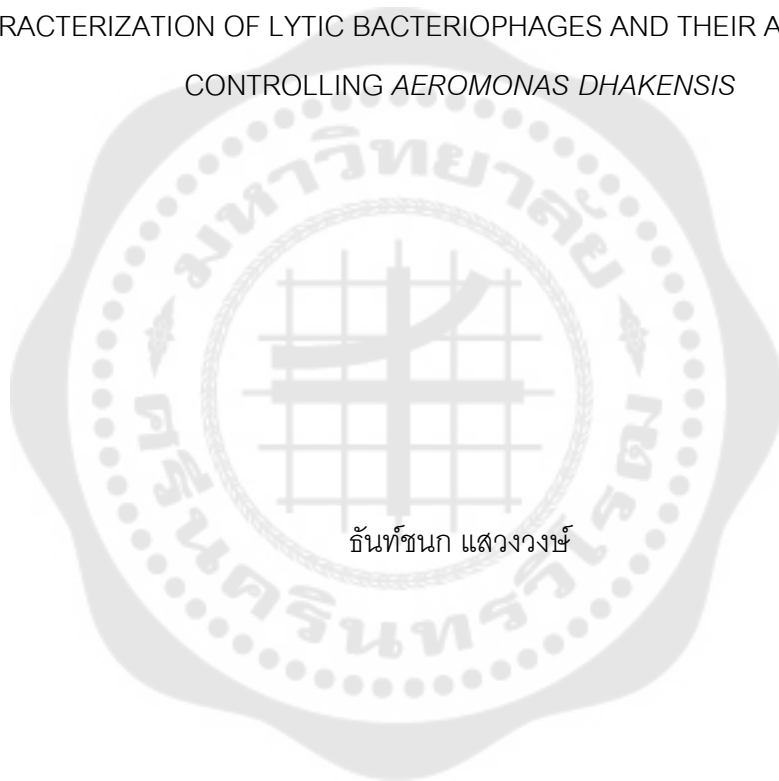




ลักษณะของไลติคแบคทีริโอเฟจและการนำไปใช้ควบคุมเชื้อ *Aeromonas dhakensis*  
CHARACTERIZATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES AND THEIR APPLICATION IN  
CONTROLLING *AEROMONAS DHAKENSIS*



ฉันทิชนก แสงวงษ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

ลักษณะของไลติคแบคทีเรียโอเฟจและการนำไปใช้ควบคุมเชื้อ *Aeromonas dhakensis*



ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

CHARACTERIZATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES AND THEIR APPLICATION IN  
CONTROLLING *AEROMONAS DHAKENSIS*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์  
เรื่อง  
ลักษณะของไลติคแบคทีเรียโอเฟจและการนำไปใช้ควบคุมเชื้อ *Aeromonas dhakensis*  
ของ  
ฉันทชนก แสงวงษ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

-----  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

-----  
คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรักษ์ ศรวณีย์รักษ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐจิภา สุวรรณาศรัย)

ชื่อเรื่อง	ลักษณะของไลดิดแบคทีเรียโอเฟจและการนำไปใช้ควบคุมเชื้อ <i>Aeromonas dhakensis</i>
ผู้วิจัย	ธันท์ชนก แสงวงษ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรักษ์ ศรณีนัยรักษ์

*Aeromonas dhakensis* ถือเป็นสปีชีส์ที่มีความรุนแรงที่สุดในเชื้อ *Aeromonas* ซึ่งมักพบในแถบพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อน อีกทั้งยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด จึงมีความจำเป็นที่จะหาวิธีการใหม่ ๆ ในการยับยั้งเชื้อชนิดนี้อย่างเร่งด่วน งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำการศึกษาลักษณะของไลดิดเฟจของเชื้อ *A. dhakensis* โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้ไอโซเลท AM ในการคัดแยกและเพิ่มจำนวนเฟจ จากการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อโดยการทดสอบทางซีวเคมี ศึกษาหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA และศึกษาจีโนมทั้งหมดของเชื้อ พบว่าไอโซเลท AM จัดเป็นเชื้อ *A. dhakensis* จากการวิเคราะห์หีนพบตำแหน่งยีนดื้อยาปฏิชีวนะและยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในเชื้อ *A. dhakensis* AM จากนั้นได้นำเชื้อนี้มาใช้เป็นโฮสต์ในการคัดแยกเฟจ โดยสามารถคัดแยกเฟจได้ 4 ตัว ได้แก่ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 จากการศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็นว่าเฟจ vB\_AdhS\_TS3 และ vB\_AdhS\_M4 จัดอยู่ใน family *Siphoviridae* ในขณะที่เฟจ vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL จัดอยู่ใน family *Myoviridae* การศึกษาความสามารถของเฟจในการติดเชื้อสายพันธุ์อื่นแสดงให้เห็นว่า เฟจทั้ง 4 ตัว มีความจำเพาะในการติดเชื้อ *A. dhakensis* เท่านั้น ต่อมาได้คัดเลือกเฟจ 3 ตัว ได้แก่ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากมีระยะ latent ที่สั้นและมีค่า burst size ที่มาก โดยเฟจทุกตัวมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ 4, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และจะไวต่อการเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวและเฟจแบบผสมพบว่า ภายหลังจากบ่ม 6 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณเชื้อ 2.82-6.67 และ 5.19-5.43 Log CFU/mL ตามลำดับ ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวและเฟจแบบผสมพบว่า ภายหลังจากบ่ม 6 และ 12 ชั่วโมง พบการยับยั้งเชื้อสูงสุด 3.06-5.25 และ 4.01-6.49 Log CFU/mL ตามลำดับ จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยใช้เฟจร่วมกับยา amoxicillin ในระดับ sub-MIC แสดงให้เห็นการยับยั้งเชื้ออย่างสมบูรณ์ทั้งในการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร อย่างไรก็ตาม การยับยั้งเชื้อเกิดไม่สมบูรณ์ในชุดการทดลองแบบ post-treatment ในปริมาณ 20 มิลลิลิตร แต่ยังคงลดปริมาณเชื้อประมาณ 1.2-1.7 Log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจและค่า G+C contents ของ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhM\_TS9 พบว่ามีขนาดของจีโนมเท่ากับ 115,560, 42,388 และ 115,503 คู่เบส ตามลำดับ และมีค่า G+C contents 41.10, 61.7 และ 35.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการใช้เฟจในรูปแบบผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะในระดับ sublethal เพื่อเป็นทางเลือกในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : การบำบัดด้วยเฟจ, การใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในระดับ sublethal, แบคทีเรียโอเฟจ, การเสริมฤทธิ์, การศึกษาจีโนม, *Aeromonas dhakensis*

Title	CHARACTERIZATION OF LYTIC BACTERIOPHAGES AND THEIR APPLICATION IN CONTROLLING <i>AEROMONAS DHAKENSIS</i>
Author	THANCHANOK SAWAENGWONG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Onanong Pringsulaka
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Siriruk Sarawareeyaruk

*Aeromonas dhakensis* is the most virulent *Aeromonas* species in tropical and subtropical areas and causes a variety of human diseases. Due to antibiotic resistance, there is an urgent need for new strategies against this pathogen. This is the first study to isolate and characterize lytic phages against *A. dhakensis* and of *Aeromonas* isolates, only isolate AM could isolate phages using enrichment techniques. This strain was identified via biochemical tests, 16S rDNA sequencing, and whole-genome analyses. All of the results confirmed that strain AM was *A. dhakensis*. *In silico* detection of antimicrobial resistance genes and virulence factors corresponded to the main bacterial virulence determinants observed in *A. dhakensis* AM, and used as a host for phage isolation. The four lytic phages, designated vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL, and vB\_AdhS\_M4, were isolated. The transmission electron micrographs showed that vB\_AdhS\_TS3 and vB\_AdhS\_M4 belonged to *Siphoviridae*, whereas vB\_AdhM\_TS9 and vB\_AdhM\_DL belonged to *Myoviridae* family. The host-range determination demonstrated all phages were capable of infecting *A. dhakensis*. The three phages, vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, and vB\_AdhM\_DL, were selected for a shorter latency period and larger burst sizes. All phages were resistant to a wide range of pH values and stable after a 60-minute incubation at 4°C, 25°C, 30°C, and 37°C, but sensitive to higher temperatures. The pre-treatment (co-inoculation of *A. dhakensis* and phage) with individual phages and cocktails reduced bacterial numbers in 2.82-6.67 and 5.19-5.43 Log CFU/mL, after 6 h of incubation. In post-treatment, maximum inactivation was the log reduction of bacterial numbers in the range of 3.06-5.25 and 4.01-6.49 Log CFU/mL after 6 and 12 h of incubation. A combination of phage cocktail with amoxicillin at sub-MIC showed inactivation in pre-treatment and post-treatment at 200 µL. However, incomplete inhibition was observed in post-treatment at 20 mL but still decreased by 1.2-1.7 log CFU/mL when compared to the control and after incubation for 48 h. The complete genome and G+C content of phages vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_DL, and vB\_AdhM\_TS9 were 115,560, 61,429, and 115,503 bp, with G+C contents of 41.10%, 61.7%, and 35.34%. This study demonstrated using phages as an adjuvant with a sublethal concentration of antibiotics as an effective therapeutic strategy.

Keyword : Phage therapy, Phage-antibiotic synergy, Bacteriophage, Synergistic effect, Genome analysis, *Aeromonas dhakensis*, Amoxicillin

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.สิริรักษ์ ศรวิเชียรวิทย์ ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาและการสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ณัฐฐิภา สุวรรณาศรัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ประภากร ตันตโยทัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ขวัญนันท์ นันทวิสัย ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สิรินธร สุนทรธรรมมาสน์ ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ รวมถึงสอนแนวทางการทำวิจัยและการวิเคราะห์ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. คมวิทย์ สุรชาติ ที่ได้ช่วยสอนและให้คำแนะนำ พร้อมทั้งช่วยตรวจทานผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการหาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียและแบคทีเรียโอเฟจ

ขอกราบขอบพระคุณคุณทัศนัท อติเทพ ที่ได้เสียสละเวลาในการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พร้อมทั้งช่วยให้คำแนะนำจากผลการวิเคราะห์ที่ได้

ขอโน้มรำลึกถึงคุณบิดามารดาสนับสนุนด้านการศึกษา คอยให้ความรักและกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ ๆ น้อง ๆ สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ ตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่น ๆ ที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ธันท์ชนก แสงวงษ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฑ
สารบัญรูปภาพ .....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย .....	3
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม .....	5
1. ลักษณะทั่วไปของ <i>Aeromonas</i> spp. ....	5
2. การคัดแยกและการจัดจำแนก <i>Aeromonas</i> spp.....	5
2.1 การคัดแยกเชื้อ <i>Aeromonas</i> spp.....	5
2.2 การจัดจำแนกเชื้อ <i>Aeromonas</i> spp.....	6
3. <i>Aeromonas dhakensis</i> .....	8
3.1 การจัดจำแนกเชื้อ <i>A. dhakensis</i> โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene และ housekeeping genes .....	9
3.2 การศึกษาความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	9



3.3 การก่อโรคของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	9
4. การใช้แบคทีริโอเฟจในการควบคุมเชื้อ <i>Aeromonas</i> ในสัตว์น้ำ.....	11
4.1 การจัดจำแนกเฟจ.....	11
4.1.1 เฟจมีหาง (tailed phages).....	11
4.1.1.1 การจัดจำแนก.....	11
4.1.1.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเฟจมีหางกับโฮสต์.....	12
4.2 วงจรชีวิตของเฟจ.....	13
4.2.1 วงจรชีวิตแบบไลติก (lytic cycle).....	14
4.2.2 วงจรชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic cycle).....	14
4.3 กราฟการเจริญของเฟจ (one-step growth curve).....	14
4.4 ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อเฟจ.....	15
4.5 การศึกษาจีโนมของเฟจ.....	16
4.6 กลไกการต่อสู้ของเชื้อต่อเฟจ.....	18
4.6.1. การสร้าง outer membrane vehicles เพื่อหลอกกล่อให้เฟจเข้าเกาะ แทน โครงสร้าง outer membrane ที่แท้จริง (outer membrane vehicles as an anti-phage mechanism).....	19
4.6.2. การยับยั้งการเข้าเกาะของเฟจ (inhibition of phage adsorption).....	19
4.6.3. การป้องกันการปล่อยดีเอ็นเอของเฟจเข้าสู่เซลล์ (blocking phage DNA injection).....	20
4.6.4. การตัดดีเอ็นเอของเฟจที่เข้าไปในเซลล์ (cleavage of injected phage DNA) .....	20
4.6.5. การยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ (inhibition of phage DNA replication).....	21
4.6.6. การบดบังการประกอบตัวของเฟจ (interference with phage assembly).....	22

4.6.7. การติดเชื้อที่ไม่มีการปล่อยลูกหลาน (abortive infection) .....	22
4.7 การใช้เฟจในการควบคุมเชื้อก่อโรคในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	23
5. การใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะควบคุมเชื้อก่อโรค .....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	25
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี .....	26
อุปกรณ์เพิ่มเติม .....	26
ชุดเครื่องมือทางการค้า .....	26
Molecular marker.....	27
เชื้อสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ทดสอบ .....	27
วิธีดำเนินการทดลอง .....	27
1. การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	27
1.1 การจัดจำแนกเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	27
1.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	29
1.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	30
1.4 การทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ .....	31
1.5 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล .....	31
1.6 การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> ...	31
1.7 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> ด้วยวิธี Next generation sequencing .....	32
2. การทดสอบความไวของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> ต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ด้วยวิธี Epsilon meter test (E-test).....	32

3. การคัดแยก คีฬารูปร่าง และคีฬาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	33
3.1 การคัดแยกเฟจ.....	33
3.2 การตรวจสอบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวันสองชั้น.....	34
3.3 การหาปริมาณเฟจ.....	34
3.4 การทำเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกพลาสติกเดี่ยว .....	34
3.5 การเพิ่มจำนวนเฟจ .....	34
3.6 การคีฬารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน .....	35
3.7 การคีฬาคความเสถียรของเฟจ .....	35
3.8 การตรวจสอบความสามารถในการทำลายเชื้อ <i>Aeromonas</i> สายพันธุ์อื่น .....	35
3.9 การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ (Multiplicity of infection หรือ MOI) .....	36
3.10 การคีฬากราฟการเจริญของเฟจ.....	36
3.11 การสกัดจีโนมของเฟจ .....	37
3.12 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจด้วยวิธี Next generation sequencing ..	38
4. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวในระดับห้องปฏิบัติการ	38
4.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment.....	39
4.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment .....	39
5. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> โดยใช้เฟจแบบผสมในระดับห้องปฏิบัติการ	40
5.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment.....	40
5.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment .....	40
6. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม .....	41

6.1 การทดสอบความไวของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> ต่อยา amoxicillin ด้วยวิธี broth microdilution test.....	41
6.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> แบบ pre-treatment ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น ½ MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม .....	41
6.2.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment.....	42
6.2.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment .....	42
6.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> ปริมาตร 20 มิลลิตร โดยใช้ความเข้มข้น ½ MIC amoxicillin ร่วมกับเฟจแบบผสม .....	43
6.3.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment.....	43
6.3.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment .....	43
7. การทดสอบทางสถิติ .....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	44
1. การคัดแยกเชื้อ <i>Aeromonas</i> sp. ....	44
2. การจัดจำแนกเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	45
2.1 การจัดจำแนกเชื้อโดยวิธีทดสอบทางซีวเคมี.....	45
2.2 การจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA .....	47
3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ <i>Aeromonas</i> ที่คาดว่าเป็นเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	47
4. การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM ด้วยวิธี Next generation sequencing .....	48
4.1 การประกอบและการสร้างแผนที่จีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM เพื่อค้นหาและทำนายหน้าที่ของยีน.....	48
4.2 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในจีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	50
5. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM ด้วยวิธี E-test.....	51

6. การตัดแยกเฟจโดยใช้เชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM เป็นโฮสต์.....	53
7. การเพิ่มจำนวนเฟจ.....	54
8. การศึกษาความสามารถของเฟจในการติดเชื้อสายพันธุ์อื่น.....	55
9. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ .....	56
10. การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ .....	58
11. การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ .....	58
12. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจ .....	59
13. การศึกษาผลของค่า pH ต่อการอยู่รอดของเฟจ.....	61
14. การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจด้วยวิธี Next generation sequencing.....	62
15. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวในระดับห้องปฏิบัติการ .....	70
15.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว.....	71
15.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว .....	72
16. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM โดยใช้เฟจแบบผสมในระดับห้องปฏิบัติการ .....	74
16.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบผสม .....	74
16.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบผสม.....	74
17. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM ในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม .....	76
17.1 การหาค่า minimal inhibitory concentration หรือ MIC ของยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	76
17.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น ½ MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม.....	76

17.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น  $\frac{1}{2}$  MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม..... 77

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 80

บรรณานุกรม ..... 89

ภาคผนวก ก ..... 102

ภาคผนวก ข..... 105

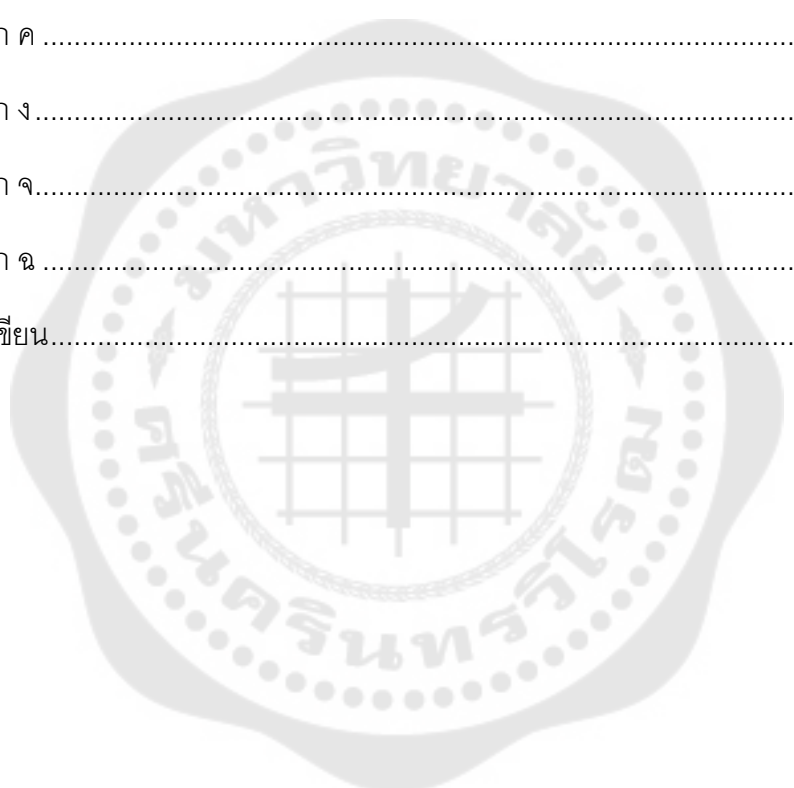
ภาคผนวก ค ..... 107

ภาคผนวก ง..... 108

ภาคผนวก จ..... 111

ภาคผนวก ฉ ..... 121

ประวัติผู้เขียน..... 122



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Aeromonas</i> spp.....	6
ตาราง 2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเฟจมีหางกับโฮสต์ .....	12
ตาราง 3 ตัวอย่างของยีนที่พบในเฟจสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงในโฮสต์.....	17
ตาราง 4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> , <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> และ <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i> <sup>(14)</sup> .....	28
ตาราง 5 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ universal primers .....	30
ตาราง 6 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ universal primers ด้วยเครื่อง PCR .....	31
ตาราง 7 ค่าความไวของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM ตามเกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2020 ด้วยวิธี E-test.....	33
ตาราง 8 การออกแบบการทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว.....	40
ตาราง 9 การออกแบบการทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> โดยใช้ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม .....	42
ตาราง 10 ไอโซเลทที่คาดว่าเป็น <i>Aeromonas</i> sp. จากตัวอย่างน้ำและปลา บนอาหาร <i>Aeromonas</i> Isolation Medium ที่มีการเติม ampicillin .....	44
ตาราง 11 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของทั้ง 6 ไอโซเลท ที่คาดว่าเป็นเชื้อ <i>A. dhakensis</i> .....	46
ตาราง 12 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene ของ ไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท.....	47
ตาราง 13 ลักษณะจีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	49
ตาราง 14 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	53
ตาราง 15 เฟจที่คัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ โดยใช้เชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM เป็นโฮสต์....	53

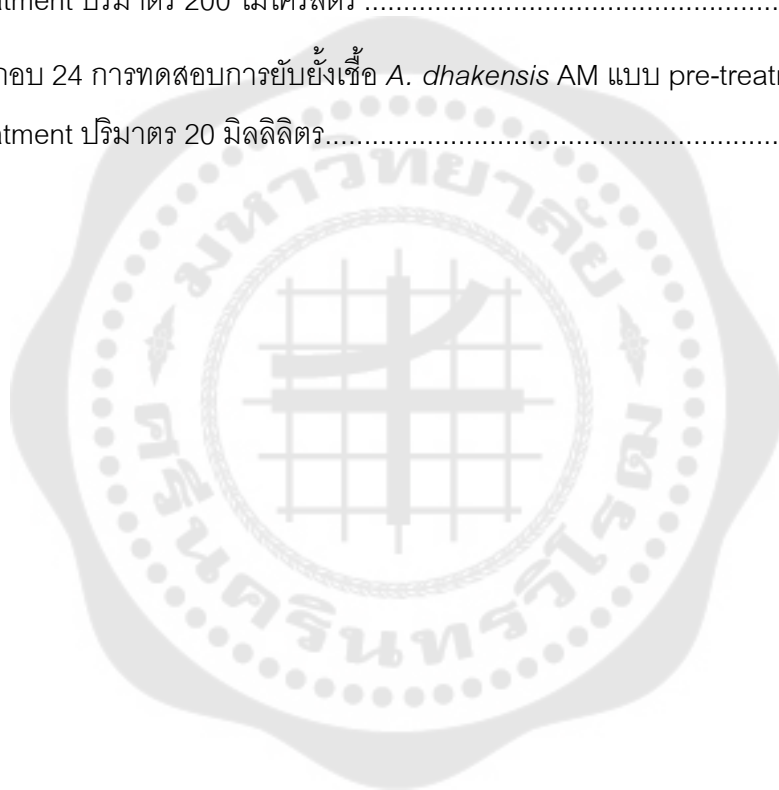
ตาราง 16 ลักษณะและขนาดของพลาซิด และปริมาณเฟจสูงสุดภายหลังจากการเพิ่มจำนวน.....	55
ตาราง 17 คุณสมบัติของเฟจในการติดเชื้อ <i>Aeromonas</i> สายพันธุ์อื่น.....	56
ตาราง 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ..	57
ตาราง 19 ผลการทดลองอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ.....	58
ตาราง 20 ลักษณะจีโนมของเฟจ vB_AdhS_TS3, vB_AdhM_TS9 และ vB_AdhM_DL.....	63
ตาราง 21 ข้อมูล ORFs ของจีโนมของเฟจ vB_AdhS_TS3 เมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลที่ทราบหน้าที่.....	65
ตาราง 22 ข้อมูล ORFs ของจีโนมของเฟจ vB_AdhM_TS9 เมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลที่ทราบหน้าที่.....	67
ตาราง 23 ข้อมูล ORFs ของจีโนมของเฟจ vB_AdhM_DL เมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลที่ทราบหน้าที่.....	69
ตาราง 24 tRNA ที่พบในจีโนมของเฟจ vB_AdhS_TS3.....	70
ตาราง 25 ยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่พบในจีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	108
ตาราง 26 ยีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อและตำแหน่งที่พบในจีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM .....	111
ตาราง 27 ตำแหน่งของ prophage ที่พบในจีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	121



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ตัวอย่าง family ต่าง ๆ ของเฟจ <sup>(50)</sup> .....	11
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของเฟจมีหาง (tailed phage) <sup>(51)</sup> .....	12
ภาพประกอบ 3 วงชีวิตแบบไลติกและไลโซเจนิคของเฟจ <sup>(52)</sup> .....	13
ภาพประกอบ 4 กราฟการเจริญของเฟจ <sup>(54)</sup> .....	15
ภาพประกอบ 5 การสร้าง outer membrane vesicles เพื่อหลอกล่อให้เฟจเข้าเกาะแทน โครงสร้าง outer membrane ที่แท้จริง <sup>(62)</sup> .....	19
ภาพประกอบ 6 การยับยั้งการเข้าเกาะของเฟจ <sup>(62)</sup> .....	20
ภาพประกอบ 7 การป้องกันการปล่อยดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของเฟจ <sup>(62)</sup> .....	20
ภาพประกอบ 8 การตัดดีเอ็นเอของเฟจที่เข้าไปในเซลล์ <sup>(62)</sup> .....	21
ภาพประกอบ 9 การยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ <sup>(62)</sup> .....	21
ภาพประกอบ 10 การบดบังการประกอบตัวของเฟจ <sup>(62)</sup> .....	22
ภาพประกอบ 11 การติดเชื้อที่ไม่มีการปล่อยลูกหลาน <sup>(62)</sup> .....	23
ภาพประกอบ 12 การเจริญของเชื้อบนอาหาร <i>Aeromonas</i> Isolation Medium ที่มีการเติม ampicillin.....	44
ภาพประกอบ 13 แผนภูมิความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ <i>Aeromonas</i> .....	48
ภาพประกอบ 14 แผนที่จีโนมของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM.....	49
ภาพประกอบ 15 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM ต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด ....	52
ภาพประกอบ 16 กราฟการเจริญของเฟจ.....	59
ภาพประกอบ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจ .....	60
ภาพประกอบ 18 ผลของอุณหภูมิ 65, 75 และ 100 องศาเซลเซียสต่อการอยู่รอดของเฟจ .....	61
ภาพประกอบ 19 ผลของ pH ต่อการอยู่รอดของเฟจ .....	61

ภาพประกอบ 20 แผนที่จีโนมของเพจ.....	64
ภาพประกอบ 21 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment โดยใช้เพจแบบเดี่ยว.....	73
ภาพประกอบ 22 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment โดยใช้เพจแบบผสม Cocktail 1, Cocktail 2 และ Cocktail 3.....	75
ภาพประกอบ 23 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM แบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ปริมาตร 200 ไมโครลิตร .....	78
ภาพประกอบ 24 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>A. dhakensis</i> AM แบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ปริมาตร 20 มิลลิลิตร.....	79



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

สัตว์น้ำจืดเป็นอาหารคู่กับคนไทยมาตั้งแต่สมัยโบราณ การจับสัตว์น้ำจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติย่อมไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคที่เพิ่มมากขึ้น จึงมีความคิดที่จะเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณแม่น้ำ ลำคลอง พื้นที่น้ำชลประทาน รวมถึงพื้นที่นาต่าง ๆ ที่มีบ่อกักเก็บน้ำตามฤดูกาล โดยเริ่มจากมีการขุดบ่อเลี้ยงปลาแล้วพัฒนาเรื่อยมาเป็นการเลี้ยงปลาในกระชังและสู่การเป็นฟาร์มเพาะเลี้ยงในที่สุด ปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำนอกจากใช้บริโภคได้อย่างเพียงพอภายในประเทศแล้ว ยังมีการส่งออกขายยังต่างประเทศเป็นลำดับต้น ๆ ของโลกอีกด้วย ซึ่งสามารถสร้างรายได้เป็นจำนวนมากต่อปี ทำให้อาชีพการทำประมงน้ำจืดเป็นอาชีพที่สำคัญของคนไทยอีกอาชีพหนึ่ง โดยสัตว์น้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เช่น ปลานิล ปลาดุก ปลาดุกเทศ ปลาช่อน ปลาดุก ปลาแรด ปลาสลิด กบ และกุ้งก้ามกราม อย่างไรก็ตาม ปัญหาหนึ่งของผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักประสบอยู่เสมอ คือการเกิดโรคที่เกิดจากการติดเชื้อรา ไวรัส และปรสิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อที่สามารถดำรงชีวิตในน้ำที่อุณหภูมิสูงในประเทศไทย ตัวอย่างเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำจืดที่มีความสำคัญ ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม *Aeromonad* ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีรายงานการติดเชื้อ *A. dhakensis* ที่คัดแยกได้จากปลาป่วย<sup>(1-5)</sup> นอกจากนี้ เชื้อ *A. dhakensis* เป็นเชื้อที่กำลังได้รับความสนใจมากขึ้นในฐานะเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่ที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonotic)<sup>(6)</sup> โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่อยู่ในทวีปเอเชีย มีรายงานการพบเชื้อ *A. dhakensis* มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่รุนแรงและเสียชีวิตในมนุษย์<sup>(7-13)</sup> ในประเทศไทยพบข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *A. dhakensis* น้อยมากเมื่อเทียบกับการรายงานการระบาดของเชื้อ *A. hydrophila* มีเพียงรายงานของ Yano และคณะ (2015) ที่รายงานความเสี่ยงการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย ซึ่งขณะนั้นผู้วิจัยได้ทำการจำแนกเชื้อด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยเพียงการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene เท่านั้น จากงานวิจัยพบการติดเชื้อ *A. aquariorum* 18% จาก 70 ไอโซเลทที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas* spp. ภายหลัง Po-Lin Chen และคณะ (2016) ได้กล่าวถึงงานวิจัยนี้โดยเปลี่ยนจากการติดเชื้อ *A. aquariorum* เป็นการเชื้อ *A. dhakensis*<sup>(9)</sup> เนื่องจาก *A. aquariorum* และ *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* จัดอยู่ในกลุ่มของ *A. dhakensis* sp. nov. comb. nov.<sup>(14)</sup> ปัจจุบันการศึกษาจีโนม *Aeromonas* spp. จึงมีความสำคัญอย่างมากในการระบุเชื้อ *A. dhakensis* ออกจาก *A. hydrophila* อย่างไรก็ตาม

ข้อมูลจีโนมของ *A. dhakensis* ยังคงน้อยเมื่อเทียบกับ *A. hydrophila* และเมื่อไม่นานมานี้ในประเทศเวียดนามได้มีการรายงานว่า เชื้อ *A. dhakensis* เป็นเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อปลาอย่างมากที่สุดคือปลาดุกลาย (striped catfish) บริเวณดินดอนสามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขง (Mekong Delta)<sup>(6)</sup> โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาจีโนมและการพบเชื้อ *A. dhakensis* เป็นสิ่งที่ผู้วิจัยคาดไม่ถึงที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรค Motile Aeromonas Septicemia (MAS) เนื่องจากเชื้อ *A. hydrophila* มักจะเป็นเชื้อที่ถูกกล่าวถึงว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่สุดก่อให้เกิดโรค MAS ในปลาดุกลายของประเทศเวียดนาม<sup>(15)</sup>

