเพิ่มตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลอง) เมื่อเทียบกับรายงานที่มีการศึกษามาก่อนนี้ที่ใช้เฟจ pAh1-C และ pAH6-C รักษาปลาหมู (*Misgurnus anguillicaudatus*) ที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* JUNAH และพบว่าอัตราการตายสะสมของปลาหมูมีเพียงร้อยละ 46.67 และ 26.67 ตามลำดับ เท่านั้น (Jun *et al.*, 2013) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าอาจเนื่องมาจากเฟจ AE86 คัดแยกได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงพยาบาล หากเป็นเฟจที่คัดแยกได้จากแหล่งเพาะเลี้ยงปลา อาจมีโอกาสให้ผลที่เหมือนกับการทดลองของ Martínez-Díaz and Hipólito-Morales (2013) ที่พบว่าเฟจที่คัดแยกได้สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคที่นำมาศึกษาได้ทั้งหมด อีกประการหนึ่งคือควรทำการคัดแยกเฟจให้ได้เพิ่มมากกว่า 1 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดลองใช้แบบเฟจผสม (Phage cocktail) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการทำลายแบคทีเรียจำเพาะได้มากขึ้น โดยที่แบคทีเรียจำเพาะปรับตัวหนีการเข้าทำลายของเฟจพร้อมกันหลายสายพันธุ์ได้ไม่ทัน จึงจะทำให้แบคทีเรียดังกล่าวถูกทำลายหมดไปก่อนที่จะปรับตัวได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ดังผลการทดลองของ Woolston *et al.* (2013) ซึ่งจะทำให้การใช้เฟจเพื่อให้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการรักษาปลานิลที่ติดเชื้อโรคระบาดดังกล่าว จะเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะกับปลานิลที่เพาะเลี้ยง ลดภาระค่าใช้จ่ายสารเคมีและสารปฏิชีวนะ ลดความเสี่ยงของเกษตรกรกลุ่มผู้เลี้ยงปลาและผู้บริโภคไปพร้อมกัน

สรุปผลการทดลอง

คัดแยกแบคเทอริโอเฟจ AE86 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* สูงได้จากแหล่งน้ำเสียของโรงพยาบาล โดยเฟจ AE86 เป็นชนิดไลติกเฟจที่มีความคงตัวสูงสุดที่พีเอช 7 ความเข้มข้นของเฟจ AE86 ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้มากที่สุดคือที่สัดส่วน moi เท่ากับ 100 เมื่อใช้เฟจ AE86 ลดอัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อพบว่า ปลานิลมีการตายสะสมเป็นร้อยละ 70.0 ซึ่งจะเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะกับปลานิลที่เพาะเลี้ยง ลดภาระค่าใช้จ่ายสารเคมีและสารปฏิชีวนะ ลดความเสี่ยงของเกษตรกรกลุ่มผู้เลี้ยงปลาและผู้บริโภคไปพร้อมกัน

เอกสารอ้างอิง

Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York.

Boonta, T., Chitmanat, C., and Promya, J. 2012. Effects of *Spirulina platensis*, *Cladophora* sp. and *Allium sativum* supplementary diets on growth performance, reproductive maturity, and phagocytic activity in common lowland frog (*Rana rugulosa*). Journal of Fisheries Technology Research. 6(1): 23-35. [in Thai]

Chantharasophon, K., and Prawitthana, S. 2015. Effects of *Bacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and immune responses. Journal of Fisheries Technology Research. 6(1): 23-35. [in Thai]

Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D.G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. The Journal of Infection in Developing Countries. 8(2): 129-136.

Imbeault, S., Parent, S., Legace, M., Uhland, C.F., and Blais, J.F. 2006. Using bacteriophage to prevent furunculosis cause by *Aeromonas salmonisida* in farmed brook trout. Journal of aquatic animal health. 18: 203-214.

Jun, J.W., Kim, J.H., Shin, S.P., Han, J.E., Chai, J.Y., and Park, S.C. 2013. Protective effects of the *Aeromonas* phage pAh-1C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. 416-417: 289-295.

Kamgar, M., Pourgholam, R., Ghiasi, M., and Ghane, M. 2013. Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge Infections. Advanced Studies in Biology. 5(1): 37-50.

Lu, Z., Breidt Jr., F., Fleminga, H.P., Altermannb, E., and Klaenhammerb, T.R. 2003. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation. International Journal of Food Microbiology. 84: 225–235.

Martínez-Díaz, SF., and Hipólito-Morales, A. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. Aquaculture. 400–401: 1203-1204.

Matsushita, K., Uchiyama, J., Kato, S., Ujihara, T., Hoshiba, H., Sugihara, S., Muraoka, A., Wakiguchi, H., Matsuzaki, S. 2009. Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water. FEMS Microbiology Letters. 291: 201–208.

Pal, S. 2015. Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements. Journal of Agriculture and Veterinary Science. 8(9): 68-81.

Pelon, W., Luftig, R.B., and Johnston, K.H. 2005. *Vibrio vulnificus* load reduction in Oysters after combined exposure to *V. vulnificus*-specific bacteriophage and an oyster extract component. Journal of Food Protection. 68: 1188–1191.

Wangkahart, E., and Rattanasena, P. 2012. Efficacy of injectable formalin-killed *Aeromonas hydrophila* vaccine in hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). Journal of Fisheries Technology Research. 6(1): 53-64. [in Thai]

Woolston, J., Parks A.R., Abuladze, R., Anderson, B., Li M., Carter C., Hanna, L.F, Heyse, S., Charbonneau, D., and Sulakvelidze, A. 2013. Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. Bacteriophage. 3(3): e25697.