การพัฒนาและการเติบโตของอุตสาหกรรมสัตว์น้ำจืดอย่างรวดเร็วมักมีปัญหากการติดเชื้อก่อโรคตามมา ซึ่งสาเหตุหลักมักเกิดจากความเครียดของสัตว์น้ำ การเพาะเลี้ยงอย่างแออัดหรือมาตรการด้านสุขอนามัยที่บกพร่อง ทำให้เชื้อต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อและความชุกของการติดเชื้อ<sup>(16)</sup> การใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำจืดถือเป็นส่วนสำคัญของการป้องกันโรคและเพื่อรักษาการติดเชื้อ<sup>(17)</sup> ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาขึ้น องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้เห็นความสำคัญของอุบัติการณ์การดื้อยาดังกล่าว จึงเสนอให้ภาคอุตสาหกรรมมองหาทางเลือกใหม่ในการควบคุมเชื้อก่อโรค แม้ว่าการฉีดวัคซีนจะเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการควบคุมโรคติดเชื้อ แต่ปัจจุบันยังมีวัคซีนไม่มากที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อีกทางเลือกหนึ่งซึ่งได้รับความสนใจในขณะนี้คือ การใช้แบคทีริโอเฟจ (bacteriophage) หรือเฟจ (phage) ในการยับยั้งเชื้อ<sup>(18)</sup> เนื่องจากเฟจสามารถทำลายเชื้อก่อโรคได้อย่างจำเพาะไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อประจำถิ่น ไม่มีสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม และยังช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อด้วย อย่างไรก็ตาม การใช้เฟจเพียงอย่างเดียวมักประสบปัญหาว่า เชื้อสามารถพัฒนาให้ดื้อต่อเฟจได้ ดังนั้นการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งในการศึกษานี้จึงคัดเลือก ศึกษารูปร่าง และศึกษาลำดับจีโนมของเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. dhakensis* จากตัวอย่างในประเทศไทย รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันระหว่างยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำกับเฟจแบบเดี่ยว (single phage) และเฟจแบบผสม (phage cocktail) ในการควบคุมเชื้อ *A. dhakensis* ระดับห้องปฏิบัติการ โดยข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในควบคุมเชื้อก่อโรคในปลาหรือสัตว์น้ำอย่างมีประสิทธิภาพ

### ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัยไว้ดังนี้

1. เพื่อคัดแยก ศึกษาคุณสมบัตินิวเคลียสและทางโมเลกุล วิเคราะห์ phylogenetic และการจัดกลุ่มของเชื้อ ศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis*
2. เพื่อคัดแยก ศึกษารูปร่าง ความเสถียร และความสามารถในการทำลายเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อื่นของเฟจ กราฟการเจริญของเฟจ ความเสถียรของเฟจต่ออุณหภูมิและ pH และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. dhakensis*
3. เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว เฟจแบบผสม และยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม

### ความสำคัญของงานวิจัย

การใช้เฟจในการควบคุมการติดเชื้อในคนและสัตว์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยการควบคุมโดยเฟจหรือ phage therapy นั้นมีข้อได้เปรียบหลายด้าน ได้แก่ เฟจมีความจำเพาะต่อเชื้อจึงไม่ส่งผลเสียหรือผลข้างเคียงมายังมนุษย์ ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม โดยจะติดเชื้อเฉพาะเชื้อจำเพาะเท่านั้น เฟจสามารถทนอยู่ในสภาวะที่หลากหลาย ถึงแม้ว่าอาจเกิดเชื้อสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อเฟจ แต่สายพันธุ์กลายเหล่านั้นส่วนใหญ่กลับไปเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเฟจ เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์กลายที่ดื้อต่อเฟจจะมีการเปลี่ยนแปลง receptor เป็นหลัก ซึ่ง receptor เหล่านี้มักเป็นโครงสร้างของเซลล์ที่มีความสำคัญต่อเชื้อ เช่น teichoic acid และ lipopolysaccharide จึงเกิดการดื้อต่อเฟจระยะหนึ่ง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลง receptor เหล่านี้แล้วทำให้เชื้อสายพันธุ์กลายไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ เชื้อสายพันธุ์กลายจึงกลับมาสร้างโครงสร้างที่สำคัญเหล่านี้อีกครั้ง ด้วยสาเหตุนี้ทำให้สายพันธุ์กลายส่วนใหญ่กลับไปเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเฟจอีกครั้ง นอกจากนี้การใช้ phage therapy เป็นวิธีการควบคุมที่รวดเร็วและไม่แพง และไม่พบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะหรือผลข้างเคียงอื่น ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เฟจในการควบคุมโรคในปลา แต่ยังไม่มีการรายงานในประเทศไทยที่มีการรายงานการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะ ซึ่งเฟจที่คัดแยกได้นั้นยังมีความจำเพาะแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคขึ้นกับโฮสต์ที่ใช้ ประกอบกับเป็นที่ทราบกันดีว่าในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายจึงทำให้การรักษาการติดเชื้อชนิดนี้ต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้ยาเพิ่มขึ้น และส่งผลให้

เชื้อดื้อยาหลายชนิด ดังนั้นแนวทางในการใช้เฟจในการกำจัดเชื้อนี้จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เชื้อดื้อยาทุกประเภทในห้องตลาด

### ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อ *A. dhakensis* จากแหล่งน้ำ จัดจำแนกเชื้อด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี จำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA วิเคราะห์ phylogenetic ศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของ *A. dhakensis* ทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* ต่อยาปฏิชีวนะ คัดแยกเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. dhakensis* ตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์อื่น ศึกษารูปร่างของเฟจ ศึกษาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ กราฟการเจริญของเฟจ ความเสถียรของเฟจต่ออุณหภูมิและ pH และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ในระดับห้องห้องปฏิบัติการ โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว เฟจแบบผสม และยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การลดจำนวนเชื้อ *A. dhakensis* โดยเฟจที่คัดแยกได้ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำ จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลหรือประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ในบ่อน้ำที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจโดยเฉพาะปลาต่อไป

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

#### 1. ลักษณะทั่วไปของ *Aeromonas* spp.

*Aeromonas* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) รูปร่างท่อน (rod-shaped) เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria) ไม่สร้างสปอร์ สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส<sup>(19)</sup> สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะการเคลื่อนที่ คือ กลุ่ม non-motile psychrophilic aeromonads และกลุ่ม motile mesophilic aeromonads<sup>(20)</sup> โดยกลุ่ม non-motile psychrophilic aeromonads ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 22-28 องศาเซลเซียส ตัวอย่างของจีโนสปีส์ ได้แก่ *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* และ *A. salmonicida* subsp. *smithia*<sup>(21)</sup> อีกกลุ่มคือ motile mesophilic aeromonads สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagellum เส้นเดียว บริเวณปลายหรือหัวของเซลล์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส ตัวอย่างของจีโนสปีส์ ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. veronii* biovar *sobria* ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์นี้ จัดเป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในปลาและสัตว์น้ำที่มีชื่อว่า Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) โดยเฉพาะ *A. hydrophila* เป็นสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรค MAS ที่รุนแรง จึงเรียกกสปีชีส์นี้ว่า "virulent *Aeromonas hydrophila*" (VAh)<sup>(22)</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Chen และคณะ<sup>(23)</sup> เปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของ *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *A. caviae* และ *A. veronii* โดยการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของหนูสายพันธุ์ BALB/c จากการศึกษายืนยันว่า *A. dhakensis* มีความรุนแรงมากกว่า *A. hydrophila* ปัจจุบันจึงมีการรายงานว่า เชื้อ *A. dhakensis* เป็นเชื้อที่กำลังได้รับความสนใจมากขึ้นในฐานะเชื้อโรคอุบัติใหม่ที่ก่อให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบทวีปเอเชีย ซึ่งสายพันธุ์นี้เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อที่รุนแรงและเสียชีวิตในมนุษย์<sup>(7-13)</sup>

#### 2. การคัดแยกและการจัดจำแนก *Aeromonas* spp.

##### 2.1 การคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* spp.

การคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. ในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) และ Tryptic soy broth (TSB)

เป็นอาหารที่นิยมนำมาใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อและเก็บรักษาเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาและถึงน้ำที่มีการปนเปื้อน<sup>(24)</sup>

## 2.2 การจัดจำแนกเชื้อ *Aeromonas* spp.

### 2.2.1 การจัดจำแนกเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยวิธีทดสอบทางชีวเคมี

การจัดจำแนกเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยวิธีทดสอบทางชีวเคมีนั้นอ้างอิงตามคู่มือ Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria<sup>(25)</sup> โดยจิ้นัส *Aeromonas* สามารถหมักน้ำตาล D-glucose อาจเกิดหรือไม่เกิดแก๊ส ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ oxidase และ catalase สามารถสร้างสาร indole วิดีวซ์ไนเตรทให้เป็นไนโตรท และไม่วิต้อสาร 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine (O/129) ทำให้สามารถแยกจิ้นัส *Aeromonas* ออกจากจิ้นัส *Vibrio* ซึ่งมักจะไวต่อสารนี้ได้ การใช้น้ำตาลอื่นจะมีความแตกต่างกันในระหว่างสปีชีส์และสายพันธุ์ การทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญ<sup>(25, 26)</sup> แสดงดังตาราง 1 นอกจากนี้การทดสอบทางชีวเคมีอาจใช้ชุดทดสอบทางการค้า เช่น API 20E, API 20NE (BioMérieux, Durham, NC) อย่างไรก็ตาม การทดสอบทางชีวเคมีมักทำให้เกิดการระบุผิดพลาดในระดับสปีชีส์<sup>(27, 28)</sup>

ตาราง 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Aeromonas* spp.

Characteristic	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. media</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i> <sup>b</sup>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	<i>A. dhakensis</i>
Motility	+	+	+	d	+	+	+	d	+	d	+	-	+	+	+	nd
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-	+	+	+	+	nd
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-**
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+	+	nd
Citrate	d	d	d	+	-	-	+	d	+	d	d	+	d	+	d	-**
Acetate	+	+	+	+	+	d	+	d	d	+	d	+	+	+	+	nd
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-**
KCN	+	-	d	+	+	+	d	d	d	d	-	-	d	-	d	nd
Voges-Proskauer	+	-	d	-	-	-	d	-	d	d	d	-	-	d	d	+
Gelatin	+	+	d	+	d	d	+	d	+	+	d	-	+	+	+	nd
Lysine decarboxylase	+	+	d	-	-	-	+	-	-	d	d	+	+	+	+	-**
Arginine dihydrolase	+	d	d	+	d	d	+	d	+	d	+	-	+	-	+	nd
Ornithine decarboxylase	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-**



ตาราง 1 (ต่อ)

Characteristic	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. media</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida<sup>b</sup></i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. veronii biovar veronii</i>	<i>A. veronii biovar sobria</i>	<i>A. dhakensis</i>
Phenylpyruvic acid production	d	+	d	+	d	d	+	d	d	d	d	+	+	+	+	nd
DNase	+	-	d	+	+	d	+	d	d	d	d	-	+	d	d	nd
Corn oil lipase	+	+	d	d	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	nd
D-Glucose (gas)	+	+	d	-	d	d	+	-	+	d	-	d	d	d	d	+**
L-Arabinose	d	d	+	+	-	d	-	+	d	+	-	-	-	-	d	* <sup>c</sup>
L-Rhamnose	d	d	d	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Cellobiose	-	+	d	+	-	d	d	+	-	d	-	+	+	d	d	-**
Lactose	d	-	d	d	-	d	d	d	-	+	-	-	-	d	d	nd
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+**
Sucrose	+	+	+	+	d	d	-	+	-	+	-	+	d	+	+	+**
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+**
D-Raffinose	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-**
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Glycerol	+	+	+	d	+	d	+	d	+	+	-	+	d	+	+	nd
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+**
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-**
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	d	-	d	-	-	-	d	-	+	d	-	d	-	+	d	nd
Salicin	d	-	d	+	d	d	-	d	-	d	-	-	-	+	-	+*
Melibiose	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
D-Amygdalin	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
H <sub>2</sub> S from gelatin cysteine thiosulfate	+	d	d	-	d	d	d	-	+	d	-	+	-	d	d	+
Gluconate oxidation <sup>c</sup>	d	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	d	d	nd
Elastase	d	-	d	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	nd
Ascorbate	nd	nd	d	nd	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	nd
Esculin hydrolysis	+	d	+	+	+	d	-	d	-	d	-	-	-	+	-	nd
Growth in 0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
Growth in 3% NaCl	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-	+	+	+	nd
Hemolysis <sup>d</sup>	+	d	+	-	d	d	+	d	-	d	d	-	d	+	+	nd

ตาราง 1 (ต่อ)

Characteristic	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. eurenophila</i>	<i>A. jandaiei</i>	<i>A. media</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i> <sup>b</sup>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>	<i>A. veronii biovar veronii</i>	<i>A. veronii biovar sobria</i>	<i>A. dhakensis</i>
Urocanic acid	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+
Ampicillin (S) <sup>e</sup>	-	-	-	-	nd	-	-	d	-	d	-	d	+	-	-	-**
Cephalothin (S) <sup>f</sup>	d	-	d	-	d	d	d	d	-	d	d	+	-	d	+	nd
O/129 (R)	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-**
Pyrazinamidase <sup>g</sup>	-	nd	-	d	nd	+	-	d	-	d	-	-	d	-	d	nd
Mannose	+	nd	+	d	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+**
Stapholysin	d	-	d	-	nd	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
Polypectate (25°C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	nd
Mucate <sup>h</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd

<sup>a</sup> สัญลักษณ์: + = ให้ผลบวกมากกว่า 90%; - = ให้ผลบวกลดกว่า 10%; d = ให้ผลบวก 89% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ยกเว้น

*A. popoffii* และ *A. sobria* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส; nd (not determined) = ไม่ได้ทดสอบ

<sup>b</sup> *A. salmonicida* จัดเป็น motile, mesophilic aeromonads

<sup>c</sup> การตรวจทดสอบ gluconate oxidation ของ *Aeromonas* spp. จะบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

<sup>d</sup> การตรวจทดสอบ hemolysis ของ *Aeromonas* spp. จะใช้อาหาร TSA ที่มี 5% sheep blood

<sup>e</sup> การทดสอบความไวต่อยา ampicillin จะใช้ 10 µg/disk และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

<sup>f</sup> การทดสอบความไวต่อยา cephalothin จะใช้ 30 µg/disk และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

<sup>g</sup> การทดสอบ pyrazinamidase activity จะบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

<sup>h</sup> ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว

\* ข้อมูลจากรายงานของ Beaz-Hidalgo และคณะ<sup>(14)</sup>

\*\* ข้อมูลจากรายงานของ Carriero และคณะ<sup>(26)</sup>

### 3. *Aeromonas dhakensis*

*A. dhakensis* เป็นเชื้อรูปร่างท่อน แกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile gram-negative bacilli) สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotrophs) สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพมีหรือไม่มีออกซิเจน โดยเชื้อ *A. dhakensis* มีถิ่นอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำในธรรมชาติ และเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 28-42 องศาเซลเซียส การแยกเชื้อ *A. dhakensis* ออกจาก *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* หรือ *A. hydrophila* subsp. *ranae* โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอย่างน้อย 3 วิธี ได้แก่ การทดสอบการใช้กรดยูโรคานิค

(urocanic acid) น้ำตาลแอล-อะราบินอส (L-arabinose) และซาลิซิน (salicin)<sup>(7, 29)</sup> อย่างไรก็ตาม *A. dhakensis* และ *A. hydrophila* มักถูกระบุผิดพลาดในระดับสปีชีส์เนื่องจากเชื้อทั้งสองมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เหมือนกัน<sup>(30, 31)</sup> จึงมีความเป็นไปได้ว่าสาเหตุการตายของสัตว์น้ำที่เกิดจากการระบาดของเชื้อ *A. dhakensis* อาจจะถูกรายงานว่าเป็นเชื้อ *A. hydrophila*<sup>(32)</sup>

### 3.1 การจัดจำแนกเชื้อ *A. dhakensis* โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene และ housekeeping genes

การจัดจำแนกเชื้อ *A. dhakensis* โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene ในปัจจุบันนั้นไม่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ *Aeromonas* ระดับสปีชีส์<sup>(33)</sup> แต่ได้มีการใช้ลำดับของ housekeeping genes เช่น *rpoB*, *rpoD*, หรือ *gyrB*<sup>(34, 35)</sup> โดยในปี 2011, Martinez-Murcia และคณะ ใช้ยีน *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX*, และ *atpD* สามารถแยกความแตกต่างโดยการทำ multiplex ligation dependent probe amplification ซึ่งเป็นวิธีที่มีการใช้ housekeeping genes จะช่วยเพิ่มโอกาสในการจำแนกได้อย่างถูกต้อง<sup>(36-38)</sup>

### 3.2 การศึกษาความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ *A. dhakensis*

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Beaz-Hidalgo และคณะ โดยใช้ลำดับของ 16S rRNA gene, *rpoD* หรือ *gyrB* และการนำลำดับเบสของ *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* และ *gyrA* มาต่อกันหรือที่เรียกว่าวิธี Multilocus phylogenetic analysis (MLPA) แสดงให้เห็นว่า *A. aquariorum* และ *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* แยกออกจากกลุ่มเชื้อ *A. hydrophila* และถูกจัดกลุ่มใหม่เป็น *A. dhakensis* sp. nov. comb nov.<sup>(14)</sup>

### 3.3 การก่อโรคของเชื้อ *A. dhakensis*

ในอดีตการก่อโรคของสายพันธุ์ *Aeromonas* จะพิจารณาจากปัจจัยความรุนแรงหลายอย่าง เช่น secretion system และ toxins<sup>(39)</sup> ปัจจุบันการศึกษาก่อโรคสำหรับ *A. dhakensis* เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีงานวิจัยชี้ให้เห็นว่า *A. dhakensis* มีความรุนแรงมากกว่าเชื้อ *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น ๆ โดยเชื้อ *A. dhakensis* (เดิมจำแนกเป็น *A. hydrophila* หรือ *A. aquariorum*) จะแสดงความเป็นพิษต่อ human blood cell lines<sup>(40)</sup> และก่อโรครุนแรงในปลา<sup>(1-5)</sup> งานวิจัยก่อนหน้านี้ทำการเปรียบเทียบเชื้อ *A. dhakensis*, *A. veronii*, *A. caviae*, และ *A. hydrophila* พบว่า เชื้อ *A. dhakensis* มีความรุนแรงมากกว่า *A. veronii*, *A. caviae*, และ *A. hydrophila* โดยใช้ mouse fibroblast C2C12 cell line, หนู สายพันธุ์ BALB/c และ หนอนพยาธิตัวกลม (*C. elegans*) ในการทดลอง<sup>(23)</sup> ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยี Next generation sequencing การเปรียบเทียบจีโนมควบคู่ไปกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

สามารถช่วยในการวิเคราะห์เครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อโรค (pathogen specific markers) และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค และระบบ secretion system ในเชื้อ *A. dhakensis* SSU (เดิมจำแนกเป็น *A. hydrophila* SSU) ดังนี้

- โปรตีน heat-labile cytotoxic enterotoxin (Alt) และโปรตีน heat-stable cytotoxic enterotoxin (Ast) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โปรตีนทั้งสองสามารถเพิ่มระดับ cAMP ในเยื่อบุลำไส้<sup>(41)</sup>

- โปรตีน aerolysin-related cytotoxic enterotoxin (Act) ที่หลั่งออกมาจากระบบ type 2 secretion system (T2SS) สามารถทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงและการติดเชื้อที่บาดแผลลึกในหนูได้<sup>(42, 43)</sup>

- ระบบ Type 3 secretion system (T3SS) effector (AexU) และเอนไซม์ ADP-ribosyltransferase และ GAP activities มีบทบาทในการติดเชื้อ *Aeromonas*<sup>(44)</sup>

- โปรตีน hemolysin coregulated protein (Hcp) ที่หลั่งออกมาจากระบบ type 6 secretion system (T6SS) ซึ่งมีความสำคัญในการติดเชื้อที่รุนแรงของเชื้อ *A. dhakensis* SSU<sup>(45, 46)</sup> โดยทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์โฮสต์ โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase 3<sup>(45)</sup> ทำให้การทำงานของแกรนูโลไซต์ (granulocyte) บกพร่องจึงทำให้เกิดการติดเชื้อ<sup>(46)</sup>

- โปรตีน Valine-glycine-repeat G (VgrG) family ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย ADP-ribosylation ในแอกทิน (actin) จึงเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization)<sup>(47)</sup>

- โปรตีน exotoxin A (ExoA) ถูกใช้เป็นเครื่องหมายระบุว่าก่อโรคของเชื้อ *A. dhakensis* SSU<sup>(48)</sup> และ *A. dhakensis* BVH28b<sup>(49)</sup>

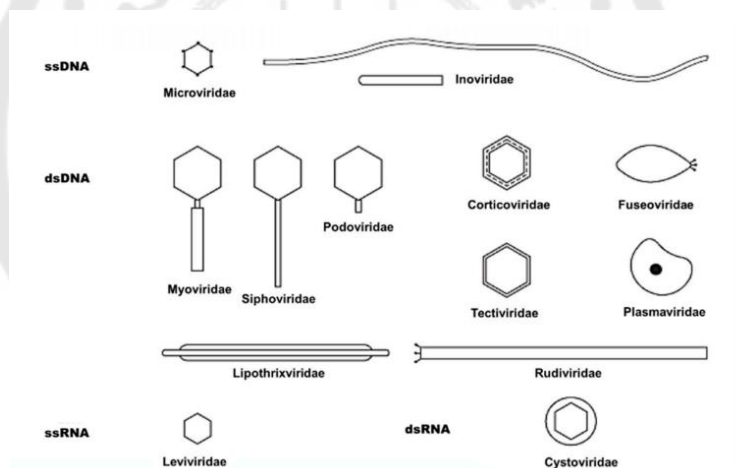
อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยความรุนแรงเหล่านี้มีอยู่จำกัด และความชุกของยีนใน *A. dhakensis* หรือ *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น ๆ จำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติม แม้ว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงมีการรายงานในเชื้อ *A. dhakensis* SSU แต่การศึกษาเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น CIP 107500, AAK1, CECT 7289 และ BVH28b แสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงเหล่านี้ไม่ได้ถูกพบในทุกสายพันธุ์ จึงจำเป็นต้องศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของ *A. dhakensis* ในสายพันธุ์อื่นเพิ่มเติม ทั้งนี้การระบุสปีชีส์และปัจจัยความรุนแรงที่ถูกต้องอาจเป็นโอกาสในการพัฒนาวิธีการต่อต้านเชื้อ *A. dhakensis* ที่รุนแรงในสัตว์และมนุษย์นอกเหนือจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

#### 4. การใช้แบคทีริโอเฟจในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* ในสัตว์น้ำ

แบคทีริโอเฟจหรือเฟจ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1915 โดย Twort และ Felix D'Herelle ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้มีการริเริ่มนำเฟจมาควบคุมการติดเชื้อจากเชื้อก่อโรค หรือที่เรียกว่า phage therapy อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1940 มีการค้นพบยาปฏิชีวนะทำให้การใช้ phage therapy นั้นหายไป ต่อมาเมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างผิดวิธีส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อต่อยา (antibiotic resistance) เฟจจึงถูกนำมาเป็นทางเลือกในการรักษาจากเชื้อก่อโรค

##### 4.1 การจัดจำแนกเฟจ

เฟจประกอบด้วยจีโนมซึ่งอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ ทั้งเป็นวงกลม (circular) และสายตรง (linear) โดยจีโนมจะถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเปลือกโปรตีนเรียกว่า แคปซิด ซึ่งมีรูปร่างได้หลายแบบ (ภาพประกอบ 1) โดยองค์กร International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้จัดจำแนกเฟจออกเป็น 49 family ตามชนิดของกรดนิวคลีอิกและลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่าง family ต่าง ๆ ของเฟจ<sup>(50)</sup>

##### 4.1.1 เฟจมีหาง (tailed phages)

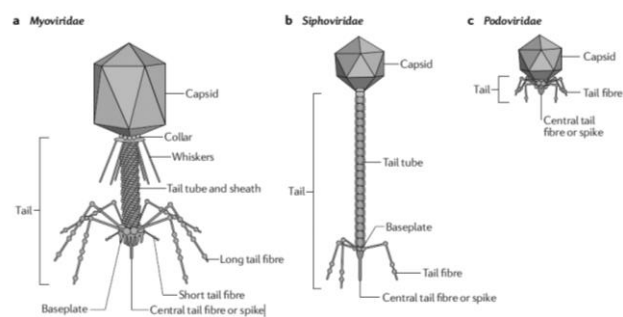
###### 4.1.1.1 การจัดจำแนก

เฟจที่พบส่วนใหญ่แล้ว 95% เป็นเฟจมีหาง (tailed phage) จัดอยู่ใน order *Caudovirales* เฟจมีหางจะประกอบไปด้วยส่วนหัว (head) และหาง (tail) (ภาพประกอบ 2) โดยมีแคปซิดห่อหุ้มสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ไว้ภายในหัวและช่วยป้องกันจากการถูกทำลาย และส่วนหางจะแตกต่างกันไป โดยเฟจมีหางที่มีการศึกษามากที่สุดจะมี 3 family (ภาพประกอบ 2) ดังนี้

1. *Myoviridae* เป็นเฟจมีหางที่สามารถยึด-หดได้ มี sheath หุ้มรอบหาง และมีแกนกลางอยู่ในส่วนหางเรียกว่า central tail fibre มีโครงสร้างส่วนปลาย เช่น tail fiber, base plate เป็นต้น พบเฟจกลุ่มนี้ประมาณร้อยละ 25 ของเฟจมีหางทั้งหมด

2. *Siphoviridae* เป็นเฟจมีหางยาว แต่ไม่สามารถยึดหดได้ เฟจกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดเฟจมีหาง เนื่องจากพบได้ประมาณร้อยละ 60 ของเฟจมีหางทั้งหมด

3. *Podoviridae* เป็นเฟจที่มีหางสั้น พบได้ประมาณร้อยละ 14 ของเฟจมีหางทั้งหมด



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของเฟจมีหาง (tailed phage)<sup>(51)</sup>

(a) *Myoviridae* (b) *Siphoviridae* (c) *Podoviridae*

#### 4.1.1.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเฟจมีหางกับโฮสต์

เฟจมีหางจะใช้ tail fiber, tail spikes และ tail tips เป็น receptor-binding proteins (RBPs) ในการเข้าจับกับ receptor ที่จำเพาะบนผิวเซลล์เชื้อ เช่น lipopolysaccharide หรือ LPS, teichoic acid และ porin เป็นต้น ซึ่ง myophages, siphophages และ podophages มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเฟจมีหางกับโฮสต์แตกต่างกัน<sup>(51)</sup> ดังตาราง 2

ตาราง 2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเฟจมีหางกับโฮสต์

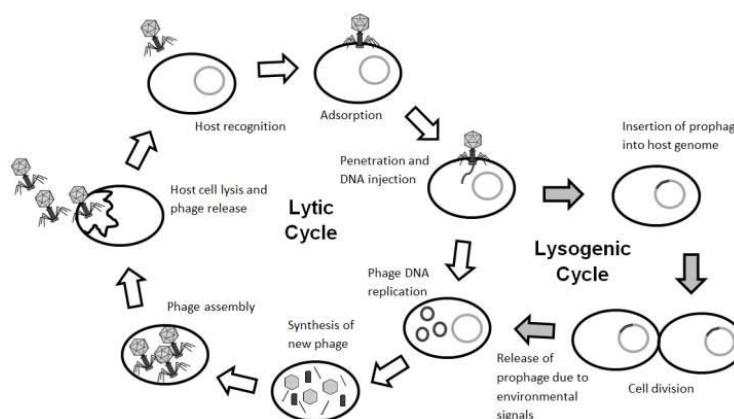
Phage family	Adsorption module	RBP	Bacterial target	Host receptor	Example phage
<i>Siphoviridae</i>	Long non-contractile tail	Tail fibre	GN	O-antigen (smooth LPS)	T5
				Core oligosaccharide (rough LPS)	SSU5
				Proteins (for example, LamB, TolC and FepA)	λ, TLS and H8
				Flagella	Chi and iEPSS
				Pilli	DMS3
			GP	Teichoic acids	LL-H

## ตาราง 2 (ต่อ)

Phage family	Adsorption module	RBP	Bacterial target	Host receptor	Example phage	
<i>Siphoviridae</i>	Long non-contractile tail	Tail spike	GN	Capsule	Vi-II	
				LPS	9NA	
			GP	Protein (for example, YueB)	SPP1	
			Centraltail fibre	GN	Protein (for example, BtuB and FhuA)	BF23, T5
			Tail tip	GN	Protein (for example, TonB)	H8
			Capsid filament	GN	Flagella	phiChi13 and phiCbK
<i>Myoviridae</i>	Long contractile tail	Tail fibre	GN	LPS	Mu	
				Proteins (for example, OmpC and OmpF)	T4 and T2	
				Flagella	SPN3US	
				GP	Protein (for example GamR)	$\gamma$
			Tail spike	GN	Capsule	MAM1
				GN	LPS	Det7
				GN	LPS	T3 and T7
				GN	Proteins (For example, Ail and OmpF)	Yep-phi
<i>Podoviridae</i>	Short contractile tail	Tail fibre	GN	Type IV pili	MPK7	
				Capsule	phiK1-5	
				O-antigen (smooth LPS)	P22	
		Tail spike	GN	Preprotein (for example, OmpA)	Sf6	
				GP	Teichoic acids	Phia29
				GP	Teichoic acids	Phia29

## 4.2 วงจรชีวิตของเฟจ

เฟจแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามวงจรชีวิตในโฮสต์ (ภาพประกอบ 3) ดังนี้



ภาพประกอบ 3 วงจรชีวิตแบบไลติกและไลโซเจนิคของเฟจ<sup>(52)</sup>

#### 4.2.1 วงชีวิตแบบไลติก (lytic cycle)

ไลติกเฟจ (lytic phage) หรือ ไวรัลเอนต์เฟจ (virulent phage) คือ เฟจที่ทำให้เชื้อที่เป็นโฮสต์เกิดการแตกสลาย เฟจจะเข้าเกาะติดกับบริเวณ receptor ที่จำเพาะบนผิวของเชื้อและฉีดสารพันธุกรรมเข้าไปในเซลล์ เซลล์เชื้อให้โมเลกุลและเอนไซม์ที่จำเป็นในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเฟจและผลิตเฟจลูกหลาน (progeny phage) ในช่วงที่จะปล่อยเฟจลูกหลาน เฟจจะสร้างโปรตีน 2 ชนิดคือ เอนโดไลซิน (endolysin) และโฮลิน (holin) ทำลายผนังเซลล์เชื้อจากภายในเซลล์ โฮลินเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่สะสมในเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ ทำหน้าที่ให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนเอนโดไลซินจะย่อยส่วนเปปติโดไกลแคนบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อ ทำให้เฟจลูกหลานสามารถแตกออกจากเซลล์เชื้อได้ จากนั้นเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจะไปติดเชื้อและทำลายเชื้อที่อยู่ใกล้เคียง การผลิตเฟจลูกหลานจำนวนมากของไลติกเฟจเป็นข้อได้เปรียบเมื่อนำเฟจมาใช้ในการควบคุมเชื้อ อย่างไรก็ตาม ไลติกเฟจที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อที่แคบ สามารถแก้ไขได้โดยใช้เฟจแบบผสมเพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อที่กว้างขึ้น

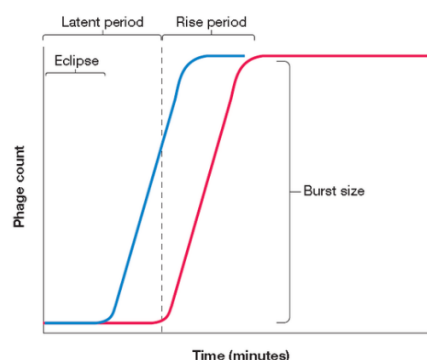
#### 4.2.2 วงชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic cycle)

ไลโซเจนิคเฟจ (lysogenic phage) หรือ เทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) คือ เฟจที่ไม่ทำลายเชื้อในทันที แต่จะแทรกดีเอ็นเอของเฟจเข้ากับโครโมโซมของเชื้อ โดยจะเรียกดีเอ็นเอของเฟจที่แทรกเข้าไปว่า โปรเฟจ (prophage) และเรียกเชื้อที่มีโปรเฟจแทรกอยู่ว่าไลโซเจน (lysogen) เมื่อโปรเฟจเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมของเชื้อแล้ว เฟจจะมีการเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับ การเพิ่มจำนวนของโครโมโซมเชื้อ วงชีวิตแบบไลโซเจนิคสามารถดำเนินต่อไปได้เรื่อยๆ จนกระทั่งเชื้อจะได้รับความเครียด สภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย หรือดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย (DNA damage)<sup>(53)</sup> โปรเฟจจะหลุดออกและเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติก ทั้งนี้การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติกอาจแตกต่างกันไปตามเฟจแต่ละชนิด

#### 4.3 กราฟการเจริญของเฟจ (one-step growth curve)

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์กับเฟจทำได้โดยการศึกษากราฟการเจริญของเฟจ โดยผสมอัตราส่วนของเฟจกับเชื้อ (multiplicity of infection) ที่เหมาะสม และให้เวลาเฟจในการเข้าเกาะเชื้อ จากนั้นเจือจางตัวอย่างเพื่อป้องกันการเข้าเกาะของเฟจอิสระและเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ นำมาตรวจสอบปริมาณเฟจจากการเกิดพลาคว (plaque) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาสร้างกราฟการเจริญของเฟจ (ภาพประกอบ 4)





ภาพประกอบ 4 กราฟการเจริญของเฟจ<sup>(54)</sup>

โดยระยะเวลาช่วงแรกตั้งแต่เฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาที่เฟจทำให้เซลล์เชื้อตัวแรกเกิดการแตกและปล่อยเฟจลูกหลานออกมา เรียกว่า ระยะ latent period ระยะนี้จำนวนพลาคจะคงที่ จากนั้นเฟจตัวอื่น ๆ จะทำให้เซลล์เชื้อแตกจะปลดปล่อยเฟจลูกหลานออกมาอย่างต่อเนื่อง จำนวนพลาคจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จะเรียกระยะนี้ว่า rise period และอัตราส่วนของจำนวนเฟจที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์เชื้อในช่วงสุดท้ายของ rise period ต่อจำนวนเฟจเริ่มต้นจะทำให้ทราบขนาดของ burst size หรือจำนวนเฟจลูกหลานที่ปลดปล่อยออกมาต่อการติดเชื้อ 1 ครั้งของเฟจ

#### 4.4 ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อเฟจ

เนื่องจากเฟจพบอยู่มากมายและหลากหลายในธรรมชาติ จึงง่ายต่อการคัดแยกเพื่อหาเฟจชนิดใหม่สำหรับการนำเฟจไปประยุกต์ใช้เป็น phage therapy จึงจำเป็นต้องศึกษาความเสถียรของเฟจก่อนนำไปใช้ โดยเฉพาะความเสถียรของเฟจต่ออุณหภูมิและ pH มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเฟจ ด้วยเหตุนี้ทั้งสองปัจจัยจึงเป็นตัวกำหนดช่วงการใช้งานของเฟจเมื่อนำไปประยุกต์ใช้<sup>(55)</sup> โดยทั่วไปแล้วการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีอุณหภูมิและ pH อยู่ในระดับกลาง<sup>(56)</sup> มีงานวิจัยหลายงานรายงานว่าความเสถียรต่ออุณหภูมิและ pH เป็นคุณสมบัติที่จำเพาะของเฟจแต่ละชนิด การศึกษาเกี่ยวกับไลติกเฟจมักจะแสดงให้เห็นว่า pH 6-8 เหมาะสมที่สุดสำหรับเฟจและโปรตีนส่วนใหญ่ ในขณะที่ค่า pH ที่น้อยกว่า 5 และมากกว่า 10 เฟจจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า และการศึกษาความเสถียรของเฟจต่ออุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่สูงอาจทำให้แคปซิดซึ่งเป็นโปรตีนของเฟจเสื่อมสภาพได้ นอกจากนี้ อุณหภูมิยังเป็นตัวกำหนดความมีชีวิตรอด การเก็บรักษา และการเพิ่มจำนวนของเฟจ<sup>(55)</sup>

#### 4.5 การศึกษาจีโนมของเฟจ

การศึกษาศาสตร์พันธุกรรมของเฟจที่ผ่านมาจะนิยมศึกษาโดยใช้วิธีการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการศึกษาศาสตร์พันธุกรรมเบื้องต้นของเฟจ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจโดย Whole genome sequencing (WGS) ซึ่งเป็นการอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ที่สมบูรณ์ได้ในครั้งเดียว โดยจะอาศัยเทคโนโลยี Next generation sequencing (NGS) ที่มีความละเอียดและให้ข้อมูลมากกว่าวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากสามารถอ่านลำดับ DNA ครอบคลุมทั้งจีโนม โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้มานั้นจะนำไปคัดเลือกเฟจที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็น phage therapy โดยจะต้องไม่พบยีนต่าง ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่วงจรชีวิตไลโซเจนิค (ยีน integrase ยีน excisionase และยีน CI repressor) ยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ และยีนก่อให้เกิดความรุนแรง<sup>(57)</sup> แสดงดังตาราง 3

ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจที่จำเพาะกับเชื้อ *Aeromonas* spp. มีดังนี้

Wang และคณะ (2021) ได้ทำการคัดแยกเฟจ Ahp2 และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดพบว่า เฟจ Ahp2 มีขนาด 47,331 bp ไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ การก่อโรค และการดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้พบว่าเฟจ Ahp2 มียีน integrase อย่างไรก็ตาม ไม่พบยีนอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเข้าสู่วงจรไลโซเจนิคของเฟจ จึงสรุปได้ว่า เฟจ Ahp2 เป็นไลติคเฟจ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น phage therapy ได้<sup>(58)</sup>

Pallavi และคณะ (2021) ได้ทำการคัดแยกเฟจ vB-AhyM-AP1 และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมด พบว่า เฟจ vB-AhyM-AP1 เป็นเฟจจัมโบ้ (jumbo phage) เนื่องจากมีขนาดจีโนมใหญ่ถึง 114,901 bp โดยส่วนใหญ่แล้วยีนที่พบจะสอดคล้องกับโปรตีนโครงสร้าง (tail fiber, major capsid และ phage protein), DNA ligases (repairing new DNA) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจำลองแบบของไวรัส มีการรายงานว่าเฟจจัมโบ้สามารถระบุได้ว่าเป็นไลติคเฟจ เนื่องจากเฟจชนิดนี้จะไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่วงจรไลโซเจนิค และด้วยเหตุนี้จึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับนำเฟจไปประยุกต์ใช้เป็น phage therapy<sup>(59)</sup>

Cheng และคณะ (2021) ได้ทำการคัดแยกเฟจ AhyVDH1 และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมด พบว่า เฟจ AhyVDH1 มีขนาด 39,175 bp ไม่พบยีน integrase ยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ การก่อโรค และการดื้อยาปฏิชีวนะ จึงสรุปได้ว่าเป็นไลติคเฟจที่สามารถไปประยุกต์ใช้เป็น phage therapy ในการทำลายเชื้อ *A. hydrophila*<sup>(60)</sup>

Dien และคณะ (2021) ได้ทำการตัดแยกเฟจ pAh6.2TG และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมด พบว่า เฟจ pAh6.2TG มีขนาด 51,780 bp ประกอบไปด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างและ DNA packaging ของเฟจ (major capsid protein, baseplate protein, tail fiber protein และ terminase subunit) ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของ DNA และการจำลองตัวเองของเฟจ (RNA polymerase, DNA polymerase, DNA helicase, 5'-3' exonuclease, DNA ligase, และ Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายไฮสตร์ (cell wall hydrolase)<sup>(61)</sup>

จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจที่จำเพาะกับเชื้อ *Aeromonas* spp. ทำให้สรุปได้ว่า การคัดเลือกเฟจที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็น phage therapy จะต้องไม่พบยีนต่าง ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่วงจรชีวิตไลโซเจนิค (ยีน integrase ยีน excisionase และยีน CI repressor) ยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ และยีนก่อให้เกิดความรุนแรง แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ตัวอย่างของยีนที่พบในเฟจสามารถก่อให้เกิดความรุนแรงในไฮสตร์

Protein	Gene	Phage	Bacterial host
Extracellular toxins			
Diphtheria toxin	<i>tox</i>	β -Phage	<i>C. diphtheriae</i>
Neurotoxin	<i>C1</i>	Phage C1	<i>C. botulinum</i>
Shiga toxins	<i>stx1, stx2</i>	H-19B	<i>E. coli</i>
Enterohaemolysin	<i>hly2</i>	ΦFC3208	<i>E. coli</i>
Cytotoxin	<i>ctx</i>	ΦCTX	<i>P. aeruginosa</i>
Enterotoxin	<i>see, sel</i>	NA	<i>S. aureus</i>
Enterotoxin P	<i>sep</i>	ΦN315	<i>S. aureus</i>
Enterotoxin A	<i>entA</i>	Φ13	<i>S. aureus</i>
Enterotoxin A	<i>sea</i>	ΦMu50A	<i>S. aureus</i>
Exfoliative toxin A	<i>eta</i>	ΦETA	<i>S. aureus</i>
Toxin type A	<i>speA</i>	T12	<i>S. pyogenes</i>
Toxin type C	<i>speC</i>	CS112	<i>S. pyogenes</i>

ตาราง 3 (ต่อ)

Protein	Gene	Phage	Bacterial host
Cholera toxin	<i>ctxAB</i>	CTXΦ	<i>V. cholerae</i>
Leukocidin	<i>pvl</i>	fPVL	<i>S. aureus</i>

Superantigens	<i>speA1, speA3, speC, speI, speH, speM, speL, speK, ssa</i>	8232.1	<i>S. pyogenes</i>
Cytolethal distending toxin	<i>cdt</i>	Unnamed	<i>E. coli</i>
<b>Proteins altering antigenicity</b>			
Membrane proteins	Mu-like	Pnm1	<i>N. meningitidis</i>
Glucosylation	<i>rfb</i>	ε <sup>34</sup>	<i>S. enterica</i>
Glucosylation	<i>gtr</i>	P22	<i>S. enterica</i>
O-antigen acetylase	<i>oac</i>	Sf6	<i>S. flexneri</i>
Glucosyl transferase	<i>gtrII</i>	SfII, SfV, SfX	<i>S. flexneri</i>
<b>Effector proteins involved in invasion</b>			
Type III effector	<i>sopE</i>	SopEΦ	<i>S. enterica</i>
Type III effector	<i>ssel (gtgB)</i>	GIFSY-2	<i>S. enterica</i>
Type III effector	<i>sspH1</i>	GIFSY-3	<i>S. enterica</i>
<b>Enzyme</b>			
Superoxide dismutase	<i>sodC</i>	Sp4, 10	<i>E. coli</i> O157
Superoxide dismutase	<i>sodC-I</i>	GIFSY-2	<i>S. enterica</i>
Superoxide dismutase	<i>sodC-III</i>	Fels-1	<i>S. enterica</i>
Neuraminidase	<i>nanH</i>	Fels-1	<i>S. enterica</i>
Hyaluronidase	<i>hyIP</i>	H4489A	<i>S. pyogenes</i>
Leukocidin	<i>pvl</i>	ΦPVL	<i>S. aureus</i>
Staphylokinase	<i>sak</i>	Φ13	<i>S. aureus</i>
Phospholipase	<i>sla</i>	315.4	<i>S. pyogenes</i>
DNase/streptodornase	<i>sdn, sda</i>	315.6, 8232.5	<i>S. pyogenes</i>
<b>Serum resistance</b>			
Outer membrane protein	<i>bor</i>	λ	<i>E. coli</i>
Outer membrane protein	<i>eib</i>	λ-like	<i>E. coli</i>
<b>Adhesions for bacterial host attachment</b>			
Vir	<i>vir</i>	MAV1	<i>M. arthritis</i>
Phage coat proteins	<i>pblA, pblB</i>	SM1	<i>S. mitis</i>
<b>Others</b>			
Mitogenic factors	<i>mf2, mf3, mf4</i>	370.1, 370.3, 315.3	<i>S. pyogenes</i>
Mitogenic factors	<i>toxA</i>	Unnamed	<i>P. multocida</i>
Mitogenic factors	Unnamed	phisc 1	<i>S. canis</i>
Virulence	<i>gtgE</i>	GIFSY-2	<i>S. enterica</i>
Antivirulence	<i>gnvA</i>	GIFSY-2, Fels-1	<i>S. enterica</i>

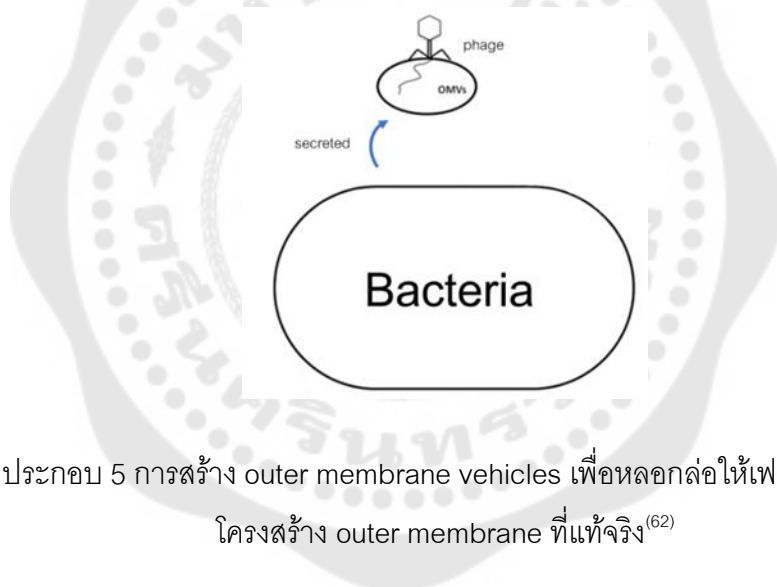
#### 4.6 กลไกการติดของเชื้อต่อเพจ

ในธรรมชาติ เชื้อจะถูกเพจโจมตีอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเชื้อจึงต้องพัฒนากลไกต่อต้านเพจเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียพันธุ์ เชื้อได้พัฒนากลไกที่หลากหลายเพื่อป้องกันตัวเองจากเพจในขณะเดียวกัน เพจก็มีการพัฒนากลไกเพื่อตอบโต้กับเชื้อที่ติดต่อเพจ ดังนั้นทั้งเชื้อและเพจจึงมี

วิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) เพื่อให้รอดชีวิต การศึกษากลไกของเชื้อที่ต่อสู้กับเชื้อที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา โดยกลไกการต่อต้านเฟจของเชื้อ<sup>(62)</sup> มีดังนี้

#### 4.6.1. การสร้าง outer membrane vehicles เพื่อหลอกล่อให้เฟจเข้าเกาะ แทนโครงสร้าง outer membrane ที่แท้จริง (outer membrane vehicles as an anti-phage mechanism)

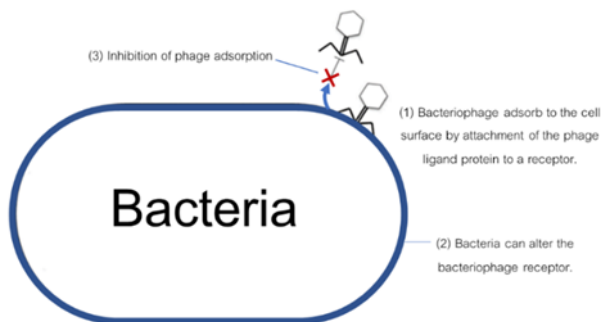
เชื้อแกรมลบบางชนิดสามารถสร้าง outer membrane vehicles (OMVs) ขึ้นในระหว่างการเจริญเพื่อใช้ส่งสัญญาณของเซลล์และช่วยในการรวมกลุ่มกันในไบโอฟิล์ม ส่วนของ OMVs ประกอบด้วย outer membrane lipid, outer membrane protein และ periplasmic components เนื่องจาก OMVs มีโครงสร้างคล้ายกับ outer membrane ของเชื้อ เชื้อจึงใช้ OMVs เป็นตัวหลอกล่อให้เฟจเข้ามาเกาะ แทนที่จะเกาะกับ outer membrane ของเชื้อ (ภาพประกอบ 5) โครงสร้าง OMVs นี้เป็นกลไกด่านแรกในการป้องกันเชื้อจากการโจมตีของเฟจ



ภาพประกอบ 5 การสร้าง outer membrane vehicles เพื่อหลอกล่อให้เฟจเข้าเกาะแทน โครงสร้าง outer membrane ที่แท้จริง<sup>(62)</sup>

#### 4.6.2. การยับยั้งการเข้าเกาะของเฟจ (inhibition of phage adsorption)

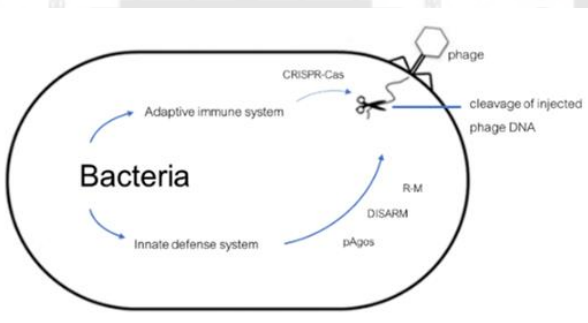
เชื้อสามารถป้องกันการติดเชื้อจากเฟจ โดยการเปลี่ยนแปลง receptor บนผิวเซลล์ เพื่อป้องกันการเข้าเกาะของเฟจที่มีความจำเพาะต่อบริเวณเหล่านี้ (ภาพประกอบ 6) อย่างไรก็ตาม เฟจสามารถเปลี่ยนแปลง receptor ในการเข้าเกาะได้เช่นกัน โดยการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ที่บริเวณ receptor binding proteins (RBPs) ของเฟจ ทำให้เฟจสามารถจับกับบริเวณ receptor ใหม่ จึงเข้าเกาะเชื้อที่ต่อสู้กับเฟจได้ หรือเชื้อที่ต่อสู้กับเฟจอาจสร้าง แคปซูลหรือผนังเซลล์ให้หนามากขึ้นเพื่อป้องกันการเข้าเกาะของเฟจ



ภาพประกอบ 6 การยับยั้งการเข้าเกาะของเฟจ(62)

4.6.3. การป้องกันการปล่อยดีเอ็นเอของเฟจเข้าสู่เซลล์ (blocking phage DNA injection)

ระบบ Superinfection exclusions (Sies) สามารถยับยั้งการปล่อยจีโนมของเฟจเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ (ภาพประกอบ 7) ในระบบนี้ เชื้อจะผลิตโปรตีนเข้าไปขัดขวางการส่งผ่านดีเอ็นเอของเฟจเข้าไปในโฮสต์ โดยส่วนใหญ่โปรตีนเหล่านี้จะถูกสร้างจากยีนของโปรเฟจที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของโฮสต์

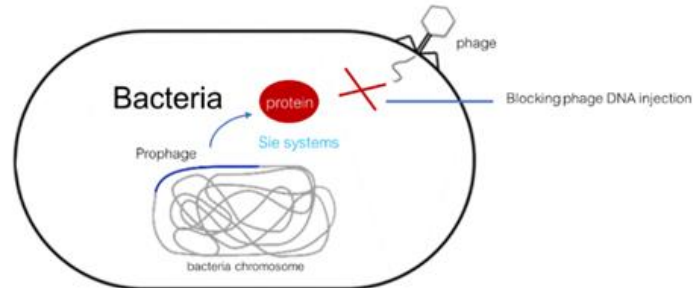


ภาพประกอบ 7 การป้องกันการปล่อยดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของเฟจ(62)

4.6.4. การตัดดีเอ็นเอของเฟจที่เข้าไปในเซลล์ (cleavage of injected phage DNA)

เชื้ออาจพัฒนากลไกในการต่อสู้กับเฟจโดยการตัดดีเอ็นเอของเฟจที่เข้าไปในเซลล์ (ภาพประกอบ 8) ดีเอ็นเอของเฟจที่เข้าไปในไซโตพลาสซึมสามารถถูกตัดได้โดยกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจงของโฮสต์ (innate defense system) ได้แก่ ระบบ Restriction-modification (R-M) ระบบ Defense island system associated with restriction modification (DISARM) และโปรตีน Prokaryote argonaute (pAgos) หรือกลไกการป้องกัน

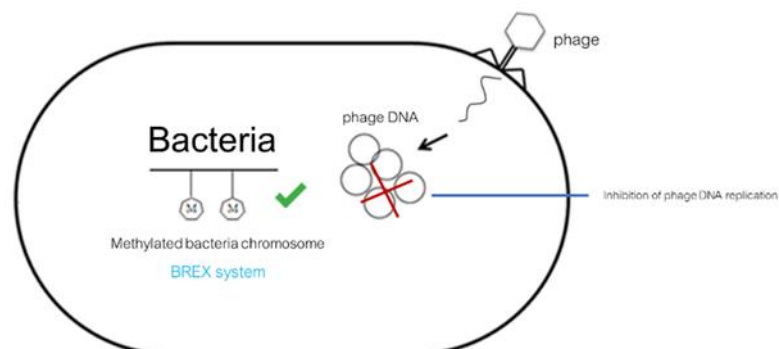
สิ่งแปลกปลอมแบบจำเพาะเจาะจงของโฮสต์ (adaptive immune system) ได้แก่ ระบบ Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-Cas เป็นต้น



ภาพประกอบ 8 การตัดดีเอ็นเอของเฟจที่เข้าไปในเซลล์(62)

#### 4.6.5. การยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ (inhibition of phage DNA replication)

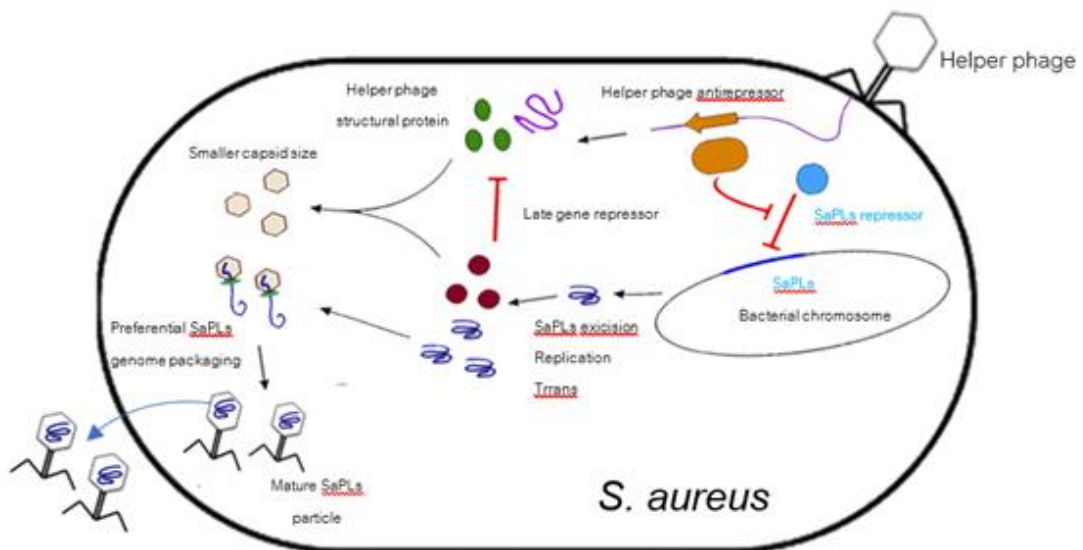
เชื้อที่ต่อสู้กับเฟจสามารถพัฒนากลไกการยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ (ภาพประกอบ 9) โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบระบบ Bacteriophage exclusion (BREX) ซึ่งเป็นระบบที่ยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ ระบบ BREX นี้ เฟจจะเข้าสู่เซลล์แต่ไม่สามารถจำลองดีเอ็นเอของเฟจได้ โดยเชื้อจะมีการเติมหมู่ methyl บน non-palindromic TAGGAG motifs ในจีโนม ซึ่งช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับเซลล์เชื้อ (self-nonself discrimination) ออกจากกันได้ ในระบบ BREX นี้ ดีเอ็นเอของเฟจจะไม่ถูกตัด ซึ่งแตกต่างจากระบบ R-M, ระบบ DISARM และโปรตีน pAgos ที่ดีเอ็นเอของเฟจจะถูกตัดก่อนการจำลองดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม เฟจบางตัวสามารถพัฒนากลไกการหลบหนีจากระบบ BREX ได้



ภาพประกอบ 9 การยับยั้งการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ(62)

#### 4.6.6. การบดบังการประกอบตัวของเฟจ (interference with phage assembly)

โครโมโซมของเชื้อมีบริเวณที่เรียกว่า Phage inducible chromosomal island (PICI) ซึ่งมีความสามารถในการบดบังการประกอบตัวของอนุภาคเฟจให้เป็นอนุภาคเฟจใหม่ที่สมบูรณ์ (ภาพประกอบ 10) จากการศึกษาบริเวณ PICIs ของเชื้อ *S. aureus* (*S. aureus* pathogenicity islands; SaPIs) ซึ่งเป็นบริเวณที่มียีนที่ส่งเสริมความรุนแรงของเชื้อ เมื่อเชื้อ *S. aureus* ถูกติดเชื้อโดยเฟจ บริเวณ SaPIs จะหลุดออกจากโครโมโซมของ *S. aureus* จากนั้นจะทำการจำลองดีเอ็นเอ และบรรจุบริเวณ SaPIs เข้าไปแทนที่ดีเอ็นเอของเฟจในเฟจลูกที่ประกอบตัวแล้ว (mature phage) ต่อมาเซลล์เชื้อที่ติดเชื้อจะตาย และปลดปล่อยอนุภาคเฟจที่มีเฉพาะดีเอ็นเอในส่วนของ SaPI ไปยังเซลล์เชื้อข้างเคียงแทนที่จะปลดปล่อยอนุภาคเฟจที่สมบูรณ์ เป็นผลให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเฟจในที่สุด

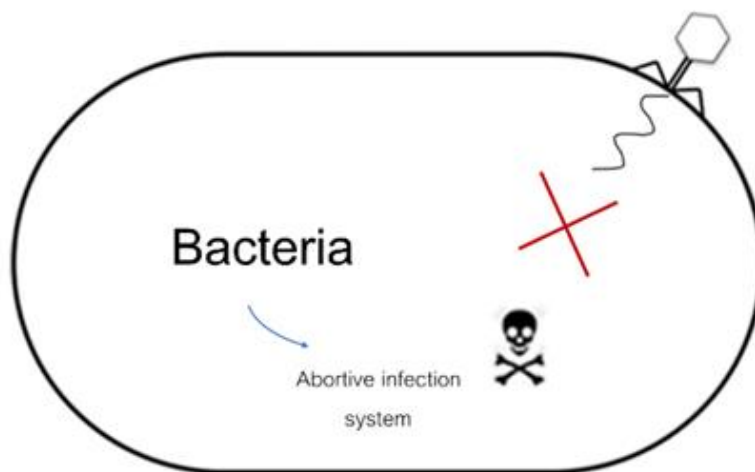


ภาพประกอบ 10 การบดบังการประกอบตัวของเฟจ (62)

#### 4.6.7. การติดเชื้อที่ไม่มีการปล่อยลูกหลาน (abortive infection)

ระบบ Abortive infection (Abi) เป็นกลไกการต่อต้านการติดเชื้อด้วยเฟจของเชื้ออีกประเภทหนึ่ง โดยเฟจจะไม่สามารถปล่อยลูกหลานออกมาได้ เนื่องจากเชื้อที่ติดด้วยเฟจจะทำลายตัวเอง (ภาพประกอบ 11) ซึ่งทำให้ปกป้องเชื้อที่อยู่รอบข้างจากการติดเชื้อด้วยเฟจได้ ระบบ Abi มีกลไกที่หลากหลายและสามารถขัดขวางวงจรชีวิตของเฟจในขั้นตอนต่าง ๆ ได้





ภาพประกอบ 11 การติดเชื้อที่ไม่มีการปล่อยลูกหลาน<sup>(62)</sup>

#### 4.7 การใช้เฟจในการควบคุมเชื้อก่อโรคในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ความสามารถของเฟจในการทำลายเชื้ออย่างจำเพาะนั้น ถือเป็นทางเลือกหนึ่ง ที่นำมาใช้เฟจในการทำลายเชื้อแทนยาปฏิชีวนะ การใช้ไลติคเฟจหรือผลิตภัณฑ์จากเฟจในการควบคุมเชื้อก่อโรค เรียกว่า phage therapy<sup>(63)</sup> ซึ่งการคัดเลือกเฟจที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็น phage therapy จะต้องมีคุณสมบัติต่าง ๆ<sup>(64)</sup> ดังนี้

1. เป็นเฟจที่มีวงจรชีวิตแบบไลติค
2. ติดเชื้อก่อโรคได้กว้าง แต่ไม่ทำลายเชื้อที่เป็นประโยชน์
3. ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
4. มีความเสถียรต่อสภาวะต่าง ๆ เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในสภาวะจริง
5. มีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์ม
6. เพิ่มจำนวนได้ง่าย
7. เฟจต้องปราศจากยีนที่ทำให้เกิดความรุนแรง เช่น ยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ยีนก่อโรค และยีน integrase

จากคุณสมบัติที่กล่าวข้างต้น การใช้เฟจในการทำ phage therapy ยังคงมีข้อจำกัด อาทิเช่น การคัดแยกเฟจที่ปราศจากยีนที่ทำให้เกิดความรุนแรงทำได้ยาก เฟจที่มียีนดังกล่าวอาจมีส่วนช่วยในการพัฒนาเชื้อที่ดื้อยารวมทั้งอาจทำให้มีความสามารถในการก่อโรคได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังเกิดเชื้อที่ดื้อต่อเฟจ รวมทั้งเฟจยังอาจถูกยับยั้งโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์<sup>(65)</sup>

## 5. การใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะควบคุมเชื้อก่อโรค

ในการทำ phage therapy การใช้เฟจแบบเดี่ยวอาจไม่เพียงพอต่อทำลายเชื้อ เนื่องจากเฟจส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับโฮสต์สูง ดังนั้นจึงยากที่จะคัดแยกเฟจตัวเดียวที่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อได้กว้าง การใช้เฟจผสมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เข้ามาแก้ปัญหาเฟจที่ติดเชื้อได้แคบของเฟจแบบเดี่ยว อย่างไรก็ตามมีรายงาน เชื้อสายพันธุ์กลายกลับมาเจริญใหม่ภายหลังจากการทำ phage therapy ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม เชื้อสายพันธุ์กลายที่ติดต่อเฟจจะมีการเปลี่ยนแปลง receptor เป็นหลักซึ่ง receptor เหล่านี้มักเป็นโครงสร้างของเซลล์ที่มีความสำคัญต่อเชื้อ เช่น teichoic acid และ lipopolysaccharide จึงเกิดการติดต่อเฟจระยะหนึ่ง แต่การเปลี่ยนแปลง receptor เหล่านี้แล้วทำให้เชื้อสายพันธุ์กลายไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้จึงกลับมาสร้างโครงสร้างที่สำคัญเหล่านี้อีกครั้ง ด้วยสาเหตุนี้ทำให้สายพันธุ์กลายส่วนใหญ่กลับไปเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเฟจอีกครั้ง ดังนั้นหากมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่ำเข้ามาทำลายเชื้อในระยะที่ติดต่อเฟจ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยในการทำลายเชื้อ ในต่างประเทศการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* ที่ติดต่อยาหลายชนิด โดยมีรายงานของ Chandrarathna และคณะ (2020) ศึกษาการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อ *A. hydrophila* ที่ติดต่อยาหลายชนิด โดยคณะผู้วิจัยได้คัดแยกเฟจและให้ชื่อว่า AHP-1 จากเนื้อเยื่อของปลาแคร์ป จากผลการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ของเฟจในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า เฟจ AHP-1 ที่ค่า MOI เท่ากับ 10 แสดงการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ได้สูงกว่าการใช้ยาคลอแรมเฟนิคอล 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการใช้เฟจร่วมกับยาคลอแรมเฟนิคอลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีที่สุด<sup>(66)</sup> อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะ และเห็นความสำคัญของการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อ *A. dhakensis* ประกอบกับเป็นที่ทราบกันดีว่าในประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายจึงทำให้การรักษากการติดเชื้อชนิดนี้ต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้ยาเพิ่มขึ้น และส่งผลให้เชื้อดื้อยาหลายชนิด ดังนั้นแนวทางการใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อนี้จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เชื้อดื้อยาทุกประเภทในห้องตลาด

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- กระบอกฉีดยา (Syringe) (Nipro, Thailand)
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Microscope) (Olympus Optical Co., Ltd, Japan)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) (Jeol, Japan)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Chemoscience, Thailand)
- เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer) (Scientific Industries, USA)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision balance 2 digits) (Denver Instrument, USA)
- เครื่องถ่ายภาพจากเจล Geldoc XR+ (Gel documentation) (Bio-Rad, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงขนาดเล็ก (Spindown) (DAIHAN Scientific, Korea)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Kendro, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (DAIHAN Scientific, Korea)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermocycler) (Scilogex, USA)
- เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) (Mupid, Japan)
- เครื่องวัดความทึบแสง (OD Monitor) (TAITEC, Japan)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Denver Instrument, USA)
- ตู้ชีวนิรภัยระดับ 2 (Biosafety cabinet: BSC Class II) (Microflow, UK)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer) (Sanden intercool, Thailand)
- ตู้อบแบบพัดลม (Incubator with fan) (Gallenkamp, UK)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot-air sterilizing oven) (Fisher Scientific, USA)
- เตาให้ความร้อนแบบหลุม (Dry bath incubator) (Major Science, USA)
- ไมโครเพลท 96 หลุม (96-Well Microplates) (Thermo Fisher Scientific, Denmark)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (DAIHAN Scientific, Korea)

### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

*Aeromonas* Isolation Medium (Himedia, India)  
 Agar (Himedia, India)  
 Agarose (Invitrogen, New Zealand)  
 Amoxicillin (Sigma, Singapore)  
 Ampicillin (T.P. DRUG LABORATORIES, Thailand)  
 Beef extract (Himedia, India)  
 Chloroform (RCI Labscan Limited, Thailand)  
 Ethanol (Merck, USA)  
 Ethidium bromide (Sigma Chemical, USA)  
 GelRed Loading Buffer (Biosharp, China)  
 Glycerol (Merck, USA)  
 Isopropanol (Merck, USA)  
 Mueller Hinton agar (Himedia, India)  
 Peptone (Himedia, India)  
 Phenol (Amresco, USA)  
 Polyethylene glycol 8000 (Sigma Chemical, USA)  
 Sodium chloride (Thermo Fisher Scientific, USA)  
 TE buffer (Bio Basic Inc., Canada)  
 Tryptic Soy Broth (Himedia, India)  
 Yeast extract (Himedia, India)

### อุปกรณ์เพิ่มเติม

Cellulose acetate filter, pore size 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Germany)

### ชุดเครื่องมือทางการค้า

2X TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Germany)  
 AccuPrep<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, South Korea)  
 Liofilchem<sup>®</sup> MIC Test Strips (Liofilchem, Italy)  
 NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany)

## Molecular marker

100 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

DNA ladder mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA)

## เชื้อสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ทดสอบ

*A. caviae* DMST 25498

*A. hydrophila* DMST 1406

*A. hydrophila* DMST 25194

*A. hydrophila* DMST 2798

*A. hydrophila* TISTR 1321

*A. sobria* DMST 1244

*A. sobria* DMST 25185

*A. trota* ATCC 49657

*A. veronii* ATCC 35624

## วิธีดำเนินการทดลอง

### 1. การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อ *A. dhakensis*

เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ คลองแสนแสบ คลองเปรมประชากร แม่น้ำเจ้าพระยา และจากตัวอย่างปลาที่วางขายในตลาดคลองเตย ตลาดห้วยขวาง และซูเปอร์มาร์เก็ต มาทำการคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. โดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางเป็นลำดับที่ละสิบเท่า (ten-fold serial dilution) ด้วยอาหาร Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก) จากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ มา spread บนอาหาร *Aeromonas* Isolation Medium (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมแอมพิซิลลิน (ampicillin) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารดังกล่าวไปแยกให้บริสุทธิ์ และนำไปทดสอบว่าเป็น *Aeromonas* spp. หรือไม่ในขั้นตอนต่อไป

#### 1.1 การจัดจำแนกเชื้อ *A. dhakensis*

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารในขั้นตอน 1 มาตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อ โดยเชื้อ *Aeromonas* spp. จะติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น จากนั้นนำมาจัดจำแนกเชื้อต่อด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี โดยลักษณะทางชีวเคมีที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ การทดสอบปฏิกิริยา

IMViC การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การทดสอบการผลิตเอนไซม์ deoxyribonuclease การทดสอบการผลิตเอนไซม์ gelatinase การทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase การทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase และการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพมีหรือไม่มีออกซิเจน การทดสอบการใช้น้ำตาลแล็กโทส (lactose) ซูโครส (sucrose) และแมนนิทอล (mannitol) โดยเพิ่มการทดสอบการใช้น้ำตาลแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) และ ซาลิซิน (salicin) เพื่อแยก *A. dhakensis* ออกจาก *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *A. hydrophila* subsp. *ranae*<sup>(7, 29)</sup> ทำการจำแนกเชื้อตามวิธีมาตรฐานในคู่มือ Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>(25)</sup> โดยเชื้อที่จัดเป็นเชื้อ *A. dhakensis* จะให้ผลแสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *A. dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *A. hydrophila* subsp. *ranae*<sup>(14)</sup>

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>A. dhakensis</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>
การทดสอบปฏิกิริยา IMViC			
- การทดสอบ indole	+	+	+
- การทดสอบ methyl red	+	ND	ND
- การทดสอบ Voges-Proskauer	+	+	-
- การทดสอบ citrate	+	ND	ND
การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	β	ND	ND
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ deoxyribonuclease	+	ND	ND
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ gelatinase	+	ND	ND
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase	+	ND	ND
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase	+	ND	ND
การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพมีหรือไม่มีออกซิเจน	F	ND	ND
การใช้น้ำตาลแล็กโทส (lactose)	-	ND	ND
การใช้น้ำตาลซูโครส (sucrose)	+	ND	ND
การใช้น้ำตาลแอล-อะราบิโนส (L-arabinose)	-	+	-
การใช้น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol)	+	ND	ND
การใช้น้ำตาลซาลิซิน (salicin)	+	-	-

## 1.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *A. dhakensis*

นำเชื้อที่คาดว่า เป็น *A. dhakensis* มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform method) ตามวิธีของ Sambrook และคณะ<sup>(67)</sup> ซึ่งข้อมูลสารเคมีที่การสกัดจีโนมของเฟจจะแสดงในภาคผนวก ข โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม lysozyme 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 120 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส บ่มจนกระทั่งเป็นสารละลายใส จึงเติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ให้เท่ากับสารละลายที่มีอยู่เดิม ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปกลับมาเบา ๆ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิดเปิดตู้ส่วนใสชั้นบน (aqueous phase) ใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิม และทำซ้ำตามขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งไม่เห็นชั้นของโปรตีน (interphase) จึงเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิม ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกตกตะกอนด้วยสารละลาย sodium acetate ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 โมลาร์ และเติม isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิดเปิดตู้ส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเติม ethanol ร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่แช่เย็น ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ระเหย ethanol ออกที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตะกอนดีเอ็นเอของเชื้อถูกละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE นำดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยซังอะกาโรส (agarose) 0.6 กรัม ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (tris-bate-EDTA) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้เจลละลาย แล้วเติมสีย้อมดีเอ็นเอ GelRed™ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เทเจลลงในถาดสำหรับใส่เจล (tray) แล้วเสียบหวีลงบนด้านปลายของแผ่นเจล เจลแข็งตัวแล้วนำมาวางบนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมเจล ปิดเปิดดีเอ็นเอเชื้อที่ได้

จากการสกัดปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับสาร CoralLoad Concentrate (10X) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำมาใส่ลงในเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel-documentation)

### 1.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *A. dhakensis*

นำดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อโดยใช้ universal primers ที่มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer (27F): 5' AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3'

Reverse primer (1492R): 5' TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3'

องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR แสดงดังตาราง 5 ถูกเติมลงในหลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ผสมสารต่าง ๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง PCR thermocycler ทำการระบุโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA (ตาราง 6) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับขั้นตอน 1.2 ซึ่งให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส<sup>(68)</sup>

ตาราง 5 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ universal primers

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2X TopTaq Master Mix	8
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.2
10 μM 27F primer	0.4
10 μM 1492R primer	0.4
ดีเอ็นเอแม่แบบ	4
DNase-free water	7
ปริมาตรรวม	20



ตาราง 6 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ universal primers ด้วยเครื่อง PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. pre-denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	1
2. denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	} 35
3. annealing	47 องศาเซลเซียส	35 วินาที	
4. extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
5. final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1

#### 1.4 การทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ในขั้นตอน 1.3 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (ภาคผนวก ค)

#### 1.5 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้วส่งไปหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ที่บริษัท Apical Scientific ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Chromas version (Technelysium Pty Limited, Australia) และจัดเรียงลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit (Tom Hall, North Carolina State University) แล้วนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: GenBank (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

#### 1.6 การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ

##### *A. dhakensis*

หลังจากจัดเรียงตำแหน่งของลำดับเบสเรียบร้อยแล้ว นำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ *Aeromonas* sp. ที่คัดแยกได้ มาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ตามวิธีของ Dong และคณะ (2017)<sup>(69)</sup> โดยใช้เชื้อ *Aeromonas* สายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) ได้แก่ *A. dhakensis* strain LMG 19562T (AJ508765), *A. caviae* strain ATCC 15467 (X60409), *A. hydrophila* strain ATCC 7966 (NR074841), *A. sobria* strain ATCC 43979 (NR119044), *A. veronii* biovar *veronii* strain ATCC 35624 (X60414), *A. jandaei* strain ATCC 49568

(X60413) และใช้เชื้อสปีชีส์อื่นที่มีการรายงานการระบาดในปลาเช่นเดียวกันเป็น outgroup ได้แก่ *Plesiomonas shigelloides* strain NCIMB 9242 (X60418) นำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ทั้งหมดมาสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining และทดสอบความเชื่อมั่นของ bootstrap เท่ากับ 1,000 รอบ

### 1.7 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* ด้วยวิธี Next generation sequencing

นำเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Sambrook และคณะ<sup>(67)</sup> เช่นเดียวกับขั้นตอน 1.2 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับเบสโดยใช้ BGISEQ 500 ( สถาบัน Beijing Genomics Institute ประเทศจีน) เมื่อได้ข้อมูลลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ (whole genome sequencing) จะนำมาตรวจสอบคุณภาพของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม FASTQC<sup>(70)</sup> และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นเป็นนิวคลีโอไทด์สายยาวโดยใช้โปรแกรม SPAdes 3.12<sup>(71)</sup> จากนั้นค้นหา open reading frames (ORFs) และระบุหน้าที่ของยีนโดยใช้โปรแกรม Prokka<sup>(72)</sup> นอกจากนี้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาวิเคราะห์ตำแหน่งยีนดื้อยาปฏิชีวนะโดยโปรแกรม Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) databases<sup>(73)</sup> ตรวจสอบบริเวณที่มี prophage ด้วยโปรแกรม PHASTER<sup>(74, 75)</sup> ตรวจสอบการปรากฏของ plasmid ด้วยโปรแกรม PlasmidFinder 2.1<sup>(76, 77)</sup> และวิเคราะห์ยีนที่แสดงความสามารถของโรคโดยใช้โปรแกรม Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (VFDB)<sup>(77)</sup> จากนั้นสร้างแผนภาพจีโนมด้วย CG view webserver<sup>(78)</sup>

### 2. การทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* ต่อยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ด้วยวิธี Epsilometer test (E-test)

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด โดยนำเชื้อ *A. dhakensis* AM มาปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ( $0.5 \times 10^8$  CFU/mL) แล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น  $10^5$  CFU/mL จากนั้นใช้ก้านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile cotton swab) มาจุ่มเชื้อ *A. dhakensis* AM แล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวน้ำอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) (ภาคผนวก ก) จากนั้นวางแถบยาต้านจุลชีพ (E-test strip) แต่ละชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ชนิดยา แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration หรือ MIC) ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด แล้วนำผลที่ได้ไปแปลค่าความไวต่อยาตามเกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2020 ด้วยวิธี E-test ดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่าความไวของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดของเชื้อ *A. dhakensis* AM ตามเกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2020 ด้วยวิธี E-test

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นของยา แสดงบน E-test strip (µg/mL)	ระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะ		
		ต้านทาน (Resistant) (µg/mL)	ไวปานกลาง (Intermediate) (µg/mL)	ไว (Sensitive) (µg/mL)
amoxicillin	0.016-256	≤4	8	>8
ampicillin	0.016-256	≤8	16	>32
chloramphenicol	0.016-256	≤8	16	≥32
doxycycline	0.016-256	≤4	8	≥16
erythromycin	0.016-256	≤4	8	≥16
gentamicin	0.016-256	≤4	8	≥16
tetracycline	0.016-256	≤4	8	≥16
trimethoprim-sulfamethoxazole	0.016-256	≤2/38	-	≥4/76

### 3. การคัดแยก ศึกษารูปร่าง และศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. dhakensis*

#### 3.1 การคัดแยกเฟจ

เลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 หรือมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10<sup>8</sup> CFU/mL ปิเปตต์มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดทดลองรูปขมพู (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญอยู่ในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำซึ่งมาจากตลาดคลองเตย คลองแสนแสบ และแม่น้ำเจ้าพระยา เติมน้ำไปปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหรือสารแขวนลอยเฟจ (phage lysate) มากกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บรักษาในขวดสี่ขาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ต่อไปว่ามีเฟจอยู่หรือไม่

### 3.2 การตรวจสอบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น

ปีเปตต์สารแขวนลอยเฟจปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละระดับความเจือจาง และเชื้อ *A. dhakensis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร Nutrient soft agar (ภาคผนวก ก) ที่มีการหลอมเหลวแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) รออาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสหรือพลาไคที่เกิดขึ้น

### 3.3 การหาปริมาณเฟจ

นำสารแขวนลอยเฟจมาเจือจางสลับทำด้วยอาหาร NB จากนั้นทำอาหารวุ้นสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 โดยใช้เชื้อ *A. dhakensis* เป็นโฮสต์ ภายหลังจากการบ่มนำไปตรวจสอบเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น โดยนับจำนวนพลาไคที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานปริมาณเฟจในหน่วย Plaque Forming Unit /mL (PFU/mL) ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาไค (PFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนพลาไค}}{\text{ปริมาตรเฟจที่ใช้ (mL)} \times \text{ที่ระดับความเจือจาง}}$$

### 3.4 การทำเฟจให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกพลาไคเดี่ยว

ใช้ลูป (loop) ที่เผาไฟจนร้อนแดงตัดชิ้นวุ้นตรงบริเวณที่มี 1 พลาไค ใส่ลงในอาหาร NB ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร และเติมเชื้อ *A. dhakensis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บรักษาเฟจในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนนี้จะทำ 3 รอบ เพื่อให้ได้เฟจที่บริสุทธิ์

### 3.5 การเพิ่มจำนวนเฟจ

เพิ่มจำนวนเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 จากนั้นใช้ spatula ขูดชิ้นวุ้นที่มีบริเวณใสลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.6 การศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำสารแขวนลอยเฟจมาผสมกับไฮสตร์แล้วทำให้เกิดพลาคโดยใช้เทคนิคการทำอาหารรูนสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 จากนั้นนำกริด (grid) วางทับบริเวณพลาคเป็นเวลา 5 นาที ทำการย้อมด้วยสารละลาย uranyl acetate ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

### 3.7 การศึกษาความเสถียรของเฟจ

นำเฟจที่แยกได้มาศึกษาความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ โดยความเสถียรต่อ pH จะทำการปรับ pH ให้เป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมเฟจความเข้มข้น  $10^7$  PFU/ml บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เฟจในอาหาร NB ที่ปรับเป็น pH 7 เป็นตัวควบคุม ส่วนความเสถียรต่ออุณหภูมิทำได้โดยบ่มเฟจความเข้มข้น  $10^7$  PFU/ml ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4, 25, 30, 37, 45, 65, 75 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายหลังจากบ่ม 1 ชั่วโมง ทั้ง 2 การทดลอง นำมาตรวจสอบปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารรูนสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาปริมาณเฟจตามขั้นตอน 3.3 จากนั้นค่าที่ได้จากการหาปริมาณเฟจจะนำเสนอด้วยค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way-ANOVA) โดยเลือกใช้สถิติ Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

### 3.8 การตรวจสอบความสามารถในการทำลายเชื้อ *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น

นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้ และเชื้อ *Aeromonas* สายพันธุ์อ้างอิง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมลงในอาหาร Nutrient soft agar ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงบนอาหาร NA รออาหารแข็งตัว จากนั้นหยดเฟจที่แยกได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารที่เทไว้ก่อนหน้านี้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นตรงบริเวณที่หยดเฟจลงไป

### 3.9 การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ (Multiplicity of infection หรือ MOI)

เลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 ปิเปตต์มา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมลงในหลอดเซนติฟิวจ์ก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเฟจ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่มีอัตราส่วนปริมาณของเฟจ ต่อปริมาณของโฮสต์หรือ MOI เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส ไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และนำมาตรวจสอบปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิค การทำอาหารวุ้นสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาปริมาณเฟจตามขั้นตอน 3.3 จากนั้นค่าที่ได้จากการหาปริมาณเฟจจะนำเสนอด้วยค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way-ANOVA โดยเลือกใช้สถิติ Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม คอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS

$$\text{Multiplicity of Infection (MOI) (PFU/CFU)} = \frac{\text{จำนวนของเฟจ (PFU/mL)}}{\text{จำนวนของโฮสต์ (CFU/mL)}}$$

### 3.10 การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ

เลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 ปิเปตต์มา ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเฟจที่มีความเข้มข้น 10<sup>7</sup> PFU/mL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentrifuge (MOI เท่ากับ 0.1) ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน และล้างเฟจอิสระ (free phage) ด้วยอาหาร NB ผ่านกระดาษกรองหลาย ๆ รอบ จากนั้นใช้ forcep ที่ผ่านการฆ่าเชื้อคิบบกระดาษกรองที่มีเซลล์โฮสต์ที่ถูกเข้าติดเชื้อด้วยเฟจแล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ทุก ๆ 5 นาที จนกระทั่งครบ 70 นาที นำมา ตรวจสอบปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาปริมาณเฟจตามขั้นตอน 3.3 จากนั้นค่าที่ได้จากการหาปริมาณเฟจจะนำเสนอด้วย

ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำมาสร้างเป็นกราฟการเจริญของเฟจ (one-step growth curve) เพื่อหาค่า latent period และ burst time จากนั้นคำนวณ burst size ของเฟจ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{Burst size (PFU/mL)} = \frac{\text{ปริมาณเฟจสูงสุด (PFU/mL)}}{\text{ปริมาณเฟจเริ่มต้น (PFU/mL)}}$$

### 3.11 การสกัดจีโนมของเฟจ

การสกัดจีโนมของเฟจจะใช้วิธีสกัดฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform method) ตามวิธีของ Sambrook และคณะ<sup>(67)</sup> ซึ่งข้อมูลสารเคมีที่การสกัดจีโนมของเฟจจะแสดงในภาคผนวก ข ทำการเตรียมเฟจให้มีความเข้มข้นสูงโดยการเพิ่มจำนวนเฟจด้วยเทคนิคการทำอาหารวันสองชั้นตามขั้นตอน 3.2 จำนวน 60 เฟลท จากนั้นใช้ข้อหลอดชั้นที่มีบริเวณใสลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารแขวนลอยเฟจมาเทรวมกันลงในขวดรูปชมพู่เปล่าขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมเอนไซม์ DNase I และ RNase I ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม sodium chloride ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ และ polyethylene glycol (PEG) 8000 ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หมุนขวดชมพู่เบา ๆ จนกระทั่ง sodium chloride และ PEG 8000 ละลาย นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนอนุภาคเฟจมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium chloride ที่มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ ในอัตราส่วนปริมาตรสารแขวนลอยเฟจ 1 ส่วนต่อ sodium chloride 10 ส่วนและสารละลาย sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม เท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีอยู่เดิม ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัด PEG ออก จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลเท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีอยู่เดิม ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 1-3 นาที จนกระทั่งเกิดส่วนใสชั้นบน (aqueous phase) จากนั้นปีเปตต์ส่วนใสไปใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน

1:1) เท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีอยู่เดิมทำเช่นนี้ไปจนกระทั่งมองไม่เห็นชั้นของโปรตีน (interphase) จากนั้นบีบอัดส่วนใสไปใส่หลอดใหม่ และเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24:1) เท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีอยู่เดิม ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกตกตะกอนด้วย สารละลาย sodium acetate 1 โมลาร์ (อัตราส่วน 1:10) และเติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตะกอนดีเอ็นเอของเฟจ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม ethanol ร้อยละ 70 ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นบีบอัดสารละลาย ethanol ออกแล้ว ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตะกอนดีเอ็นเอของเฟจถูกละลายด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ TE จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลิเล็กโทรโฟเรซิส เช่นเดียวกับ ขั้นตอน 1.2 โดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอของเฟจที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน  $\lambda$ /HindIII

### 3.12 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจด้วยวิธี Next generation sequencing

นำเฟจที่บริสุทธิ์มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Sambrook และคณะ<sup>(67)</sup> เช่นเดียวกับ ขั้นตอน 2.11 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปตรวจสอบลำดับเบสโดยใช้ BGISEQ 500 เมื่อได้ ข้อมูลลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจจะนำมาตรวจสอบคุณภาพของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม FASTQC<sup>(70)</sup> และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นเป็นนิวคลีโอไทด์สายยาวโดยใช้โปรแกรม SPAdes 3.12<sup>(71)</sup> จากนั้นค้นหา open reading frames (ORFs) และระบุหน้าที่ของยีนโดยใช้ โปรแกรม Prokka v.1.14<sup>(72)</sup> จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ยืนยันหน้าที่ของยีนอีกครั้งโดยใช้ โปรแกรม BlastP จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่จรรยาวิถีไลโซเจนิค (ยีน integrase ยีน excisionase และยีน CI repressor) ยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ และ ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ จากนั้นสร้างแผนภาพจีโนมด้วย CG view webserver<sup>(78)</sup> นอกจากนี้มี การตรวจสอบเฟจว่าเป็น Virulent หรือไม่โดยใช้โปรแกรม PhageAI (<https://phage.ai/>)<sup>(79)</sup> และ วิเคราะห์ tRNA ด้วยโปรแกรม tRNAscan-SE 2.0<sup>(80)</sup>

## 4. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวในระดับ ห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ เฟจแบบเดี่ยว การทดสอบประกอบไปด้วย การศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment จะนำไป ประยุกต์ใช้ในกรณีที่ใช้เฟจป้องกันเชื้อก่อนที่จะพบการติดเชื้อ และการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment จะนำไปประยุกต์ใช้ในกรณีที่ใช้เฟจทำลายเชื้อเพื่อลดหรือยับยั้งการเพิ่มจำนวน ของเชื้อ โดยแต่ละการทดลองจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ



#### 4.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment

การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ดำเนินการโดยเลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB ปริมาตร 20 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 แล้วปิเปตต์เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเฟจ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่า MOI สุดท้ายเท่ากับ 0.1, 1 และ 10 ซึ่งคำนวณได้จากสูตรตามขั้นตอน 3.9 เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบโดยออกแบบการทดลองดังตาราง 8 ต่อมานำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 rpm และเก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ตรวจสอบปริมาณเฟจโดยใช้เทคนิคการทำอาหารรุ่นสองขั้นตามขั้นตอน 3.2 และรายงานปริมาณเฟจในหน่วย PFU/mL ส่วนของตะกอนเซลล์จะนำมาละลายในอาหาร NB จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างแล้วนำแต่ละระดับการเจือจางมาตรวจสอบปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* โดยนำมา spread บนผิวอาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรายงานปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* ในหน่วย CFU/mL

#### 4.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment

การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ดำเนินการโดยเลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 แล้วปิเปตต์เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมเฟจปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่า MOI สุดท้ายเท่ากับ 0.1, 1 และ 10 ซึ่งคำนวณได้จากสูตรตามขั้นตอน 3.9 จากนั้นทดสอบโดยออกแบบการทดลองดังตาราง 8 แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 rpm และเก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

ตาราง 8 การออกแบบการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว

ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
1. เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB อย่างเดียว (ไม่มีเฟจ)	1. เฟจแบบเดี่ยว + เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB (MOI 0.1)
2. เฟจแบบเดี่ยว ในอาหาร NB (ปริมาณเฟจเท่ากับชุดทดลอง MOI 0.1)	2. เฟจแบบเดี่ยว + เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB (MOI 1)
3. เฟจแบบเดี่ยว ในอาหาร NB (ปริมาณเฟจเท่ากับชุดทดลอง MOI 1)	3. เฟจแบบเดี่ยว + เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB (MOI 10)
4. เฟจแบบเดี่ยว ในอาหาร NB (ปริมาณเฟจเท่ากับชุดทดลอง MOI 10)	

### 5. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* โดยใช้เฟจแบบผสมในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยใช้เฟจแบบเดี่ยวที่วิเคราะห์ได้จากขั้นตอน 4 โดยแบ่งการทดลอง ดังนี้

#### 5.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment

การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ดำเนินการโดยเลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า  $OD_{600}$  เท่ากับ 0.4 แล้วปิเปตต์เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในการทดสอบจะเตรียมเฟจแบบผสม 2 ตัว (ปริมาตรตัวละ 500 ไมโครลิตร) และปิเปตต์เฟจแบบผสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 18 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 rpm เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

#### 5.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment

การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ดำเนินการโดยเลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยที่มีค่า  $OD_{600}$  เท่ากับ 0.4 แล้วปิเปตต์เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในการทดสอบจะเตรียมเฟจแบบผสม 2 ตัว เช่นเดียวกับขั้นตอน 5.2 และเติม

เฟจแบบผสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 rpm และเก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

## 6. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม

### 6.1 การทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* ต่อยา amoxicillin ด้วยวิธี broth microdilution test

การทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* ต่อยา amoxicillin ด้วยวิธี broth microdilution test ดำเนินการทดสอบใน 96-well microtiter plate โดยนำยา amoxicillin ที่มีความเข้มข้น (stock solution) มาทำการเจือจางเป็นลำดับที่ละสองเท่า (two-fold serial dilution) ด้วยอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) (ภาคผนวก ก) โดยแต่ละหลุมจะมีปริมาตร 100 ไมโครลิตร และความเข้มข้นของยาเท่ากับ 256, 128, 64, 32, 16, 8 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อ *A. dhakensis* มาปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ  $10^5$  CFU/mL แล้วเติมลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยกำหนดให้มีหลุม sterile medium (SM) หรือหลุมที่มีเพียงอาหารอย่างเดียว และหลุม control (CT) หรือหลุมที่มีเชื้อเพียงอย่างเดียวเป็นชุดควบคุม จากนั้นปิดฝาและนำ 96-well microtiter plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. dhakensis* หรือค่า MIC โดยดูจากค่าความขุ่นด้วย microplate reader ที่  $OD_{600nm}$

### 6.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* แบบ pre-treatment ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม

การทดสอบแบ่งเป็น การทดสอบการยับยั้งเชื้อเบื้องต้นในระดับ 200 ไมโครลิตร (preliminary test) และการทดสอบการยับยั้งเชื้อในระดับ 20 มิลลิลิตร (challenge tests) โดยออกแบบการทดลองดังตาราง 9

ตาราง 9 การออกแบบการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* โดยใช้ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ใน สัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม

ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
1. เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB อย่างเดียว (ไม่มีเฟจและยา)	เฟจแบบผสม + เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB ในอาหาร NB ผสม ½ MIC
2. เฟจแบบผสม ในอาหาร NB ผสม ½ MIC amoxicillin (ปริมาณเฟจเท่ากับชุดทดลอง Cocktail)	amoxicillin
3. เชื้อ <i>A. dhakensis</i> ในอาหาร NB ผสม ½ MIC amoxicillin (ไม่มีเฟจ)	

### 6.2.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment

จากการทดสอบตามขั้นตอน 6.1 จะได้ค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. dhakensis* นำค่าที่ได้ดำเนินการทดสอบใน 96-well microtiter plate โดยออกแบบการทดลองดังตาราง 9 ในการทดสอบจะเตรียมเฟจแบบผสม 2 ตัว (ปริมาตรตัวละ 50 ไมโครลิตร) เติมหลงในหลุม ในขั้นการเตรียมเชื้อจะทำการโดยเลี้ยงเชื้อ *A. dhakensis* ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ *A. dhakensis* มาปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard และปรับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $10^6$  CFU/mL (เมื่อผสมกับอาหารและเฟจจะได้ปริมาณของเชื้อประมาณ  $10^5$  CFU/mL) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ก่อนจะนำมาเติมายา amoxicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ ½ MIC amoxicillin จากนั้นปิดฝาและนำ 96-well microtiter plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

### 6.2.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment

ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 6.2.1 จากนั้นเติมเชื้อ *A. dhakensis* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมเฟจแบบผสม 2 ตัว ลงในหลุม ก่อนจะนำมาเติมายา amoxicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ ½ MIC amoxicillin ปิดฝาและนำ 96-well microtiter plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

### 6.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC amoxicillin ร่วมกับเฟจแบบผสม

#### 6.3.1 การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment

ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 6.2 แต่ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ในการทดสอบจะเตรียมเฟจแบบผสม 2 ตัว เช่นเดียวกับขั้นตอน 5.2 จากนั้นเติมเฟจแบบผสมในอาหาร NB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *A. dhakensis* เตรียมเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้นให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $10^6$  CFU/mL (เมื่อผสมกับอาหารและเฟจจะได้ปริมาณของเชื้อประมาณ  $10^5$  CFU/mL) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนจะนำมาเติมยา amoxicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $\frac{1}{2}$  MIC amoxicillin นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 rpm และเก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

#### 6.3.2 การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment

ทำการทดลองเช่นเดียวกับขั้นตอน 6.2.1 นำเชื้อ *A. dhakensis* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมเฟจแบบผสมในอาหาร NB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนจะนำมาเติมยา amoxicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $\frac{1}{2}$  MIC amoxicillin จากนั้นทดสอบโดยออกแบบการทดลองดังตาราง 9 ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 18 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 rpm เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเฟจและปริมาณเชื้อ *A. dhakensis* เช่นเดียวกับขั้นตอน 4.1

## 7. การทดสอบทางสถิติ

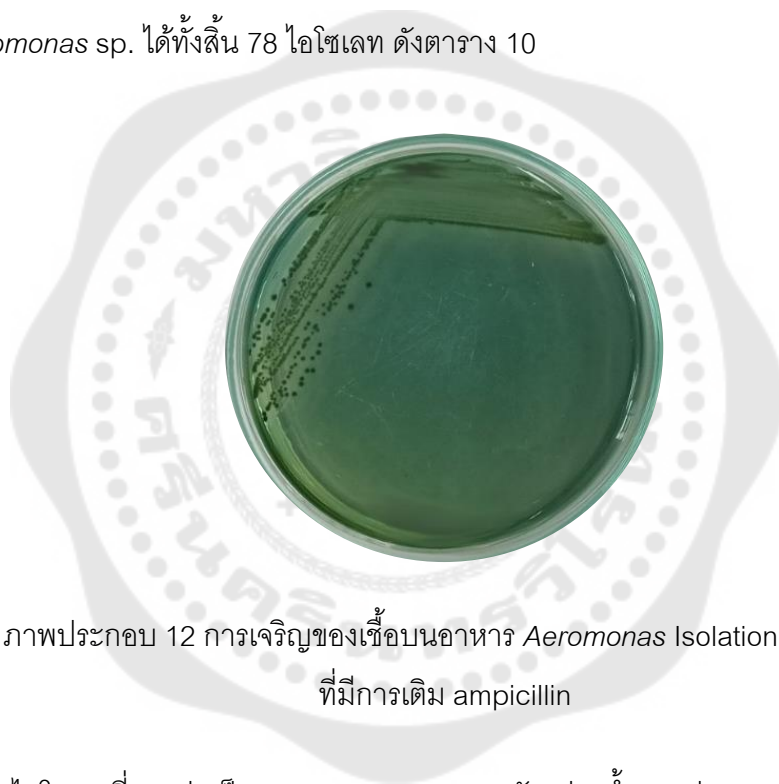
ค่าที่ได้จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* จะแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way-ANOVA โดยเลือกใช้สถิติ Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* sp.

จากการคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* sp. จากตัวอย่างน้ำต่าง ๆ ได้แก่ คลองแสนแสบ คลองเปรมประชากร แม่น้ำเจ้าพระยา และจากตัวอย่างปลาที่วางขายในตลาดคลองเตย ตลาดห้วยขวาง และซูเปอร์มาร์เก็ต โดยเลือกโคโลนีสีเขียว (ภาพประกอบ 12) บนอาหาร *Aeromonas* Isolation Medium ที่มีการเติมแอมพิซิลลิน พบว่า สามารถแยกไอโซเลทที่คาดว่า เป็น *Aeromonas* sp. ได้ทั้งสิ้น 78 ไอโซเลท ดังตาราง 10



ภาพประกอบ 12 การเจริญของเชื้อบนอาหาร *Aeromonas* Isolation Medium ที่มีการเติม ampicillin

ตาราง 10 ไอโซเลทที่คาดว่า เป็น *Aeromonas* sp. จากตัวอย่างน้ำและปลา บนอาหาร *Aeromonas* Isolation Medium ที่มีการเติม ampicillin

สถานที่เก็บ	ตัวอย่าง	ไอโซเลทที่แยกได้
ตลาดคลองเตย	ปลาเก๋า	AK1, AK2, AK3
	ปลาทับทิม	AM
คลองแสนแสบ	น้ำคลอง	KSS1, KSS2, KSS3, KSS4, KSS5
ตลาดห้วยขวาง	กุ้ง	NCHK1, NCHK2
	หมึก	NCHM1, NCHM2
	ปลานิล	NCHN1, NCHN2

ตาราง 10 (ต่อ)

สถานที่เก็บ	ตัวอย่าง	ไอโซเลทที่แยกได้
คลองเปรมประชากร	น้ำคลอง	KPP01, KPP02, KPP03, KPP04, KPP05
ซูเปอร์มาร์เก็ต	ตับปลานิล	TP1, TP2, TP3, TP4, TP5, TP6,
	เนื้อปลานิล	NP1, NP2, NP3, NP4
	ครีปลานิล	KRP1, KRP2, KRP3, KRP4, KRP5
	เหงือกปลานิล	NGP3, NGP5, NGP6, NGP7
	ผิวหนังปลาแซลมอน	SMSF3, SMSF4, SMSF5
	เนื้อปลาแซลมอน	SMN1, SMN2, SMN3, SMN4, SMN5
	เหงือกปลาแซลมอน	SMGILL1, SMGILL2, SMGILL3, SMGILL4, SMGILL5
	ผิวหนังปลาซาบะ	SBSF1, SBSF2, SBSF3, SBSF4, SBSF5
	เนื้อปลาซาบะ	SBN1, SBN2
	ครีปลาซาบะ	SBFIN2, SBFIN3, SBFIN4, SBFIN5,
	ลำไส้ปลาซาบะ	SBKN1, SBKN2, SBKN5

## 2. การจัดจำแนกเชื้อ *A. dhakensis*

### 2.1 การจัดจำแนกเชื้อโดยวิธีทดสอบทางชีวเคมี

นำไอโซเลทที่คาดว่าเป็น *Aeromonas* sp. ทั้ง 78 ไอโซเลท มาตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อพบว่า ไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมดติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น จึงนำมาจัดจำแนกเชื้อต่อด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี โดยลักษณะทางชีวเคมีที่ใช้ทดสอบเพื่อแยก *Aeromonas* sp. ได้แก่ การทดสอบ indole การทดสอบ methyl red การทดสอบ Voges-Proskauer การทดสอบ citrate การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การทดสอบการสร้างเอนไซม์ deoxyribonuclease (DNase) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ gelatinase การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase การทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพมีหรือไม่มีออกซิเจน การทดสอบการใช้น้ำตาลแล็กโทส (lactose) ซูโครส (sucrose) และแมนนิทอล (mannitol) โดยเพิ่มการทดสอบการใช้น้ำตาลแอล-อะราบินอส (L-arabinose) และ ซาลิซิน (salicin) เพื่อแยก *A. dhakensis* ออกจาก *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *A. hydrophila* subsp. *ranae* <sup>(7,29)</sup> จากการทดสอบพบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท AM, NGP8, TP3, KSS5, AK3 และ SBKN4 ที่คาดว่าเป็นเชื้อ *A. dhakensis* ผลแสดงดังตาราง 11

ตาราง 11 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของทั้ง 6 ไอโซเลท ที่คาดว่าป็นเชื้อ *A. dhakensis*

ลักษณะที่ใช้ทดสอบ	ไอโซเลทที่แยกได้					
	AM	AK3	NGP8	TP3	KSS5	SBKN4
การทดสอบ indole	+	+	+	+	+	+
การทดสอบ methyl red	+	+	+	+	+	+
การทดสอบ Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
การทดสอบ citrate	+	+	+	+	+	+
การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$
การทดสอบการผลิตเอ็นไซม์ deoxyribonuclease	+	+	+	+	+	+
การทดสอบการผลิตเอ็นไซม์ gelatinase	+	+	+	+	+	+
การทดสอบการผลิตเอ็นไซม์ catalase	+	+	+	+	+	+
การทดสอบการผลิตเอ็นไซม์ oxidase	+	+	+	+	+	+
การชี้ Triple Sugar Iron (TSI) (Acid/Alkali)	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
การใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน	F	F	F	F	F	F
การใช้แล็กโทส (lactose)	-	-	-	-	-	-
การใช้ซูโครส (sucrose)	+	+	+	+	+	+
การใช้แอล-อะราบิโนส (L-arabinose)	-	-	-	-	-	-
การใช้แมนนิทอล (mannitol)	+	+	+	+	+	+
การใช้ซาลิซิน (salicin)	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ,  $\beta$  =  $\beta$ -hemolysis (การสลายเม็ดเลือดแดงโดยสมบูรณ์), F = Fermentation, A/A= Acid/Acid



## 2.2 การจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

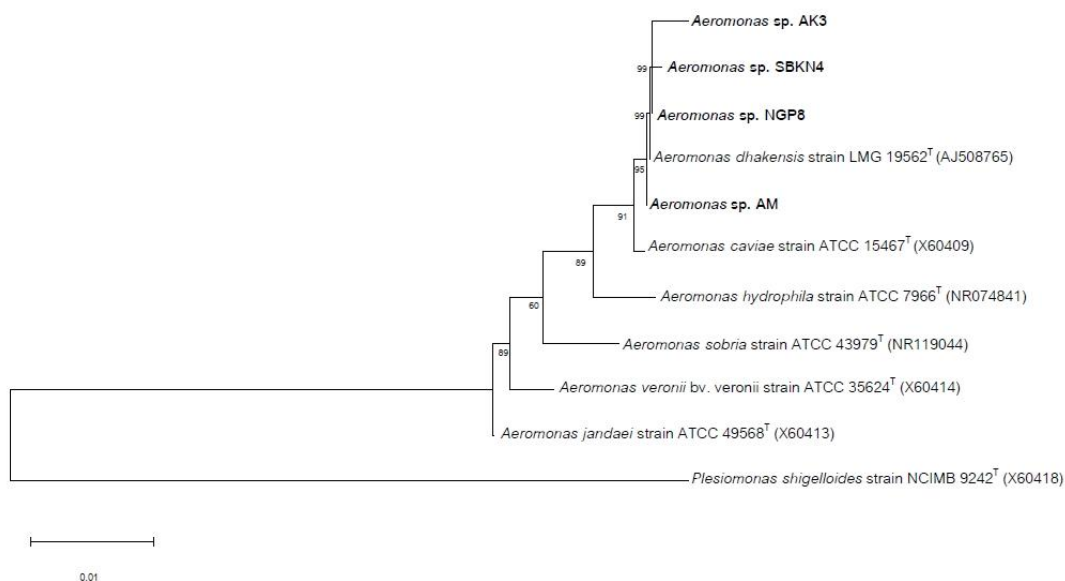
จากการจัดจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA โดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่า ไอโซเลท AM, NGP8, KSS5, AK3, และ SBKN4 มีความคล้ายคลึงกับ *A. dhakensis* มากที่สุด (ตาราง 12) (ข้อมูล ณ วันที่ 5 พฤษภาคม 2565)

ตาราง 12 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene ของ ไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท

ไอโซเลท	สายพันธุ์ของเชื้อที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุด	Accession number	% identity	ความยาวของ read sequence ที่ได้
AM	<i>A. dhakensis</i> strain P21	NR_042155.1	99.93%	1542 bp
NGP8	<i>A. dhakensis</i> strain P21	NR_042155.1	99.37%	1423 bp
TP3	<i>Aeromonas</i> sp.	NR_042155.1	95.58%	758 bp
KSS5	<i>A. dhakensis</i> strain P21	NR_042155.1	96.55%	1402 bp
AK3	<i>A. dhakensis</i> strain P21	NR_042155.1	99.63%	1365 bp
SBKN4	<i>A. dhakensis</i> strain P21	NR_042155.1	99.85%	1372 bp

## 3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ *Aeromonas* ที่คาดว่าเป็นเชื้อ *A. dhakensis*

การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *Aeromonas* ที่คัดแยกได้และมีความคล้ายคลึงกับ *A. dhakensis* ร้อยละ 99 ได้แก่ *Aeromonas* sp. strain AM, *Aeromonas* sp. strain NGP8, *Aeromonas* sp. strain AK3 และ *Aeromonas* sp. strain SBKN4 มาจัดกลุ่มกับ *Aeromonas* สายพันธุ์ต้นแบบ และใช้เชื้อ *Plesiomonas shigelloides* strain NCIMB9242 เป็น outgroup พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดแยกได้นั้นถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกันกับ *A. dhakensis* strain LMG 19562T (AJ508765) และแยกออกจาก *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น ๆ อย่างชัดเจน แสดงผลดังภาพประกอบ 13



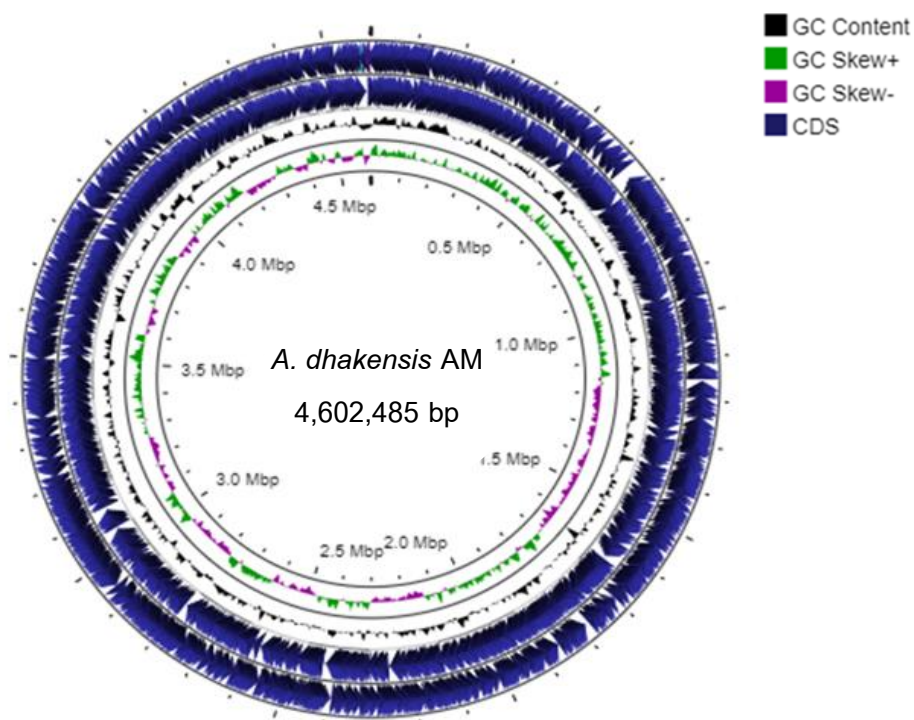
### ภาพประกอบ 13 แผนภูมิความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ *Aeromonas*

(การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *Aeromonas* ที่ตัดแยกได้กับ *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น โดยใช้เชื้อ *Plesiomonas shigelloides* strain NCIMB 9242 เป็น outgroup และใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining โดยมีค่าความเชื่อมั่นของ bootstrap เท่ากับ 1,000 รอบ)

#### 4. การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* AM ด้วยวิธี Next generation sequencing

##### 4.1 การประกอบและการสร้างแผนที่จีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM เพื่อค้นหาและทำนายหน้าที่ของยีน

จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* AM พบว่า *A. dhakensis* AM มีจีโนมขนาด 4,602,485 คู่เบส และมีค่า G+C content อยู่ที่ 61.9% แผนที่จีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM แสดงดังภาพประกอบ 14 และจากการค้นหาและทำนายหน้าที่ของยีน พบว่ามียีนที่สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีนทั้งหมด 4,256 ยีน (ตาราง 13) โดยลำดับจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM ได้ถูกเก็บในฐานข้อมูล NCBI และได้รับ Accession number คือ JAPHNH000000000



ภาพประกอบ 14 แผนที่ยีนของเชื้อ *A. dhakensis* AM

ตาราง 13 ลักษณะจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

ลักษณะ	<i>A. dhakensis</i> AM
Genome size (bp)	4,602,485
GC content (%)	61.9
Number of coding sequences	4256
Number of RNAs	130
Antimicrobial resistance (AMR) gene	8
Prophage	5
Virulence genes	137
Plasmid	-
GenBank accession	JAPHNH000000000
BioSample accession	SAMN31666460
BioProject accession	PRJNA899678

#### 4.2 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค ได้แก่ ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (antimicrobial resistance genes) และยีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อ (virulence-associated genes) พบว่า

- การวิเคราะห์ยีนดื้อยาปฏิชีวนะจากการใช้ฐานข้อมูล Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) ในการวิเคราะห์ตำแหน่งยีนดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. dhakensis* AM (ภาคผนวก ง) พบแนวโน้มที่จะดื้อยาปฏิชีวนะ (strict) โดยอาศัยกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ 3 กลไก ได้แก่

1. กลไกการขับยาปฏิชีวนะ (antibiotic efflux pump) โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้  
 กลุ่ม resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump พบความเหมือนกับยีน *adeF*, *adeF* และ *rsmA* โดยมีความคล้ายคลึงร้อยละ 43.71, 47.65 และ 92.73 ตามลำดับ

กลุ่ม major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump พบความเหมือนกับยีน *tet(E)* โดยมีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 99.75

กลุ่ม small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump พบความเหมือนกับยีน *qacJ* โดยมีความคล้ายคลึงร้อยละ 36.89

2. กลไกการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะโดยเอนไซม์ (antibiotic inactivation) พบความเหมือนกับเอนไซม์ AQU beta-lactamase (AQU-2) และเอนไซม์ OXA beta-lactamase (OXA-726) โดยมีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 97.63 และ 98.48 ตามลำดับ

3. กลไกการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ (antibiotic target alteration) พบความเหมือนกับ *Escherichia coli* EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin (elfamycin resistant EF-Tu) โดยมีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 91.09

- การวิเคราะห์ความรุนแรงของเชื้อจากการใช้ฐานข้อมูล Virulence factor database (VFDB) พบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อแสดงดังภาคผนวก จ ประกอบด้วย ความสามารถในการเกาะติดเยื่อเซลล์ (adherence) พบ Mannose-sensitive hemagglutinin pilus, Polar flagella, Tap type IV pili และ Type I fimbriae ในส่วนของระบบการขนส่งโปรตีน (secretion system) พบ type two secretion system หรือ T2SS และ type six secretion system หรือ T6SS เชื้อสามารถสร้างสารพิษ ได้แก่ aerolysin, extracellular hemolysin, hemolysin, hemolysin III, the repeat in toxin, thermostable hemolysin และ

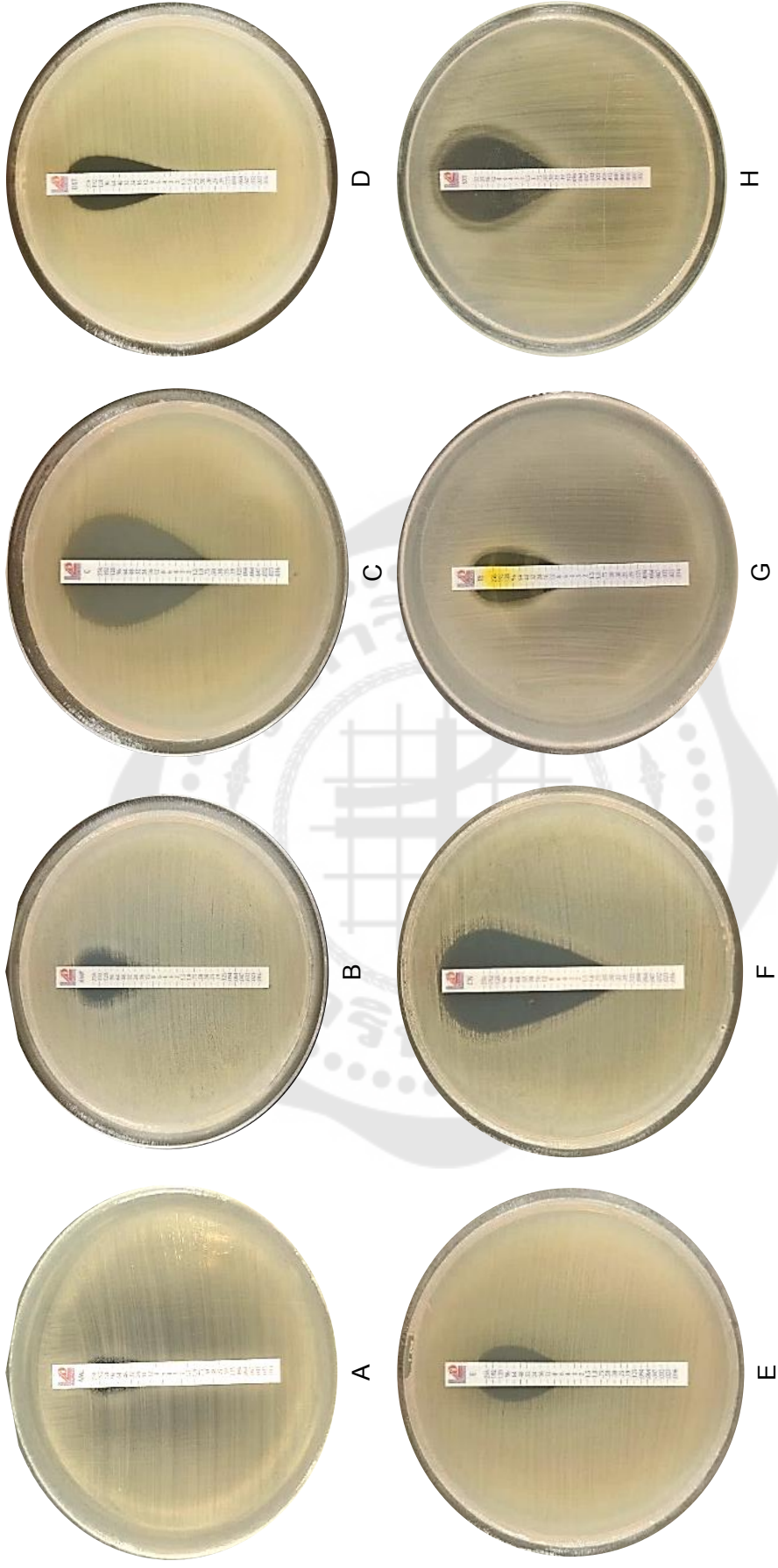
exotoxin A เชื้อนี้มีความสามารถในการหลบหลีกการทำลายโดยภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune evasion) โดยการสร้าง capsule (*Acinetobacter*) และ polysaccharide capsule (*Bacillus*) นอกจากนี้เชื้อสามารถนำเข้าสู่ธาตุเหล็ก (iron uptake) โดยมี acinetobactin (*Acinetobacter*) ที่ถูกควบคุมโดย 2 ยีน ได้แก่ *basB* และ *basG*

- การวิเคราะห์ตำแหน่ง Prophage โดยใช้โปรแกรม PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER) พบว่ามี 5 ตำแหน่ง แสดงผลเป็น incomplete หรือเฟจที่ไม่สมบูรณ์ (ภาคผนวก ฉ) พบลำดับเบสบางส่วนของ *Bacillus* phage G (ขนาด 8.4 kb), *Serratia* phage CHI14 (ขนาด 7.5 kb), *Bacillus* phage vB\_BanS-Tsamsa (ขนาด 8 kb), *Klebsiella* phage ST13OXA48 phi12.1 (ขนาด 13.6 kb) และ *Bacillus* phage G (ขนาด 13.6 kb)

- การวิเคราะห์ตำแหน่งพลาสมิดโดยใช้โปรแกรม PlasmidFinder ผลการวิเคราะห์คือ ไม่พบพลาสมิดในจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

## 5. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. dhakensis* AM ด้วยวิธี E-test

การทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* AM ต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ amoxicillin, ampicillin, chloramphenicol, doxycycline, erythromycin, gentamicin, tetracycline และ trimethoprim sulfamethoxazole แสดงดังภาพประกอบ 15 ผลการทดสอบพบว่า เชื้อ *A. dhakensis* AM มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด คือ chloramphenicol, doxycycline gentamicin และ trimethoprim sulfamethoxazole มีความไวปานกลางต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ erythromycin และ tetracycline และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ amoxicillin และ ampicillin (ตาราง 14)



ภาพประกอบ 15 ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* AM ต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด

(A) amoxicillin, (B) ampicillin, (C) chloramphenicol, (D) doxycycline, (E) erythromycin, (F) gentamicin, (G) tetracycline และ (H) trimethoprim-sulfamethoxazole

ตาราง 14 ความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. dhakensis* AM

ยาปฏิชีวนะ	ระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะ*			MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	ผลการ ทดสอบ
	ดื้อ	ไวปานกลาง	ไว		
	(Resistant) ( $\mu\text{g/mL}$ )	(Intermediate) ( $\mu\text{g/mL}$ )	(Sensitive) ( $\mu\text{g/mL}$ )		
amoxicillin	$\leq 4$	8	$\geq 8$	24	R
ampicillin	$\leq 8$	16	$\geq 32$	32	R
chloramphenicol	$\leq 8$	16	$\geq 32$	0.75	S
doxycycline	$\leq 4$	8	$\geq 16$	3	S
erythromycin	$\leq 4$	8	$\geq 16$	8	I
gentamicin	$\leq 4$	8	$\geq 16$	0.50	S
tetracycline	$\leq 4$	8	$\geq 16$	12	I
trimethoprim-sulfamethoxazole	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	0.38	S

หมายเหตุ: \* อ้างอิงตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2020

R = ดื้อ, I = ไวปานกลาง, S = ไว

#### 6. การคัดแยกเฟจโดยใช้เชื้อ *A. dhakensis* AM เป็นโฮสต์

ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกเฟจที่มีความจำเพาะต่อ *A. dhakensis* โดยนำเชื้อ *A. dhakensis* AM ที่แยกได้เป็นโฮสต์ จากการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเฟจที่จำเพาะกับ *A. dhakensis* AM ได้ทั้งหมด 24 ตัว ดังตาราง 15

ตาราง 15 เฟจที่คัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ โดยใช้เชื้อ *A. dhakensis* AM เป็นโฮสต์

เฟจ	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะพลาค	ขนาดพลาค (มิลลิเมตร)
TS1	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS2	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS3	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS4	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0

ตาราง 15 (ต่อ)

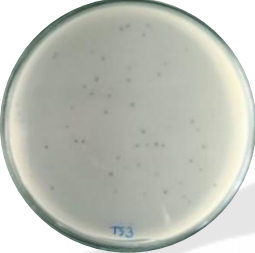
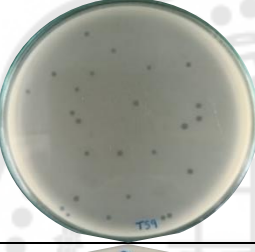

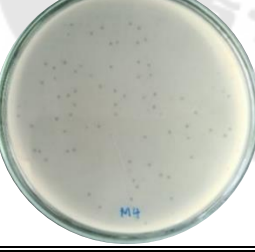
เฟจ	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะพลาค	ขนาดพลาค (มิลลิเมตร)
TS1	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS2	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS3	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS4	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
TS5	คลองแสนแสบ	พลาคขุ่น	1.0
TS6	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคขุ่น	1.0
TS7	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคขุ่น	1.0
TS8	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคขุ่น	1.0
TS9	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคใสขอบเรียบ	2.0
TS10	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคขุ่น	1.0
sGY	คลองแสนแสบ	พลาคขุ่น	1.0
DL	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.7
D1	คลองแสนแสบ	พลาคขุ่น	1.0
D2	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	2.0
D3	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
D4	คลองแสนแสบ	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
M1	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคใสขอบเรียบ	0.7
M2	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคใสขอบเรียบ	0.5
M3	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคใสขอบเรียบ	1.0
M4	แม่น้ำเจ้าพระยา	พลาคใสขอบเรียบ	1.0

## 7. การเพิ่มจำนวนเฟจ

นำเฟจที่จำเพาะกับ *A. dhakensis* AM ทั้ง 20 ตัว มาเพิ่มจำนวนเฟจโดยใช้เชื้อ *A. dhakensis* AM เป็นโฮสต์ พบเฟจเพียง 4 ตัว ที่มีลักษณะของพลาคเป็นพลาคใสซึ่งจัดเป็นไลติกเฟจ (lytic phage) และให้ปริมาณเฟจหลังจากการเพิ่มจำนวนมากกว่า  $10^{11}$  PFU/mL ได้แก่  $\Phi$ TS3 ( $10^{12}$  PFU/mL),  $\Phi$ TS9 ( $10^{11}$  PFU/mL),  $\Phi$ DL ( $10^{11}$  PFU/mL) และ  $\Phi$ M4 ( $10^{11}$  PFU/mL) (ตาราง 16) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเฟจทั้ง 4 ตัว ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป



ตาราง 16 ลักษณะและขนาดของพลาค และปริมาณเฟจสูงสุดภายหลังจากการเพิ่มจำนวน

เฟจ	ภาพพลาค	ลักษณะพลาค	ขนาดพลาค (มิลลิเมตร)	ปริมาณเฟจสูงสุด หลังเพิ่มจำนวน (PFU/mL)
ΦTS3		พลาคใสขอบเรียบ	1.0	$10^{12}$
ΦTS9		พลาคใสขอบเรียบ	2.0	$10^{11}$
ΦDL		พลาคใสขอบเรียบ	1.7	$10^{11}$
ΦM4		พลาคใสขอบเรียบ	1.0	$10^{11}$

#### 8. การศึกษาความสามารถของเฟจในการติดเชื้อสายพันธุ์อื่น

จากการศึกษาความสามารถของเฟจในการติดเชื้อสายพันธุ์อื่น โดยใช้เชื้อสายพันธุ์อ้างอิงเป็นเชื้อทดสอบ พบว่า เฟจทั้ง 4 ตัว มีความจำเพาะในการติดเชื้อ *A. dhakensis* เท่านั้น และไม่สามารถติดเชื้อมีกับเชื้อ *Aeromonas* ในสปีชีส์อื่นได้ (ตาราง 17) เนื่องจากเฟจทั้ง 4 ตัว มีความจำเพาะกับเชื้อ *A. dhakensis* AM ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้ *A. dhakensis* AM เป็นโฮสต์ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อของเฟจทั้ง 4 ตัว ในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 17 คุณสมบัติของเฟจในการติดเชื้อ *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น

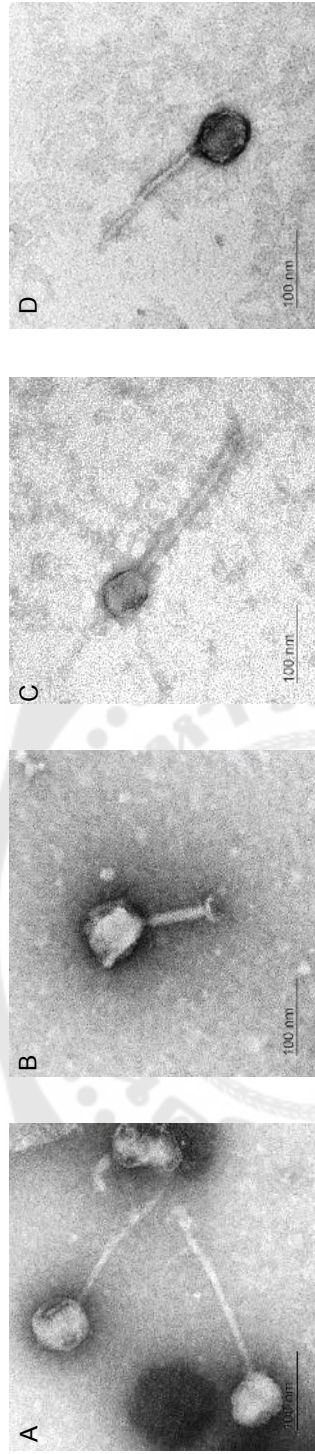
Bacterial strains	ΦTS3	ΦTS9	ΦDL	ΦM4
<i>A. dhakensis</i> AM	+++	+++	+++	+++
<i>A. dhakensis</i> NGP8	-	++	++	-
<i>A. dhakensis</i> TP3	++	-	++	++
<i>A. dhakensis</i> KSS5	+++	+++	-	-
<i>A. dhakensis</i> AK3	+++	+++	-	-
<i>A. dhakensis</i> SBKN4	+	+	-	-
<i>A. hydrophila</i> DMST 2798	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> DMST 21250	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> DMST 25194	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> TISTR1321	-	-	-	-
<i>A. caviae</i> DMST 25498	-	-	-	-
<i>A. sobria</i> DMST 25185	-	-	-	-
<i>A. sobria</i> DMST 12440	-	-	-	-
<i>A. trota</i> ATCC 49657	-	-	-	-
<i>A. veronii</i> ATCC 35624	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = lysis, - = no lysis

### 9. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเฟจ ΦTS3 และ ΦM4 จัดอยู่ใน Family *Siphoviridae* (ตาราง 18 ภาพ A และ D) และเฟจ ΦTS9 และ ΦDL จัดอยู่ใน Family *Myoviridae* (ตาราง 18 ภาพ B และ C) ทั้งนี้การจัดจำแนกในระดับ Family อ้างอิงจากคณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดอนุกรมวิธานของไวรัส (ICTV) โดยค่าเฉลี่ยขนาดของหัวและหางของเฟจแสดงในตาราง 18 จากนั้นจึงทำการเปลี่ยนชื่อเฟจให้เป็นสากล (ตัวอย่างการตั้งชื่อ เช่น vB\_AdhS\_TS3 มาจาก virus of Bacteria, infecting *Aeromonas dhakensis*, with siphovirus morphology, named TS3) ดังนั้นเฟจ ΦTS3, ΦTS9, ΦDL และ ΦM4 จึงถูกเปลี่ยนชื่อเป็น vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 ตามลำดับ

ตาราง 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



ลักษณะสัณฐานวิทยา  
ของเฟจ  
(Bar = 100 nm)

	vB_AdhS_TS3	vB_AdhM_TS9	vB_AdhM_DL	vB_AdhS_M4
ขนาดส่วนหัว (นาโนเมตร)	75.2	85.1	50.04	64.8
ความยาวหาง (นาโนเมตร)	225.3	101.4	210.4	185.4

## 10. การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ

จากการหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อพบว่า ค่า MOI ที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณเฟจสูงสุดของเฟจทั้ง 4 ตัว เท่ากับ 10 โดยมีความแตกต่างกับค่า MOI อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) (ตาราง 19) โดยจากค่า MOI เท่ากับ 10 จะมีปริมาณเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 สูงสุดเท่ากับ  $9.68 \pm 0.05$ ,  $9.94 \pm 0.05$ ,  $10.41 \pm 0.06$  และ  $8.85 \pm 0.25$  Log PFU/mL ตามลำดับ

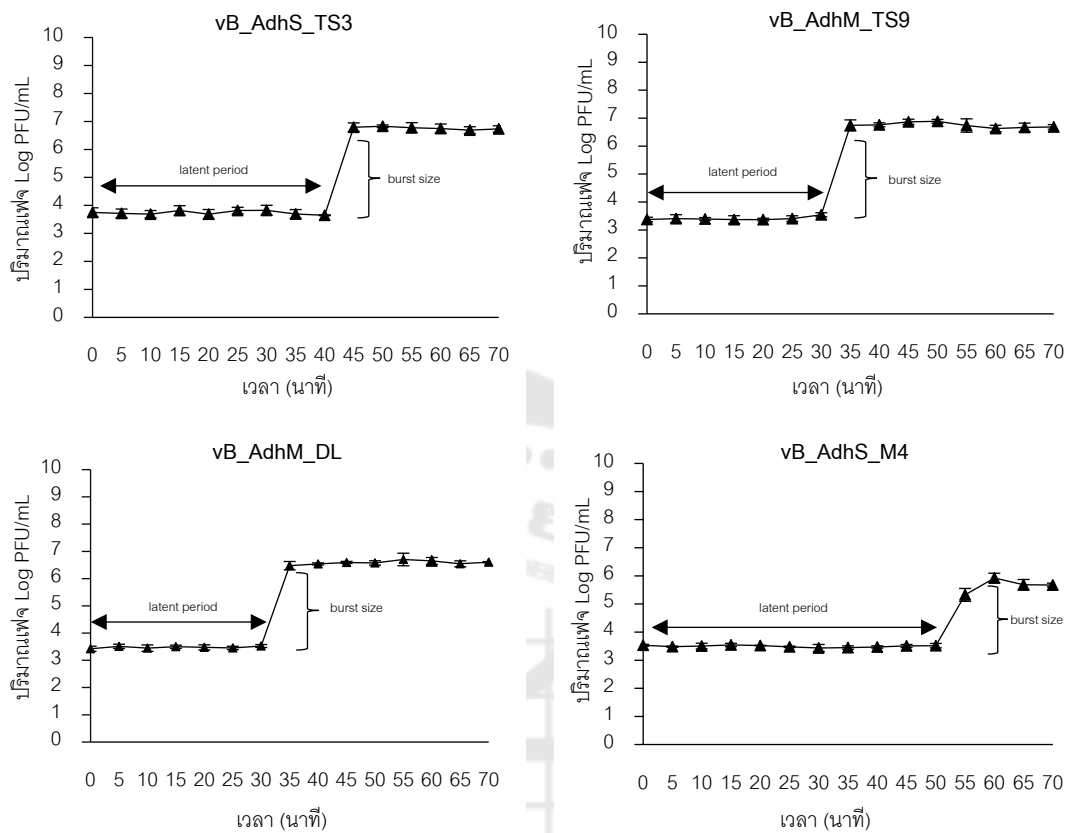
ตาราง 19 ผลการทดลองอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ

โฮสต์ (CFU/mL)	เฟจ (PFU/mL)	MOI PFU/CFU	ปริมาณเฟจภายหลังจากบ่ม 2 ชั่วโมง (Log PFU/mL)			
			vB_AdhS_TS3	vB_AdhM_TS9	vB_AdhM_DL	vB_AdhS_M4
$10^8$	$10^9$	10	$9.68 \pm 0.05^a$	$10.41 \pm 0.06^a$	$9.94 \pm 0.05^a$	$8.85 \pm 0.25^a$
$10^8$	$10^8$	1	$9.14 \pm 0.07^b$	$9.27 \pm 0.19^b$	$8.12 \pm 0.07^b$	$7.38 \pm 0.06^b$
$10^8$	$10^7$	0.1	$8.04 \pm 0.23^c$	$10.20 \pm 0.06^a$	$8.06 \pm 0.20^b$	$6.17 \pm 0.03^c$
$10^8$	$10^6$	0.01	$7.23 \pm 0.22^d$	$10.30 \pm 0.09^a$	$7.13 \pm 0.13^c$	$5.73 \pm 0.06^d$

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษร a, b, c และ d แสดงผลการทดลองที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า MOI หนึ่ง (แนวตั้ง) ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P < 0.05$ )

## 11. การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ

จากกราฟการเจริญของเฟจพบว่า เฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 มีระยะ latent period หรือระยะเวลาที่เฟจเริ่มติดเชื้อภายใน *A. dhakensis* AM จนกระทั่งเริ่มมีปลดปล่อยเฟจรุ่นลูกออกมา เท่ากับ 40, 30, 30 และ 50 นาที ตามลำดับ และสามารถคำนวณ burst size ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 ได้เท่ากับ 1380, 6300, 1280 และ 253 phages particles/infected cell ตามลำดับ (ภาพประกอบ 16) โดยจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า เฟจ vB\_AdhS\_M4 มีระยะ latent period ที่ยาว และมีค่า burst size ที่น้อยที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL ไปใช้ในการศึกษาต่อไป



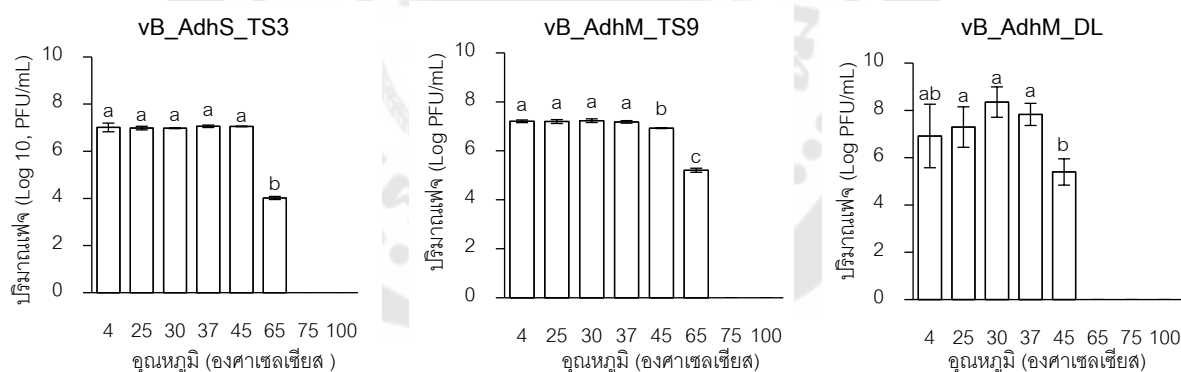
ภาพประกอบ 16 กราฟการเจริญของเฟจ

(กราฟการเจริญของเฟจ เฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 โดยข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

## 12. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจ

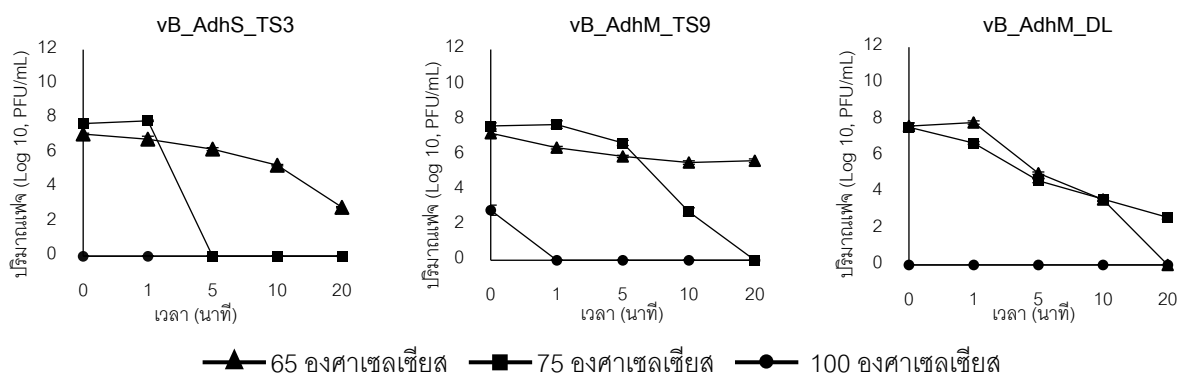
จากการนำเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL มาบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 37, 45, 65, 75 และ 100 องศาเซลเซียส โดยปริมาณเฟจเริ่มต้นเท่ากับ  $10^7$  PFU/mL พบว่า เฟจ vB\_AdhS\_TS3 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยปริมาณเฟจที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น ( $P > 0.05$ ) ในขณะที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเฟจลดลงประมาณ 3.04 Log PFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น และเฟจไม่สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ส่วนเฟจ vB\_AdhM\_TS9 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยปริมาณเฟจที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น ( $P>0.05$ ) ในขณะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเฟจเริ่มมีการลดลงจนกระทั่งอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเฟจลดลงประมาณ 1.97 Log PFU/mL และเฟจไม่สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ส่วนเฟจ vB\_AdhM\_DL มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 47 องศาเซลเซียส โดยปริมาณเฟจที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น ( $P>0.05$ ) ในขณะที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส พบการลดลงของปริมาณเฟจ 0.91 และ 2.43 Log PFU/mL ตามลำดับ และเฟจไม่สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป (ภาพประกอบ 17) นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 65, 75, และ 100 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเฟจเริ่มต้นเท่ากับ  $10^7$  PFU/mL พบว่า ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเฟจทุกตัวค่อย ๆ ลดลง ในขณะที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ไม่สามารถตรวจพบปริมาณเฟจ vB\_AdhS\_TS3 ตั้งแต่เวลา 5 นาที เป็นต้นไป ส่วนเฟจ vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL พบปริมาณเฟจค่อย ๆ ลดลง ส่วนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ไม่พบการอยู่รอดของเฟจทั้ง 3 ตัว ตั้งแต่เวลา 1 นาที เป็นต้นไป (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเฟจ

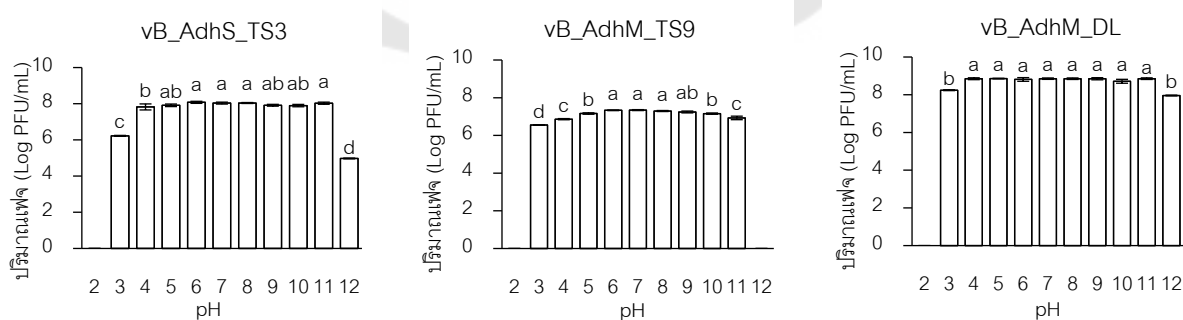
(ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ สัญลักษณ์ a, ab, b และ c แทนกลุ่มของตัวอย่าง (homogeneous subsets) ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P<0.05$ )



ภาพประกอบ 18 ผลของอุณหภูมิ 65, 75 และ 100 องศาเซลเซียสต่อการอยู่รอดของเฟจ

### 13. การศึกษาผลของค่า pH ต่อการอยู่รอดของเฟจ

จากการนำเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL มาบ่มในอาหาร NB ที่มีค่า pH แตกต่างกัน โดยมีปริมาณเฟจเริ่มต้น  $10^7$  PFU/mL พบว่าเฟจ vB\_AdhS\_TS3 มีความเสถียรที่ pH เท่ากับ 6, 7, 8 และ 11 โดยปริมาณเฟจที่ pH ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น ( $P>0.05$ ) ส่วนเฟจ vB\_AdhM\_TS9 มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 6 ถึง 8 โดยปริมาณเฟจที่ pH ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น ( $P>0.05$ ) ในขณะที่เฟจ vB\_AdhM\_DL มีความเสถียรที่ pH 4 ถึง 11 โดยปริมาณเฟจที่ pH ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเฟจเริ่มต้น ( $P>0.05$ ) ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 ผลของ pH ต่อการอยู่รอดของเฟจ

(ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ สัญลักษณ์ a, ab, b และ c แทนกลุ่มของตัวอย่าง (homogeneous subsets) ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P<0.05$ )

#### 14. การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจด้วยวิธี Next generation sequencing

จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL พบว่า มีขนาดของจีโนมเท่ากับ 115,560 คู่เบส, 115,503 คู่เบส และ 42,388 คู่เบส ตามลำดับ และมีค่า G+C content เท่ากับ 41.10%, 35.34% และ 34.43% แผนที่จีโนมของเฟจทั้ง 3 ตัว แสดงดังภาพประกอบ 20 และจากการค้นหาและทำนายหน้าที่ของยีนในเฟจทั้ง 3 ตัว (ตาราง 20) เป็นดังนี้

เฟจ vB\_AdhS\_TS3 มีจำนวนยีนทั้งหมด 242 ยีน ซึ่งในจำนวนนี้พบว่า มียีนที่จะแปลรหัสไปเป็นโปรตีน 151 ยีน โดยมีส่วนที่เป็นยีนของโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว 30 ยีน (ตาราง 21) นอกจากนี้ยังพบ tRNA ในจีโนมทั้งหมด 30 tRNA (ตาราง 24) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 กับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่า มีความคล้ายกับ *Aeromonas* phage Akh-2 (Accession number MK318083.1) ร้อยละ 81.90 โดยลำดับจีโนมได้ถูกเก็บในฐานข้อมูล NCBI และได้รับ Accession number คือ OP820700

เฟจ vB\_AdhM\_TS9 พบว่า มีจำนวนยีนทั้งหมด 199 ยีน มียีนที่จะแปลรหัสไปเป็นโปรตีน 195 ยีน โดยมีส่วนที่เป็นยีนของโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้ว 25 ยีน (ตาราง 22) และไม่พบ tRNA จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 กับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่า มีความคล้ายกับ *Aeromonas* phage phiA047 (Accession number OM033136.1) ร้อยละ 94.43 โดยลำดับจีโนมได้ถูกเก็บในฐานข้อมูล NCBI และได้รับ Accession number คือ OP820701

เฟจ vB\_AdhM\_DL มีจำนวนยีนทั้งหมด 79 ยีน มียีนที่จะแปลรหัสไปเป็นโปรตีน 75 ยีน โดยมีส่วนที่เป็นยีนของโปรตีนที่ทราบหน้าที่ 9 ยีน (ตาราง 23) และไม่พบ tRNA จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเฟจ vB\_AdhM\_DL กับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่า มีความคล้ายกับ *Aeromonas* phage phiA019 (Accession number OM033136.1) ร้อยละ 94.43 โดยลำดับจีโนมได้ถูกเก็บในฐานข้อมูล NCBI และได้รับ Accession number คือ OP820702

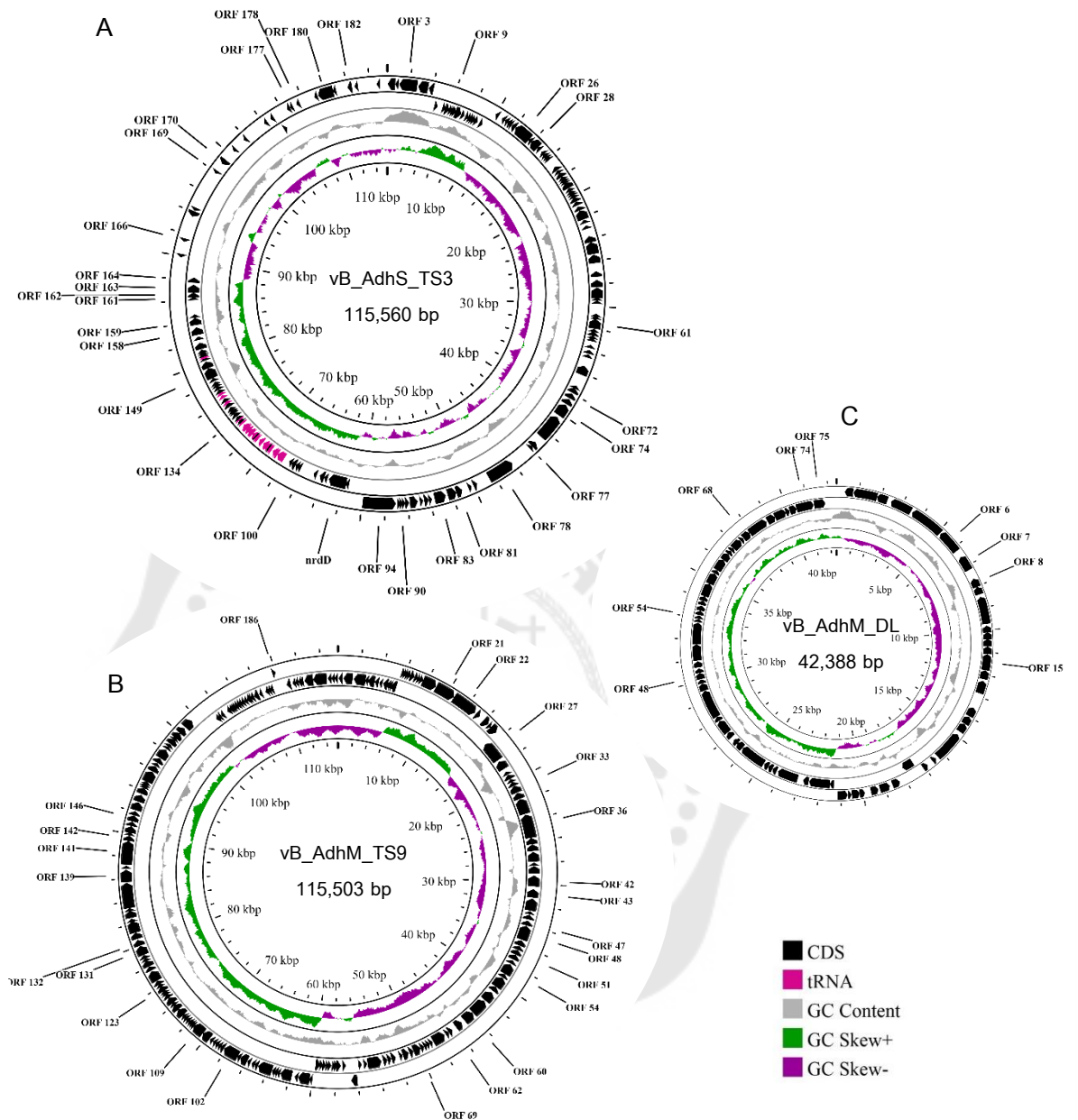
นอกจากนี้ในจีโนมของเฟจทั้งสามไม่พบยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนต่าง ๆ เช่น Antimicrobial resistance genes, Virulence-associated genes และ Lysogenic markers เมื่อทำการวิเคราะห์ห้วงชีวิตของเฟจทั้งสามโดยใช้โปรแกรม PhageAI พบว่าเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL แสดงค่าเป็น Virulent หรือเฟจมีวงชีวิตเป็นไลติคเฟจ



ร้อยละ 99.10, 90.70 และ 91.21 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเฟจทั้งสามมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็น phage therapy ต่อไป

ตาราง 20 ลักษณะจีโนมของเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL

Features	vB_AdhS_TS3	vB_AdhM_TS9	vB_AdhM_DL
NCBI accession	OP820700	OP820701	OP820702
Length	115,560 bp	115,503 bp	42,388 bp
GC content	41.10%	35.34%	34.43%
Total CDS (Ref=Prokka v1.14)	151	195	75
Hypothetical proteins	121	170	66
Functional proteins (Ref = Blastp, $E < 10^{-5}$ )	30	25	9
tRNAs (Ref= tRNAscan-SE v2.0)	30	-	-
Virulence factor (Ref=VFDB)	-	-	-
Antimicrobial resistance genes (Ref = CARD)	-	-	-
Lysogenic markers (Ref = Blastp)	-	-	-
Lifestyle (Ref = PhageAI)	Virulent (99.10%)	Virulent (90.70%)	Virulent (91.21%)



ภาพประกอบ 20 แผนที่จีโนมของเฟจ

A) vB\_AdhS\_TS3 B) vB\_AdhM\_TS9 C) vB\_AdhM\_DL โดยลูกศรสีดำแสดงทิศทางบนเส้น forward และ reverse ของยีนที่พบในฐานข้อมูล (BLASTp E value of  $<10^{-5}$ ), สีเทา แสดง GC content, สีเขียว แสดง GC skew+ และสีม่วง แสดง GC skew -

ตาราง 21 ข้อมูล ORFs ของจีโนมของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 เมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลที่ทำหน้าที่

ORF	Predicted function	Organism	E value	Identity	Accession
3	DNA transfer protein	<i>Aeromonas</i> phage AhSzw-1	0	93.35%	AZV02038.1
9	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	<i>Aeromonas</i> phage AhSzw-1	$4.0 \times 10^{-43}$	72.00%	YP_0098000331.1
26	nicotinamide phosphoribosyl transferase	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	0.00	91.87%	AZV01835.1
28	ribose-phosphate pyrophosphokinase	<i>Aeromonas</i> phage AhSzaq-1	$9.0 \times 10^{-162}$	83.01%	YP_009800055.1
61	thymidylate synthase	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	$6.0 \times 10^{-159}$	93.39%	AZV01879.1
72	ribonuclease HI	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	$5.0 \times 10^{-86}$	76.92%	AZV01894.1
74	ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	0.00	97.59%	AZV01896.1
77	phosphate starvation-inducible protein	<i>Klebsiella</i> phage J1Ph_Kp127	$2.0 \times 10^{-9}$	52.54%	QFR57528.1
78	DNA polymerase	<i>Aeromonas</i> phage AhSzw-1	0.00	86.03%	YP_009800255.1
81	D5 protein	<i>Aeromonas</i> phage AhSzaq-1	$1.0 \times 10^{-108}$	84.95%	YP_009800121.1
83	DNA ligase	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	0.00	95.33%	AZV01917.1
90	RNA pseudouridine synthase	<i>Aeromonas</i> phage AhSzw-1	$6.0 \times 10^{-17}$	53.12%	YP_009800269.1
92	putative replication origin binding protein	<i>Aeromonas</i> phage AhSzaq-1	0.00	84.51%	YP_009800132.1
94	ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	0.00	97.71%	AZV01929.1
100	endonuclease	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	$3.0 \times 10^{-98}$	96.48%	AZV01936.1
134	toll-like protein	<i>Aeromonas</i> phage AhSzw-1	$7.0 \times 10^{-20}$	76.92%	YP_009800284.1
149	nicotinamide-nucleotide adenyl transferase	<i>Aeromonas</i> phage Akh-2	0.00	97.38%	AZV01956.1

ตาราง 21 (ต่อ)

ORF	Predicted function	Organism	E value	Identity	Accession
158	D11 protein	Aeromonas phage AhSzaq-1	$5.0 \times 10^{-138}$	85.98%	YP_009800153.1
159	putative recombination endonuclease, subunit D12	Aeromonas phage AhSzaq-1	$6.0 \times 10^{-83}$	72.90%	YP_009800155.1
161	putative exonuclease subunit 2	Aeromonas phage AhSzaq-1	$1.0 \times 10^{-37}$	92.65%	YP_009800157.1
162	D14 protein	Aeromonas phage AhSzaq-1	$2.0 \times 10^{-51}$	83.70%	YP_009800158.1
163	flap endonuclease	Aeromonas phage AhSzw-1	$4.0 \times 10^{-119}$	84.29%	YP_009800308.1
164	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	Aeromonas phage Akh-2	$7.0 \times 10^{-107}$	88.55%	AZV01971.1
166	tail fiber protein	Aeromonas phage 65.2	$2.0 \times 10^{-17}$	53.01%	APU01545.1
169	tail length tape-measure protein	Aeromonas phage Akh-2	$2.0 \times 10^{-54}$	94.38%	AZV01993.1
170	tail protein Pb3	Aeromonas phage AhSzw-1	$2.0 \times 10^{-95}$	93.71%	YP_009800313.1
177	major tail protein	Aeromonas phage AhSzw-1	$9.0 \times 10^{-37}$	88.57%	YP_009800316.1
178	tail fiber protein	Aeromonas phage Akh-2	$4.0 \times 10^{-27}$	98.08%	AZV02017.1
180	major capsid protein	Aeromonas phage Akh-2	0.00	97.42%	AZV02021.1
182	portal protein	Aeromonas phage AhSzaq-1	$5.0 \times 10^{-82}$	90.30%	YP_009800177.1

ตาราง 22 ข้อมูล ORFs ของจีโนมของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 เมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลที่ทำหน้าที่

ORF	Predicted function	Organism	E value	Identity	Accession
21	putative DNA primase/helicase	Aeromonas phage 2L372D	0.00	98.49%	YP_009846185.1
22	DNA polymerase	Aeromonas phage phiA009	0.00	98.03%	ULG01416.1
27	putative tail fiber protein	Aeromonas phage phiA009	$6.0 \times 10^{-55}$	91.59%	ULG01421.1
33	Ig-like domain-containing protein	Aeromonas phage phiA009	$6.0 \times 10^{-95}$	62.36%	ULG01426.1
36	tail protein	Aeromonas phage phiA009	$3.0 \times 10^{-58}$	45.08%	ULG01429.1
42	putative tape measure protein	Aeromonas phage 4L372XY	0.00	91.40%	YP_009846891.1
43	putative tape measure protein	Aeromonas phage 4L372D	$8.0 \times 10^{-151}$	97.80%	YP_009846661.1
47	structural protein	Aeromonas phage phiA047	$6.0 \times 10^{-74}$	67.31%	ULG01831.1
48	putative structural protein 1	Aeromonas phage 4L372XY	0.00	86.64%	YP_009846896.1
51	putative RNA polymerase	Aeromonas phage 2L372D	$4.0 \times 10^{-120}$	98.79%	YP_009846216.1
54	putative major capsid protein	Aeromonas phage phiA047	0.00	99.71%	ULG01824.1
60	terminase	Aeromonas phage phiA047	0.00	94.30%	ULG01818.1
62	putative terminase large subunit	Aeromonas phage 2L372D	$5.0 \times 10^{-93}$	100.00%	YP_009846226.1
69	putative serine/threonine protein phosphatase	Aeromonas phage LAh_6	$2.0 \times 10^{-43}$	41.91%	YP_009847268.1
102	putative DNA ligase	Aeromonas phage 2L372D	0.00	85.37%	YP_009846276.1
109	5'-3' exonuclease	Aeromonas phage 4L372D	0.00	93.37%	YP_009846727.1
123	ATP-binding protein	Aeromonas phage phiA009	$3.0 \times 10^{-114}$	96.36%	ULG01509.1

ตาราง 22 (ต่อ)

ORF	Predicted function	Organism	E value	Identity	Accession
131	thymidylate synthase	Aeromonas phage phiA047	0.00	93.95%	ULG01742.1
132	dihydrofolate reductase	Aeromonas phage phiA047	$1.0 \times 10^{-130}$	97.80%	ULG01741.1
138	ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subunit alpha	Aeromonas phage 4L372XY	0.00	96.95%	YP_009846985.1
139	putative ribonucleoside diphosphate reductase beta chain	Aeromonas phage phiA009	0.00	97.72%	ULG01525.1
141	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	Aeromonas phage 4L372XY	0.00	97.27%	YP_009846992.1
142	anaerobic ribonucleotide reductase-activating protein	Aeromonas phage 4L372XY	$5.0 \times 10^{-105}$	94.90%	YP_009846993.1
146	lysozyme	Aeromonas phage 4L372XY	$7.0 \times 10^{-127}$	96.70%	YP_009846996.1
186	VHS1027 protein	Aeromonas phage 4L372XY	$4.0 \times 10^{-36}$	87.50%	YP_009846823.1

ตาราง 23 ข้อมูล ORFs ของจีโนมของเฟจ vB\_AdhM\_DL เมื่อเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูลที่ทำหน้าที่

ORF	Predicted function	Organism	E value	Identity	Accession
6	terminase	<i>Aeromonas</i> phage phiA047	0	94.30%	ULG01818.1
7	homing endonuclease	<i>Shewanella</i> sp. phage 1/40	$1.0 \times 10^{-124}$	74.78%	YP_009104092.1
8	putative terminase large subunit	<i>Aeromonas</i> phage 2L372D	$5.0 \times 10^{-93}$	100.00%	YP_009846226.1
15	serine/threonine protein phosphatase	<i>Pseudoalteromonas</i> phage H101	$4.0 \times 10^{-61}$	49.38%	YP_009225557.1
48	MazG	<i>Rheinheimera</i> phage Barba5S	$1.0 \times 10^{-69}$	85.59%	YP_009822599.1
54	5'-3' exonuclease	<i>Aeromonas</i> phage 4L372D	0	93.37%	YP_009846727.1
68	ATP-binding protein	<i>Aeromonas</i> phage phiA009	$3.0 \times 10^{-114}$	96.36%	ULG01509.1
74	thymidylate synthase	<i>Aeromonas</i> phage phiA047	0	93.95%	ULG01742.1
75	dihydrofolate reductase	<i>Aeromonas</i> phage phiA047	$1.0 \times 10^{-130}$	97.80%	ULG01741.1

ตาราง 24 tRNA ที่พบในจีโนมของเฟจ vB\_AdhS\_TS3

ORF	Strand	Start	Stop	tRNA ที่พบ
139	+	68203	68287	tRNA-Tyr-GTA
140	+	68298	68369	tRNA-Trp-CCA
141	+	68380	68452	tRNA-Lys-CTT
142	+	68463	68533	tRNA-Val-TAC
143	+	68543	68615	tRNA-Gln-TTG
144	+	68624	68697	tRNA-Asn-GTT
146	+	68940	69012	tRNA-Lys-TTT
147	+	69022	69093	tRNA-Glu-TTC
148	+	69183	69254	tRNA-Arg-ACG
150	+	69642	69715	tRNA-His-GTG
151	+	69783	69854	tRNA-Sup-CTA
153	+	70060	70131	tRNA-Ala-TGC
154	+	70246	70317	tRNA-Pro-TGG
156	+	70735	70808	tRNA-Leu-TAG
157	+	70818	70892	tRNA-Met-CAT
159	+	71283	71356	tRNA-Leu-CAA
160	+	71444	71515	tRNA-Phe-GAA
162	+	71697	71768	tRNA-Gly-GCC
163	+	72013	72084	tRNA-Asp-GTC
164	+	72094	72166	tRNA-Asp-GTC
165	+	72415	72487	tRNA-Ile-GAT
166	+	72495	72566	tRNA-Thr-GGT
167	+	72787	72868	tRNA-Ser-GCT
168	+	72879	72965	tRNA-Ser-GGA
169	+	73247	73331	tRNA-Pseudo-GTA
171	+	73767	73839	tRNA-Met-CAT
178	+	75706	75779	tRNA-Leu-TAA
180	+	76385	76456	tRNA-Arg-CCT
181	+	76729	76801	tRNA-Arg-TCT
190	+	80540	80612	tRNA-Cys-GCA

### 15. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบจะทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนของโฮสต์กับเฟจหรือ MOI ที่แตกต่างกัน ได้แก่ MOI 0.1, MOI 1 และ MOI 10 ในเฟจแต่ละตัว การศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment จะนำไปประยุกต์ใช้ในกรณีที่ใช้เฟจป้องกันเชื้อก่อนที่จะพบการติดเชื้อ และการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment จะนำไปประยุกต์ใช้ในกรณีที่ใช้เฟจทำลายเชื้อเพื่อลดหรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ



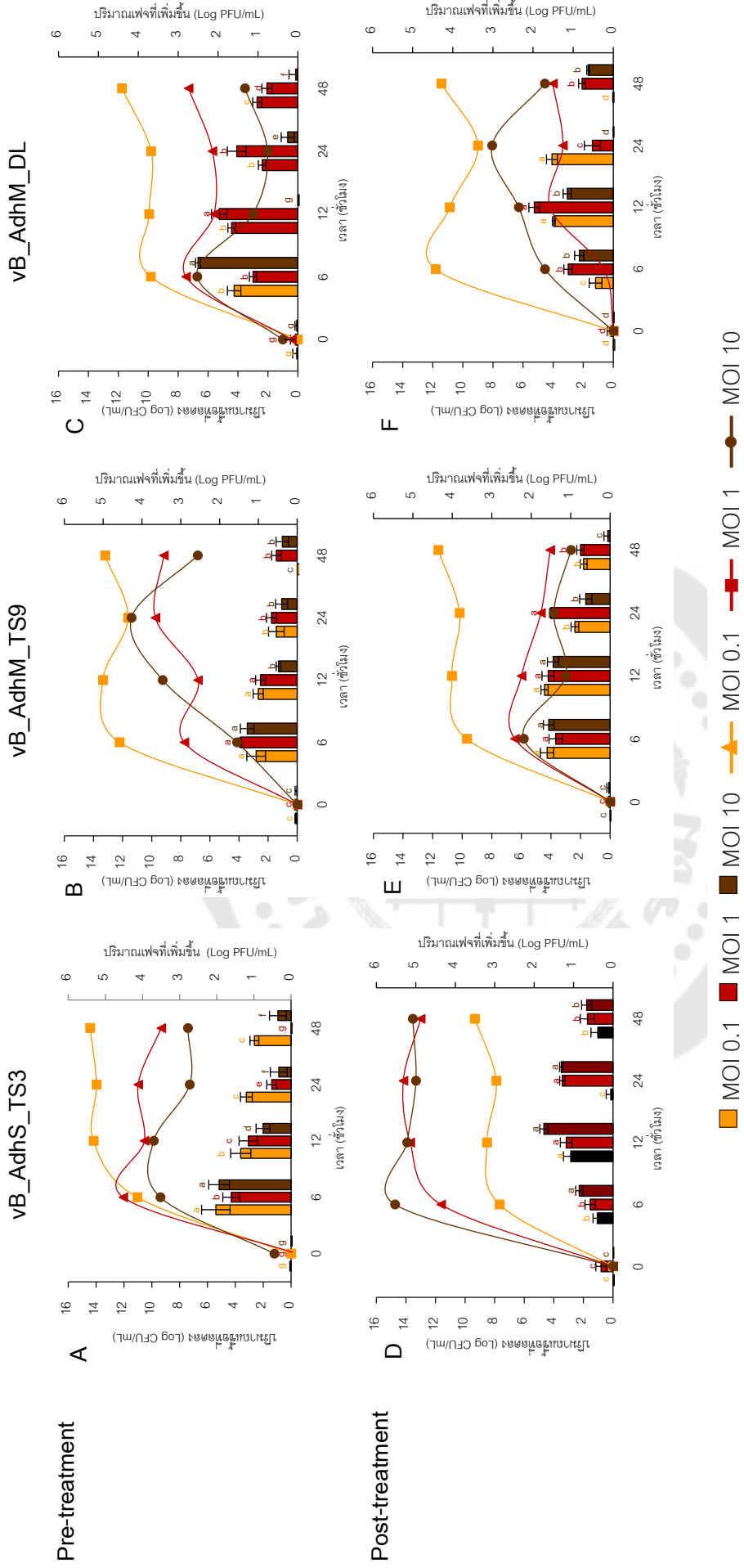
### 15.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว

การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 (ภาพประกอบ 21A) สูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง คือ MOI 0.1 (ปริมาณเชื้อลดลง 5.40 Log CFU/mL), MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.29 Log CFU/mL) และ MOI 10 (ปริมาณเชื้อลดลง 5.17 Log CFU/mL) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) และเชื้อกลับมาเจริญใหม่ที่เวลา 12 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามเฟจ vB\_AdhS\_TS3 ที่ MOI 0.1 ยังคงแสดงการยับยั้งเชื้อสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ MOI 1 และ MOI 10 จนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 จึงเลือก MOI 0.1 เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบผสมต่อไป เช่นเดียวกันกับเฟจ vB\_AdhM\_TS9 (ภาพประกอบ 21B) ที่เวลา 6 ชั่วโมง แสดงการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment สูงสุดที่ MOI 0.1 (ปริมาณเชื้อลดลง 2.82 Log CFU/mL), MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 3.91 Log CFU/mL) และ MOI 10 (ปริมาณเชื้อลดลง 3.44 Log CFU/mL) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับทุก MOI และแสดงการกลับมาเจริญของเชื้อที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยเฟจยับยั้งเชื้อสูงสุดที่ MOI 0.1 (ปริมาณเชื้อลดลง 3.61 Log CFU/mL) และ MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 2.52 Log CFU/mL) ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ MOI 10 และยังคงพบการยับยั้งเชื้อของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 ที่ MOI 1 จนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 จึงเลือก MOI 1 นำไปทดสอบต่อไป ในขณะที่การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_DL (ภาพประกอบ 21C) พบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง มีการลดลงของเชื้อสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ที่ MOI 10 (ปริมาณเชื้อลดลง 6.67 Log CFU/mL) เมื่อเปรียบเทียบกับ MOI อื่น ๆ จนกระทั่งที่เวลา 12 ชั่วโมง มีการลดลงของเชื้อสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ที่ MOI 0.1 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.43 Log CFU/mL) และ MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 5.25 Log CFU/mL) แต่ไม่พบการยับยั้งเชื้อของ MOI 10 หลังจากนั้นเฟจ vB\_AdhM\_DL ยังคงแสดงการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่ MOI 0.1 และ MOI 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ MOI 10 จนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_DL ที่ MOI 0.1 จึงเหมาะสมกับการนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป จึงสรุปได้ว่าการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment นี้จึงทำการเลือก MOI ของเฟจแต่ละตัวคือ vB\_AdhS\_TS3 (MOI 0.1) vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1) และ vB\_AdhM\_DL (MOI 0.1) เพื่อนำไป

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบผสมต่อไป ในส่วนของการเจริญของเฟจ เมื่อบ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจทั้งสามอยู่รอดได้ตลอดจนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง

### 15.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว

การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 (ภาพประกอบ 21D) สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง คือ MOI 10 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.68 Log CFU/mL) ซึ่งให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับ MOI อื่น ๆ ถึงแม้ว่าจะมีการกลับมาเจริญของเชื้อ แต่เฟจ vB\_AdhS\_TS3 ที่ MOI 10 ยังคงแสดงการยับยั้งเชื้อสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับ MOI 0.1 และ 1 จนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 ที่ MOI 10 จึงเหมาะกับการนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบผสมต่อไป ในขณะที่การยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 (ภาพประกอบ 21E) พบการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง คือ MOI 0.1 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.26 Log CFU/mL), MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 3.68 Log CFU/mL) และ MOI 10 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.15 Log CFU/mL) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และต่อมาเฟจยังคงแสดงการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง คือ MOI 0.1 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.43 Log CFU/mL), MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 4.19 Log CFU/mL) และ MOI 10 (ปริมาณเชื้อลดลง 3.85 Log CFU/mL) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ( $P > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกันทุก MOI อย่างไรก็ตามการยับยั้งเชื้อของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 ที่ MOI 1 ยังคงแสดงการยับยั้งเชื้อสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจนครบ 48 ชั่วโมง ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_TS9 ที่ MOI 1 จึงเหมาะกับการนำไปทดสอบไป ส่วนการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_DL (ภาพประกอบ 21F) ที่เวลา 12 ชั่วโมง พบการยับยั้งเชื้อสูงสุดคือ MOI 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 5.25 Log CFU/mL) ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แสดงการยับยั้งเชื้อจนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับ MOI 0.1 และ MOI 10 ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ของเฟจ vB\_AdhM\_DL ที่ MOI 1 จึงเหมาะกับการนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป จึงสรุปได้ว่า การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment นี้จึงทำการเลือก MOI ของเฟจแต่ละตัวคือ vB\_AdhS\_TS3 (MOI 10) vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1) และ vB\_AdhM\_DL (MOI 1) เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบผสมต่อไป ในส่วนของการเจริญของเฟจเช่นเดียวกันกับการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment พบว่า เมื่อบ่มร่วมกับเชื้อเฟจสามารถอยู่รอดได้จนถึง 48 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 21 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย pre-treatment และแบบ post-treatment โดยใช้ฟาจแบบเดี่ยว

(การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย pre-treatment (A-C) และแบบ post-treatment (D-F) โดยใช้ฟาจแบบเดี่ยว กราฟแสดงการลดลงของเชื้อ และกราฟเส้นแสดงปริมาณของฟาจ ที่ลดลงเรื่อยๆ เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ตัวอักษรภาษาอังกฤษบนแกนของตัวอย่างเป็นค่าเฉลี่ยที่ความแตกต่าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ one way-ANOVA พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P < 0.05$ )

## 16. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM โดยใช้เฟจแบบผสมในระดับห้องปฏิบัติการ

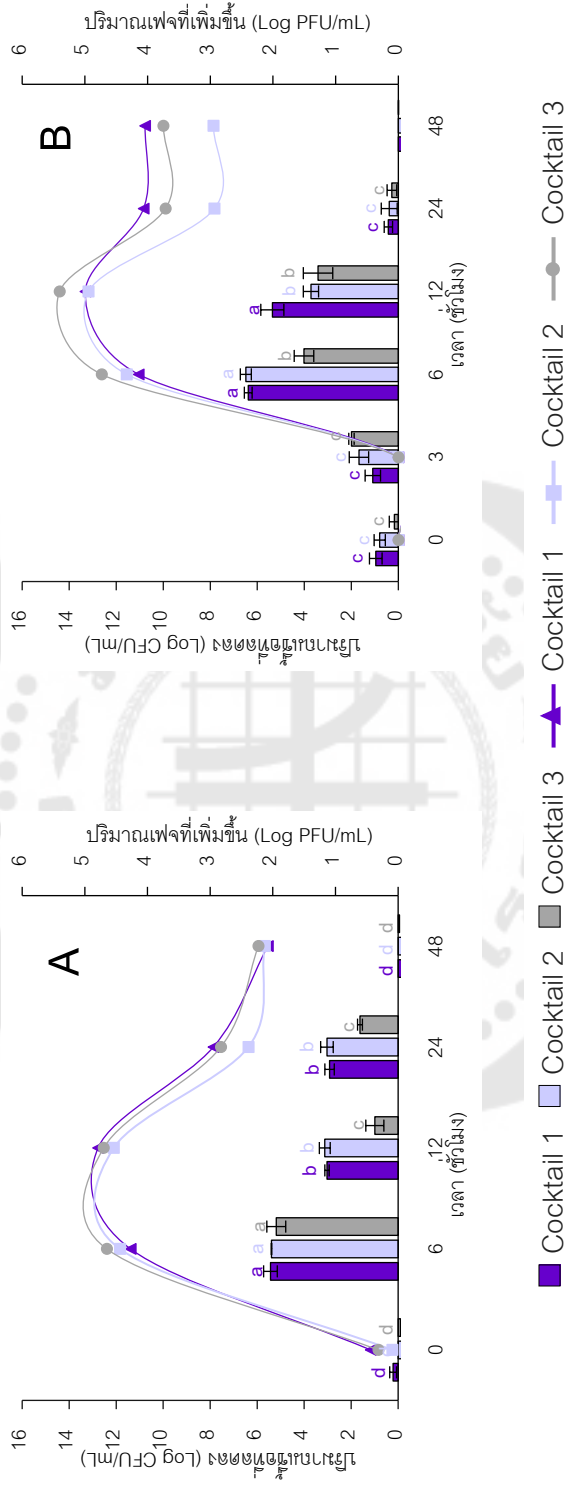
### 16.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจแบบผสม

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้เฟจชุดการทดลอง Cocktail 1 (vB\_AdhS\_TS3 (MOI 0.1) + vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1)), Cocktail 2 (vB\_AdhS\_TS3 (MOI 0.1) + vB\_AdhM\_DL (MOI 0.1)) และ Cocktail 3 (vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1) + vB\_AdhM\_DL (MOI 0.1)) แสดงดังภาพประกอบ 22A พบการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อลดลง 5.43, 5.39 และ 5.19 Log CFU/mL ตามลำดับ ทุกชุดการทดลองให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ภายหลังจากนั้นมีเชื้อกลับมาเจริญได้ใหม่ในเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งชุดการทดลอง Cocktail 1 และ Cocktail 2 ให้ผลการยับยั้งเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดการทดลอง Cocktail 3 โดยที่เวลา 12 ชั่วโมงพบการยับยั้งเชื้อของเฟจในชุดการทดลอง Cocktail 1 ทำให้ปริมาณเชื้อลดลง 3.03 Log CFU/mL และชุดการทดลอง Cocktail 2 ปริมาณเชื้อลดลง 3.12 Log CFU/mL เช่นเดียวกันกับที่เวลา 24 ชั่วโมง ชุดการทดลอง Cocktail 1 และ Cocktail 2 พบปริมาณเชื้อลดลง 2.92 Log CFU/mL และ 3.03 Log CFU/mL ตามลำดับ จนกระทั่ง 48 ชั่วโมงพบว่า ทุกชุดการทดลองไม่พบปริมาณเชื้อที่ลดลงแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการกลับมาเจริญได้ใหม่โดยสมบูรณ์ ในส่วนของการเจริญของเฟจเมื่อบ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจอยู่รอดได้ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงในทุกชุดการทดลอง

### 16.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบผสม

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment โดยใช้เฟจชุดการทดลอง Cocktail 1, Cocktail 2 และ Cocktail 3 โดยการเติมเฟจลงไปภายหลังการเลี้ยงเชื้อ 3 ชั่วโมง แสดงดังภาพประกอบ 22B พบการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยชุดการทดลอง Cocktail 1 (ปริมาณเชื้อลดลง 6.39 Log CFU/mL) และชุดการทดลอง Cocktail 2 (ปริมาณเชื้อลดลง 6.49 Log CFU/mL) ให้ผลการยับยั้งเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดการทดลอง Cocktail 3 จากนั้นมีเชื้อกลับมาเจริญได้ใหม่ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีเพียงชุดการทดลอง Cocktail 1 ที่ทำให้ยังคงมีปริมาณเชื้อลดลงสูงสุด 5.36 Log CFU/mL ซึ่งให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดการทดลอง Cocktail 2 และ Cocktail 3 จนกระทั่ง 48 ชั่วโมงพบว่า ทุกชุดการทดลองไม่พบปริมาณเชื้อที่ลดลงแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการกลับมาเจริญได้ใหม่โดยสมบูรณ์เช่นเดียวกันกับการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ในส่วนของการเจริญของเฟจเมื่อบ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจอยู่รอดได้ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงในทุกชุดการทดลอง

<b>Pretreatment</b>	<b>Posttreatment</b>
Cocktail 1: vB_AdhS_TS3 (MOI 0.1) + vB_AdhM_TS9 (MOI 1)	Cocktail 1: vB_AdhS_TS3 (MOI 10) + vB_AdhM_TS9 (MOI 1)
Cocktail 2: vB_AdhS_TS3 (MOI 0.1) + vB_AdhM_DL (MOI 0.1)	Cocktail 2: vB_AdhS_TS3 (MOI 10) + vB_AdhM_DL (MOI 1)
Cocktail 3: vB_AdhM_TS9 (MOI 1) + vB_AdhM_DL (MOI 0.1)	Cocktail 3: vB_AdhM_TS9 (MOI 1) + vB_AdhM_DL (MOI 1)



ภาพประกอบ 22 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment โดยใช้แบบผสม Cocktail 1, Cocktail 2 และ Cocktail 3

(การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment (A) และแบบ post-treatment (B) โดยใช้ Cocktail 1, Cocktail 2 และ Cocktail 3 กราฟแท่งแสดงการลดลงของเชื้อ และกราฟเส้นแสดงปริมาณของเชื้อ ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ตัวอักษรภายในกราฟแสดงถึงความแตกต่าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ one way-ANOVA พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P < 0.05$ )

## 17. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำร่วมกับเฟจแบบผสม

จากการทดสอบก่อนหน้าพบว่า การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวและแบบผสมให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง โดยเฟจแบบผสมจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงกว่าเฟจแบบเดี่ยว อย่างไรก็ตามในการยับยั้งเชื้อของเฟจแบบผสมยังมีการกลับมาเจริญใหม่ที่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยใช้เฟจแบบผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำ ซึ่งจะต้องทำการหาค่า MIC ของเชื้อ *A. dhakensis* AM ก่อน จากนั้นจึงแบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองคือ การทดสอบการยับยั้งเชื้อเบื้องต้นในขนาด 200 ไมโครลิตร และการทดสอบการยับยั้งเชื้อขนาด 20 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment เช่นเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้า

### 17.1 การหาค่า minimal inhibitory concentration หรือ MIC ของยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM

จากการทดลองหาค่า MIC ของยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM พบว่า ค่า MIC ของยา amoxicillin ในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM มีค่าเท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทดลองต่อไปจะใช้ค่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ( $\frac{1}{2}$  MIC) เพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ

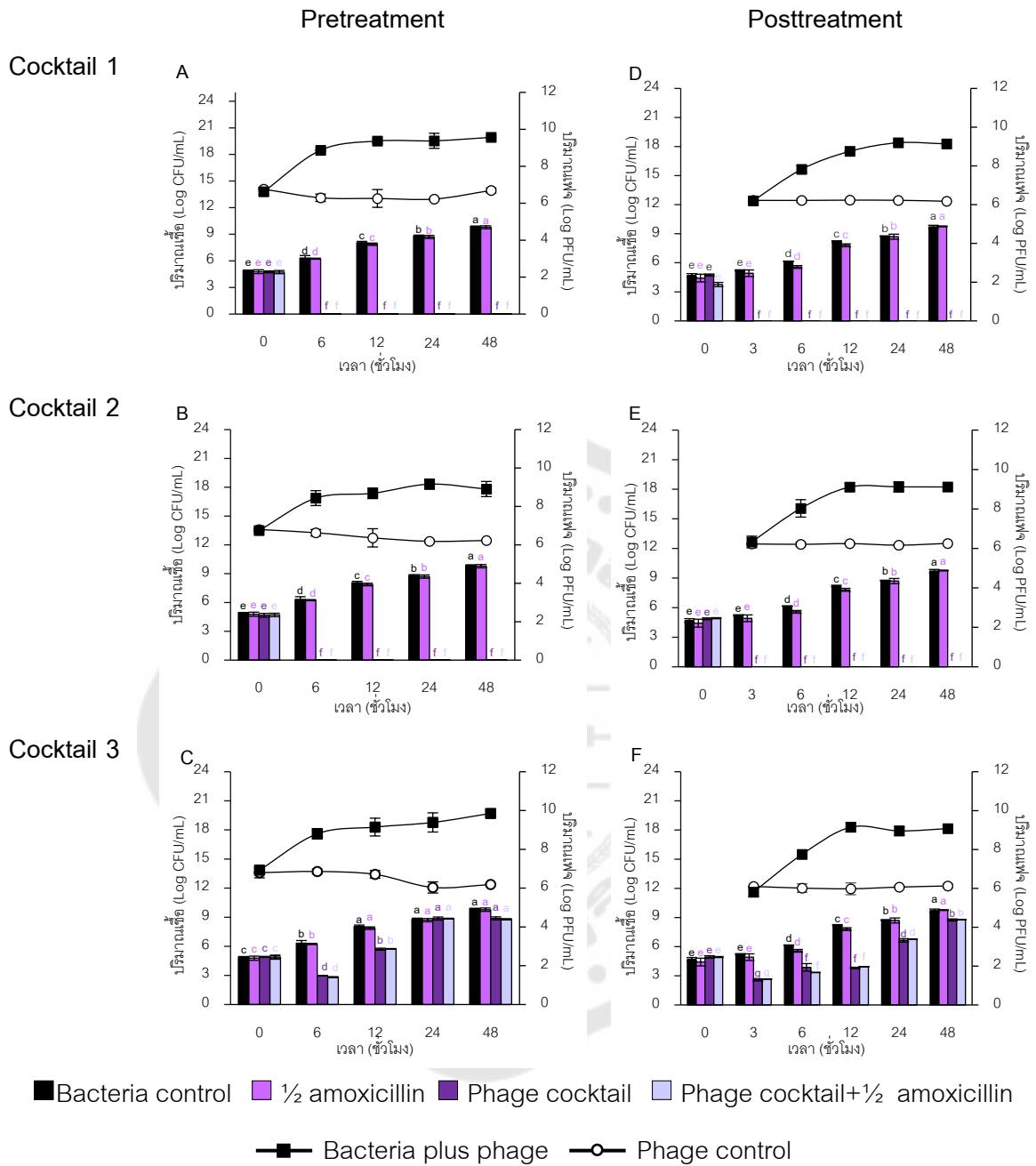
### 17.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดำเนินการโดยใช้ชุดการป่มเชื้อเพียงอย่างเดียว (Bacteria control), ชุดการป่มเชื้อแบบใช้ยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว ( $\frac{1}{2}$  amoxicillin), ชุดการป่มเชื้อกับเฟจแบบผสม (Phage cocktail) และชุดการป่มเชื้อระหว่างเฟจแบบผสมกับยาปฏิชีวนะ (Phage cocktail+ $\frac{1}{2}$  amoxicillin) ซึ่งในแต่ละชุดการป่มจะกำหนดเฟจแบบผสมที่แตกต่างกันคือ Cocktail 1, Cocktail 2 และ Cocktail 3 แสดงดังภาพประกอบ 23 จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ในชุดการทดลอง Cocktail 1 (ภาพประกอบ 23A) และชุดการทดลอง Cocktail 2 (ภาพประกอบ 23B) พบว่า ชุดการป่มเชื้อกับเฟจแบบผสม และชุดการป่มเชื้อระหว่างเฟจแบบผสมกับยาปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งเชื้อได้ตลอด 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการป่มเชื้อเพียงอย่างเดียว และชุดการป่มเชื้อแบบใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกันกับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ในชุดการทดลอง

Cocktail 1 (ภาพประกอบ 23D) และชุดการทดลอง Cocktail 2 (ภาพประกอบ 23E) สามารถยับยั้งเชื้อได้ตลอด 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดการบ่มเชื้อเพียงอย่างเดียว และชุดการบ่มเชื้อแบบใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ชุดการทดลอง Cocktail 3 ทั้งในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment (ภาพประกอบ 23C) และการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment (ภาพประกอบ 23F) พบว่า ชุดการบ่มเชื้อกับเฟจแบบผสม และชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจแบบผสมกับยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อได้ถึง 12 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับชุดการบ่มเชื้อเพียงอย่างเดียว และชุดการบ่มเชื้อแบบใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว ในส่วนของการเจริญของเฟจเมื่อบ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงจึงสรุปได้ว่า ชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจ Cocktail 1 กับยาปฏิชีวนะ และชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจ Cocktail 2 กับยาปฏิชีวนะ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร

### 17.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม

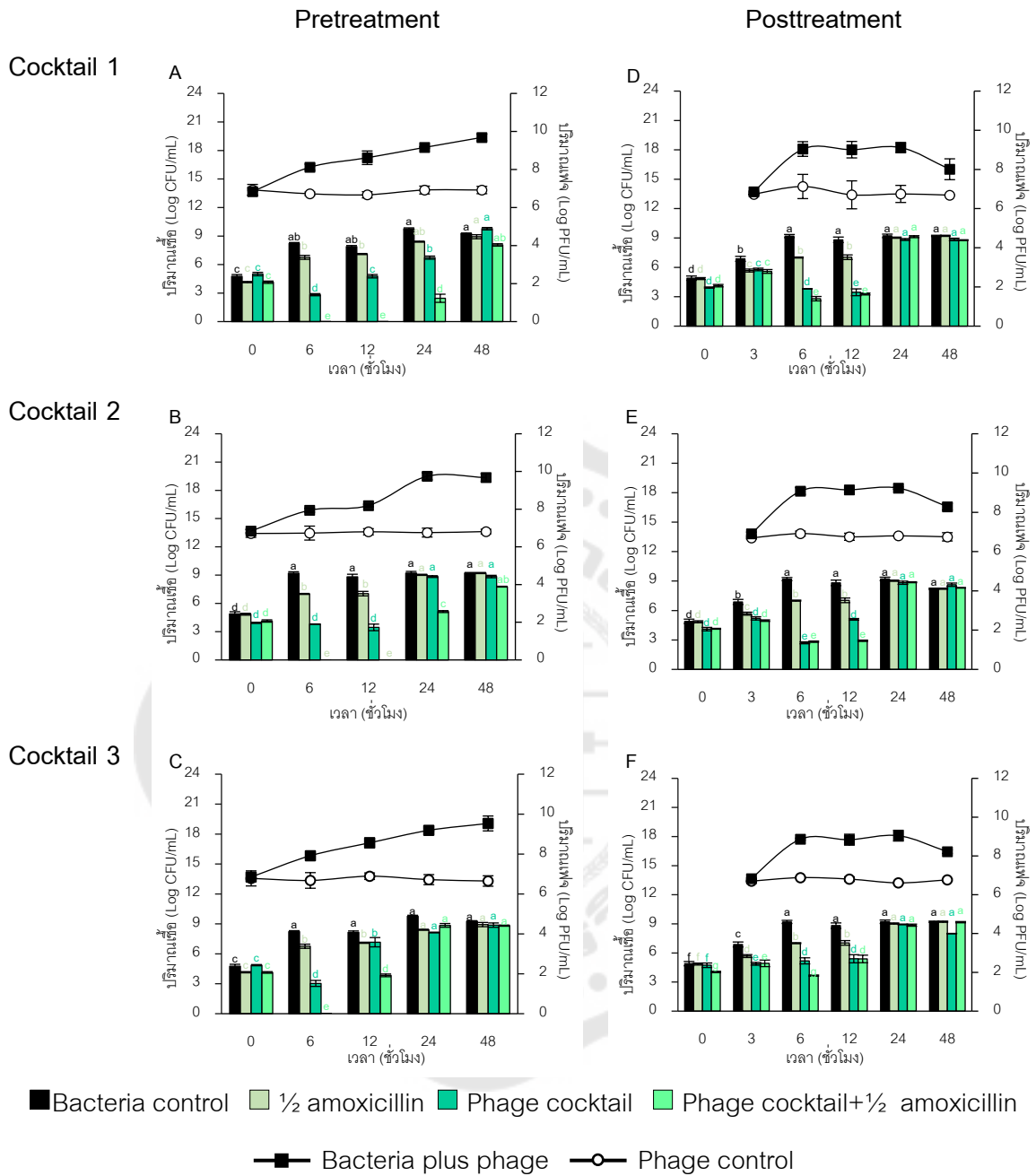
ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดำเนินการเช่นเดียวกับปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 26 พบว่า การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ในชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจแบบผสม Cocktail 1 (ภาพประกอบ 24A) และ Cocktail 2 (ภาพประกอบ 24B) กับยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่ชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจแบบผสม Cocktail 3 กับยาปฏิชีวนะของชุดการทดลอง (ภาพประกอบ 24C) สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียง 12 ชั่วโมง โดยที่เวลา 6 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่จำนวนเชื้อลดลงมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่า มีการกลับมาเจริญของเชื้อใหม่จนถึง 48 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดสอบการยับยั้งแบบ pre-treatment ส่วนในการยับยั้งเชื้อแบบ post-treatment ในชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจแบบผสม Cocktail 1 (ภาพประกอบ 24D), Cocktail 2 (ภาพประกอบ 24E) และ Cocktail 3 (ภาพประกอบ 24F) กับยาปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียง 12 ชั่วโมงแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในส่วนของการเจริญของเฟจเมื่อบ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจสามารถเพิ่มจำนวนและอยู่รอดได้ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมง จึงสรุปได้ว่า การยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้ยา amoxicillin ในระดับ  $\frac{1}{2}$  MIC ร่วมกับเฟจ Cocktail 1 หรือร่วมกับเฟจ Cocktail 2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 23 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM แบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

(การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กราฟแท่งแสดงปริมาณเชื้อ และกราฟเส้นแสดงปริมาณของเฟจ ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนกลุ่มของตัวอย่างที่มีความแตกต่าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ one way-ANOVA พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P < 0.05$ )





ภาพประกอบ 24 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM แบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

(การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กราฟแท่งแสดงปริมาณเชื้อ และกราฟเส้นแสดงปริมาณของเฟจ ข้อมูลแต่ละช่วงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนกลุ่มของตัวอย่างที่มีความแตกต่าง ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ one way-ANOVA พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Turkey test โดยกำหนดนัยสำคัญที่  $P < 0.05$ )

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* sp. จากตัวอย่างน้ำต่าง ๆ ได้แก่ คลองแสนแสบ คลองเปรมประชากร แม่น้ำเจ้าพระยา และจากตัวอย่างปลาที่วางขายในตลาดคลองเตย ตลาดห้วยขวาง และซูเปอร์มาร์เก็ต พบว่า สามารถแยกไอโซเลทที่คาดว่าเป็น *Aeromonas* sp. ได้ทั้งสิ้น 78 ไอโซเลท โดยสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานไว้ว่าเชื้อ *Aeromonas* sp. อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ โดยสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากบริเวณผิวน้ำ น้ำบาดาล น้ำดื่ม น้ำบำบัดน้ำทะเล และน้ำชลประทาน<sup>(81)</sup> โดยบางชนิดสามารถก่อโรคในคน ปลา และสัตว์น้ำอื่น ๆ เช่น *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. veronii* biovar *sobria* โดยเฉพาะ *A. hydrophila* เป็นสปิชีส์ที่ก่อให้เกิดโรค MAS ที่รุนแรง<sup>(22)</sup> แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการรายงานไว้ว่า เชื้อ *A. dhakensis* เป็นเชื้อที่อุบัติใหม่ที่ทำให้เกิดโรคติดต่อจากสัตว์ซึ่งสายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงและเสียชีวิตในมนุษย์<sup>(7-13)</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Chen และคณะ<sup>(23)</sup> เปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของ *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *A. caviae* และ *A. veronii* ยืนยันว่า *A. dhakensis* มีความรุนแรงมากกว่า *A. hydrophila*

ไอโซเลทที่คาดว่าเป็น *Aeromonas* sp. ทั้ง 78 ไอโซเลท มีลักษณะติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น จึงนำมาจัดจำแนกเชื้อต่อด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมีโดยเพิ่มการทดสอบการใช้น้ำตาล แอล-อะราบิโนส และซาลิซิน เพื่อแยก *A. dhakensis* ออกจาก *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *A. hydrophila* subsp. *ranae*<sup>(7, 29)</sup> พบว่า มีเพียง 6 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท AM, NGP8, TP3, KSS5, AK3 และ SBKN4 ที่คาดว่าเป็นเชื้อ *A. dhakensis*

เชื้อ *Aeromonas* ทั้ง 6 ไอโซเลท ถูกนำมาจำแนกสปิชีส์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่า *Aeromonas* sp. AM มีความคล้ายคลึงกับ *A. dhakensis* strain P21 ร้อยละ 99.93 การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ *A. dhakensis* AM โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิของ neighbor-joining พบว่า *A. dhakensis* AM ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกับ *A. dhakensis* BLTWB IITG (MT474858.1)

เชื้อ *A. dhakensis* ถูกรายงานเป็นครั้งแรกในปี 2002 (เดิมมีชื่อว่า *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*) โดย Huys และคณะ<sup>(7)</sup> จากการแยกเชื้อได้จากเด็กที่เป็นโรคอุจจาระร่วงในเมือง Dhaka ประเทศบังคลาเทศ และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม *A. hydrophila* DNA hybridization group BD-2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *A. hydrophila* DNA hybridization group (HG) 1 ต่อมาในปี 2019 Martinez-Murcia และคณะ<sup>(34)</sup> พบว่า *A. hydrophila* subsp.

*dhakensis* จัดอยู่ในอนุกรมวิธานเดียวกันกับ *A. aquariorum* จากการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับ *rpoD* และ *gyrB* ในปี 2013 Beaz-Hidalgo และคณะ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จากยีน 16S rRNA, *rpoD* หรือ *gyrB* และการวิเคราะห์ multilocus phylogenetic analysis จากการศึกษายืนยันได้ว่า *A. aquariorum* และ *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* จัดอยู่ในอนุกรมวิธานเดียวกันและแตกต่างจากอนุกรมวิธานของ *A. hydrophila* ดังนั้น *A. aquariorum* และ *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* ถูกจัดใหม่เป็น *A. dhakensis* sp. nov. comb nov.<sup>(14)</sup> จากงานวิจัยนี้ การจัดจำแนกเชื้อ *A. dhakensis* AM โดยการวิเคราะห์ลำดับของ 16S rRNA gene เพียงอย่างเดียว ในปัจจุบันนั้นไม่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ *Aeromonas* ระดับสปีชีส์<sup>(33)</sup> ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* AM ด้วยวิธี next generation sequencing เพื่อยืนยันว่าเชื้อ *A. dhakensis* AM จัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อ *A. dhakensis* ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดสามารถยืนยันเชื้อ *A. dhakensis* ถึงระดับของสปีชีส์ และแสดงให้เห็นว่า *A. dhakensis* หลายสายพันธุ์ได้รับการจัดจำแนกผิดว่าเป็น *A. hydrophila*<sup>(82, 83)</sup>

จากการวิเคราะห์หาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* AM พบว่ามีจีโนมขนาด 4,602,485 คู่เบส และมีค่า G+C content อยู่ที่ 61.9% และจากการค้นหาและทำนายหน้าที่ของยีนพบว่า มียีนที่สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีนทั้งหมด 4,256 ยีน ในการวิเคราะห์ตำแหน่งยีนดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. dhakensis* AM พบแนวโน้มที่จะดื้อยาปฏิชีวนะ โดยอาศัยกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ 3 กลไก ได้แก่ กลไกการขับยาปฏิชีวนะ กลไกการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาปฏิชีวนะโดยเอนไซม์ และกลไกการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

กลไกการขับยาปฏิชีวนะกลุ่ม resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump มีบทบาทสำคัญในการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแกรมลบ<sup>(84)</sup> สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2022 ของ Okafor และคณะ ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* Igbk พบยีน *adeF* และ *rsmA*<sup>(85)</sup> ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการขับยาปฏิชีวนะ ส่วนกลไกการขับยาปฏิชีวนะกลุ่ม major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump พบความเหมือนกับยีน *tet(E)* ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าเป็นยีนที่ดื้อต่อยา tetracycline ที่กระจายในเชื้อ *Aeromonas* มากที่สุด<sup>(86, 87)</sup> และกลไกการขับยาปฏิชีวนะกลุ่ม small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump พบความเหมือนกับยีน *qacJ* ซึ่งเป็นยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำให้ทนต่อสารในกลุ่ม quaternary ammonium compounds (QACs) ส่งผลให้มีการติดเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* จริงในน้ำ<sup>(88)</sup> กลไกการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งออกฤทธิ์ของ

ยาปฏิชีวนะ พบความเหมือนกับ *E. coli* EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin (elfamycin resistant EF-Tu) สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2023 ของ Canellas และคณะ<sup>(89)</sup> ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. hydrophila* 34SFC-3 โดยพบลักษณะดังกล่าวเช่นเดียวกันส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา elfamycin

กลไกการทำลายหรือเปลี่ยนโครงสร้างของยาปฏิชีวนะโดยเอนไซม์ พบความเหมือนกับเอนไซม์ AQU beta-lactamase ที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนโดยยีน *bla*<sub>AQU-2</sub> จัดอยู่ในคลาส C  $\beta$ -lactamase หรือ cephalosporinase ซึ่งมีรายงานแล้วว่าพบในเชื้อ *A. dhakensis* ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อกลุ่มยา cephalosporins<sup>(90)</sup> นอกจากนี้พบเอนไซม์ OXA beta-lactamase (OXA-726) จัดอยู่ในคลาส D  $\beta$ -lactamase หรือ oxacillinase ที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนโดยยีน *bla*<sub>OXA-726</sub> พบในเชื้อ *A. dhakensis* เช่นกัน<sup>(85)</sup> เอนไซม์ทั้งสองนี้ถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซม (chromosome) โดยกลไกการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -lactamase เป็นกลไกการดื้อยาที่พบได้บ่อยและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบ<sup>(91)</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อที่มียีนควบคุมการสร้าง beta-lactamase จะมีลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งคือ ในตอนแรกเชื้อจะสร้างเอนไซม์ออกมาไม่มาก แต่เมื่อมีถูกกระตุ้นจากยาปฏิชีวนะจะสามารถสร้างปริมาณเอนไซม์ออกมาให้มากขึ้นได้ โดยเชื้อจะสร้าง beta-lactamase ออกมา ซึ่งยาที่สามารถเป็นตัวกระตุ้นที่ดีในการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้แก่ amoxicillin, ampicillin, benzylpenicillin, cefazolin และ cephalothin<sup>(91)</sup>

จากการทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* AM ต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้ E-test strip พบว่า เชื้อ *A. dhakensis* AM ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ amoxicillin และ ampicillin สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2020 ของ Zdanowicz และคณะ<sup>(92)</sup> ทำการคัดแยกเชื้อ *Aeromonas* พบว่า 96-99% ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ amoxicillin, ampicillin, clindamycin และ penicillin. ซึ่งยาปฏิชีวนะเหล่านี้จัดเป็นกลุ่ม  $\beta$ -lactam มีความเป็นพิษต่ำจึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย<sup>(93)</sup> โดยการทำงานของยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นในการเจริญของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยยาปฏิชีวนะจะเข้าขัดขวางกระบวนการ transpeptidation ซึ่งในกระบวนการนี้จะเชื่อม peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรียเข้าด้วยกัน<sup>(94)</sup> การดื้อยาของเชื้อ *Aeromonas* ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม  $\beta$ -lactam เกิดจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่  $\beta$ -lactamase, acylase, และ penicillinase ซึ่งทำลายพันธะเอไมด์ของ  $\beta$ -lactam ring ในโครงสร้างยาปฏิชีวนะ<sup>(95, 96)</sup> ด้วยความสามารถในการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ เชื้อ *Aeromonas* จึงสามารถดื้อยาปฏิชีวนะเหล่านั้นได้ ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *A. dhakensis* AM ต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้ E-test strip ยังสอดคล้องกับการวิเคราะห์ตำแหน่งยีนดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A.*

*dhakensis* AM ซึ่งพบยีน  $bla_{AQU-2}$  และ  $bla_{OXA-726}$  ที่สามารถแปลรหัสไปเป็นเอนไซม์ AQU  $\beta$ -lactamase และ OXA  $\beta$ -lactamase พบได้ในเชื้อ *A. dhakensis* <sup>(85, 90)</sup>

การติดเชื้อ *Aeromonas* จะแสดงลักษณะอาการของโรคที่หลากหลายและเกิดจากความผิดปกติจากปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดโรคช่วยให้เชื้อ *Aeromonas* สามารถหลุดรอดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์และเกิดการติดเชื้อ ได้แก่ ความสามารถในการเกาะติดเซลล์ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของการเริ่มต้นการติดเชื้อ เมื่อเชื้อเข้าเกาะกับเนื้อเยื่อของโฮสต์แล้ว เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่บริเวณนั้น <sup>(39)</sup> โดยผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อ *A. dhakensis* AM มีโครงสร้างที่ทำให้เกิดโรคในขั้นตอนนี้ ได้แก่ Mannose-sensitive hemagglutinin pilus, polar flagella, Tap type IV pili และ Type I fimbriae ในส่วนของระบบการขนส่งโปรตีนในเชื้อ *A. dhakensis* AM พบระบบ T2SS และ T6SS ซึ่งทั้งสองระบบมีส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อสามารถก่อโรคที่รุนแรงได้ โดยระบบ T2SS จะหลังโปรตีน aerolysin-related cytotoxic enterotoxin สามารถทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงและการติดเชื้อที่บาดแผลลึกในหนูได้ <sup>(42)</sup>

<sup>43)</sup> ส่วนระบบ T6SS จะหลังโปรตีน hemolysin coregulated protein ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์โฮสต์โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase 3 ทำให้การทำงานของแกรนูโลไซตบัพรวงจึงทำให้เกิดการติดเชื้อ <sup>(45, 46)</sup>

นอกจากนี้เชื้อ *Aeromonas* ที่ก่อโรคสามารถสร้างเอนไซม์หรือสารพิษ เช่น gelatinase, protease, amylase, lipase, phospholipase, cytotoxin, hemolysin และ aerolysin เป็นต้น <sup>(39, 41, 97-103)</sup> โดยผลการวิเคราะห์ เชื้อ *A. dhakensis* AM พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษ ได้แก่ aerolysin, extracellular hemolysin, hemolysin, hemolysin III, the repeat in toxin, thermostable hemolysin และ exotoxin A โดย aerolysin จัดเป็น virulence markers ที่สำคัญในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *Aeromonas* ที่ก่อโรค สร้างจากยีนที่มีชื่อว่า *aerA* <sup>(97)</sup> นอกจากนี้เชื้อ *A. dhakensis* AM ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง capsule การนำเข้าธาตุเหล็ก ได้แก่ acinetobactin ที่ถูกควบคุมโดย 2 ยีน คือ *basB* และ *basG* ในส่วนของกาวิเคราะห์ตำแหน่ง prophage บนจีโนมพบว่ามี 5 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นเฟจที่ไม่สมบูรณ์ และไม่พบพลาสมิดในจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

จากการวิเคราะห์หาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *A. dhakensis* AM อาจสรุปได้ว่าเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะและมีความสามารถในการก่อโรค จึงนำเชื้อ *A. dhakensis* AM ที่แยกได้เป็นโฮสต์ในการคัดแยกเฟจ โดยเฟจส่วนใหญ่มักจะถูกแยกได้จากแหล่งเดียวกับโฮสต์อาศัยอยู่ <sup>(104)</sup> และ *A. dhakensis* มีถิ่นอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำในธรรมชาติ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเก็บตัวอย่างน้ำจาก

แหล่งต่าง ๆ ที่คาดว่าไฮสโตอาศัยอยู่ จากการทดสอบพบว่า มีเฟจที่จำเพาะกับ *A. dhakensis* AM ทั้งหมด 20 ตัว พบเฟจเพียง 4 ตัว ที่มีลักษณะของพลาโคเป็นพลาโคไลซึ่งจัดเป็นไลติคเฟจ และให้ปริมาณเฟจภายหลังจากการเพิ่มจำนวนมากกว่า  $10^{11}$  PFU/mL คือ เฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 จากนั้นเฟจทั้ง 4 ตัวจึงถูกนำไปศึกษาความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ *Aeromonas* สายพันธุ์อื่น ได้แก่ *A. dhakensis*, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. trota* และ *A. veronii* พบว่า เฟจทั้ง 4 ตัว มีความจำเพาะในการติดเชื้อ *A. dhakensis* เท่านั้น ซึ่งการติดเชื้อของเฟจที่แคบจะไม่ทำลายเชื้อที่เป็นประโยชน์และเชื้อประจำถิ่น<sup>(64)</sup> และโดยทั่วไปแล้วเฟจมักจะมีความสามารถในการติดเชื้อที่แคบและส่วนใหญ่มักจะจำเพาะกับไฮสโตตัวเองเท่านั้น<sup>(105, 106)</sup>

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจพบว่าเฟจ vB\_AdhS\_TS3 และ vB\_AdhS\_M4 ส่วนหัวมีขนาด 75.2 และ 64.8 นาโนเมตร และมีส่วนหางที่ยาวเท่ากับ 225.3 และ 185.4 นาโนเมตร ตามลำดับ รูปร่างของเฟจดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเฟจอยู่ใน Family *Siphoviridae* และเฟจ vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL ส่วนหัวมีขนาด 85.1 และ 50.04 นาโนเมตร มีหางที่สามารถยืด-หดได้ มี sheath หุ้มรอบหาง และมีโครงสร้างส่วนปลาย เช่น tail fiber, base plate ขนาด 101.4 และ 210.4 นาโนเมตร ตามลำดับ จากรูปร่างของเฟจดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเฟจอยู่ใน Family *Myoviridae* จากการรวบรวมข้อมูล *Aeromonas* phage ของ Islam และคณะ (2021)<sup>(107)</sup> พบว่า ในฐานข้อมูล NCBI มี *Aeromonas* phage ทั้งหมด 65 ตัว โดยเฟจที่ได้รับการเผยแพร่ในวารสารวิชาการ มีเพียง 4 ตัว ที่ถูกจำแนกอยู่ใน Family *Siphoviridae* และมี 25 ตัว อยู่ใน Family *Myoviridae* ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะใช้เชื้อ *A. hydrophila* เป็นไฮสโต

การหาอัตราส่วนของเฟจต่อไฮสโตที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อพบว่า ค่า MOI ที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณเฟจสูงสุดของเฟจทั้ง 4 ตัว เท่ากับ 10 โดยมีความแตกต่างกับค่า MOI อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอัตราส่วนของจำนวนเฟจต่อจำนวนเซลล์เชื้อที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อสอดคล้องกับการศึกษาของ Chandrarathna และคณะ (2020)<sup>(66)</sup> พบว่าการควบคุมเชื้อ *A. hydrophila* ที่ติดต่อหลายชนิดด้วยเฟจ AHP-1 ที่ค่า MOI เท่ากับ 10 แสดงการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ได้สูงกว่าการใช้ยาคลอแรมเฟนิคอล 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้เฟจร่วมกับยาคลอแรมเฟนิคอลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีที่สุด

จากการศึกษากราฟการเจริญของเฟจพบว่า เฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhS\_M4 มีระยะ latent period เท่ากับ 40, 30, 30 และ 50 นาที

ตามลำดับ และสามารถคำนวณ burst size ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9, vB\_AdhM\_DL และ vB\_AdhM\_M4 ได้เท่ากับ 1380, 6300, 1280 และ 253 phages particles/infected cell ตามลำดับ เนื่องจากเฟจที่มีระยะ latent period ที่สั้นและมีค่า burst size ที่มากเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นสำหรับการนำเฟจไปประยุกต์ใช้เป็น phage therapy<sup>(108)</sup> ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

การนำเฟจไปประยุกต์ใช้เป็น phage therapy จำเป็นจะต้องศึกษาความเสถียรของเฟจต่ออุณหภูมิและ pH ซึ่งทั้งสองปัจจัยจึงเป็นตัวกำหนดช่วงการใช้งานของเฟจเมื่อนำไปประยุกต์ใช้<sup>(55)</sup> ในการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิพบว่า เฟจ vB\_AdhS\_TS3 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส ส่วนเฟจ vB\_AdhM\_TS9 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 ถึง 37 องศาเซลเซียส และเฟจ vB\_AdhM\_DL มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 25 ถึง 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 65, 75, และ 100 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเฟจทุกตัวค่อย ๆ ลดลง จนกระทั่งอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ไม่พบการอยู่รอดของเฟจทั้ง 3 ตัว สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่า อุณหภูมิที่สูงอาจทำให้แคปซิดซึ่งเป็นโปรตีนของเฟจเสื่อมสภาพได้ นอกจากนี้ อุณหภูมิยังเป็นตัวกำหนดความมีชีวิตรอด การเก็บรักษา และการเพิ่มจำนวนของเฟจ<sup>(55)</sup>

จากการศึกษาความเสถียรต่อ pH พบว่าเฟจ vB\_AdhS\_TS3 มีความเสถียรที่ pH เท่ากับ 6 ถึง 11 ส่วนเฟจ vB\_AdhM\_TS9 มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 6 ถึง 8 ในขณะที่เฟจ vB\_AdhM\_DL มีความเสถียรที่ pH 4 ถึง 11 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่า โดยทั่วไปแล้วการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีอุณหภูมิและ pH อยู่ในระดับกลาง<sup>(56)</sup> การศึกษาเกี่ยวกับไลติคเฟจมักจะแสดงให้เห็นว่า pH 6-8 เหมาะสมที่สุดสำหรับเฟจและโปรตีนส่วนใหญ่ ในขณะที่ค่า pH ที่น้อยกว่า 5 และมากกว่า 10 เฟจจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่า<sup>(55)</sup>

จากการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL ก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็น phage therapy พบว่า มีขนาดของจีโนมเท่ากับ 115,560 คู่เบส 115,503 คู่เบส และ 42,388 คู่เบส ตามลำดับ และมีค่า G+C content เท่ากับ 41.10%, 35.34% และ 34.43% ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเฟจ vB\_AdhS\_TS3 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Aeromonas* phage Akh-2 ร้อยละ 81.90 ซึ่งเป็นเฟจที่จัดอยู่ใน family *Siphoviridae*<sup>(109)</sup> เช่นเดียวกันกับเฟจ vB\_AdhS\_TS3 ในขณะที่การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเฟจ

vB\_AdhM\_TS9 และเฟจ vB\_AdhM\_DL กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลมีความคล้ายคลึงกับ *Aeromonas phage phiA047* ร้อยละ 94.43 และ *Aeromonas phage phiA019* ร้อยละ 94.43 ตามลำดับ นอกจากนี้ในจีโนมของเฟจทั้งสามไม่พบยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ไม่ต้องการต่าง ๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่วงจรชีวิตไลโซเจนิค (ยีน integrase ยีน excisionase และยีน CI repressor) ยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ ยีนดื้อยาปฏิชีวนะ และยีนก่อให้เกิดความรุนแรง เมื่อทำการวิเคราะห์ห้วงชีวิตของเฟจทั้งสามโดยใช้โปรแกรม PhageAI พบว่าเฟจ vB\_AdhS\_TS3, vB\_AdhM\_TS9 และ vB\_AdhM\_DL แสดงค่าเป็น Virulent ร้อยละ 99.10%, 90.70% และ 91.21 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเฟจมีวงชีวิตเป็นไลติกเฟจ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเฟจทั้งสามมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็น phage therapy ในการทดสอบต่อไป

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนของโฮสต์กับเฟจหรือ MOI ที่แตกต่างกันในเฟจแต่ละตัว พบว่าการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM สูงสุดที่เวลา 6 ถึง 12 ชั่วโมง และมีการกลับมาเจริญใหม่ของเชื้อภายหลัง 12 ชั่วโมง ทั้งแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment เมื่อพิจารณาถึงการลดจำนวนของ *A. dhakensis* AM โดยใช้เฟจแบบเดี่ยว เพื่อนำไปศึกษาเป็นเฟจแบบผสมในขั้นตอนต่อไป จึงได้เลือก MOI ของเฟจแต่ละตัวที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment ที่ดีที่สุด คือ vB\_AdhS\_TS3 (MOI 0.1) vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1) และ vB\_AdhM\_DL (MOI 0.1) ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลง 5.40, 3.91 และ 6.67 Log CFU/mL ตามลำดับ ในขณะที่แบบ post-treatment ได้ทำการเลือก MOI ของเฟจแต่ละตัวที่ให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด คือ vB\_AdhS\_TS3 (MOI 10) vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1) และ vB\_AdhM\_DL (MOI 1) ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลง 4.68, 4.19 และ 5.25 Log CFU/mL ตามลำดับ ทั้งนี้ในส่วนของปริมาณเฟจทั้งหมดควบคุมและชุดทดลองที่บ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจทั้งสามสามารถอยู่รอดได้จนกระทั่งครบเวลา 48 ชั่วโมง ในการทำ phage therapy การใช้เฟจแบบเดี่ยวอาจไม่เพียงพอต่อทำลายเชื้อ เนื่องจากเฟจส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับโฮสต์สูง ดังนั้นจึงยากที่จะแยกเฟจตัวเดียวที่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อได้กว้าง การใช้เฟจผสมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เข้ามาแก้ปัญหาเฟจที่ติดเชื้อได้แคบของเฟจแบบเดี่ยว<sup>(110)</sup> นอกจากนี้ การใช้เฟจแบบผสมที่ประกอบไปด้วยเฟจที่มีบริเวณ receptor บนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้แก้ปัญหาคาร์ที่เชื้อกลับมาเจริญใหม่อย่างรวดเร็วที่มักพบในการศึกษา phage therapy ได้ดีขึ้น<sup>(111)</sup>

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM โดยใช้เฟจแบบผสมในระดับห้องปฏิบัติการใช้เฟจชุดการทดลอง Cocktail 1 (vB\_AdhS\_TS3 (MOI 0.1) + vB\_AdhM\_TS9



(MOI 1)), Cocktail 2 (vB\_AdhS\_TS3 (MOI 0.1) + vB\_AdhM\_DL (MOI 0.1)) และ Cocktail 3 (vB\_AdhM\_TS9 (MOI 1) + vB\_AdhM\_DL (MOI 0.1)) พบการยับยั้งเชื้อสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อลดลง 5.43 Log CFU/mL, 5.39 Log CFU/mL และ 5.19 Log CFU/mL ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อกลับมาเจริญได้ใหม่ในเวลา 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 48 ชั่วโมงพบว่า ทุกชุดการทดลองไม่พบปริมาณเชื้อที่ลดลงแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการกลับมาเจริญได้ใหม่โดยสมบูรณ์ ในส่วนของปริมาณเฟจในชุดควบคุมและชุดทดลองที่บ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจอยู่รอดได้ตลอดทั้ง 48 ชั่วโมงในทุกชุดการทดลอง สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่า การที่เชื้อกลับมาเจริญใหม่ทั้งในแบบเดี่ยวและแบบผสม เกิดจากเฟจโจมตีเชื้ออย่างต่อเนื่องทำให้เชื้อต้องพัฒนากลไกต่อต้านเฟจโดยการเปลี่ยนแปลง receptor บนผิวเซลล์ เพื่อป้องกันการเข้าเกาะของเฟจที่มีความจำเพาะต่อบริเวณเหล่านี้ หรือแบคทีเรียที่ติดต่อเฟจอาจสร้างแคปซูลหรือผนังเซลล์ให้หนามากขึ้นเพื่อป้องกันการเข้าเกาะของเฟจ<sup>(62)</sup>

จากการยับยั้งเชื้อของเฟจแบบผสมสามารถพบการกลับมาเจริญใหม่ของเชื้อ *A. dhakensis* AM ที่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ต่อมาจึงทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยใช้เฟจแบบผสมร่วมกับยา amoxicillin และเป็นยาปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข<sup>(112)</sup> จากการทดสอบยา amoxicillin มาก่อนหน้านี้โดยใช้ E-test strip พบว่าเชื้อ *A. dhakensis* AM ติดต่อยา amoxicillin เมื่อทำการหาค่า MIC พบว่า มีค่าเท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทดลองต่อไปจะใช้ค่า 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ( $\frac{1}{2}$  MIC) เพื่อลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังมีรายงานก่อนหน้านี้ได้กล่าวว่า การใช้เฟจร่วมกับยาปฏิชีวนะส่งผลให้เฟจมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับยาที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าการยับยั้งเชื้อ<sup>(113-115)</sup> ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในระดับต่ำอาจช่วยให้ไลติกเฟจเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและส่งเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย<sup>(116)</sup>

การทดสอบการยับยั้งเชื้อเบื้องต้นจะทดสอบเพื่อดูแนวโน้มการยับยั้งเชื้อโดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น  $\frac{1}{2}$  MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ก่อนที่จะทำการทดสอบในปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากการทดสอบพบว่า ทั้งแบบ pre-treatment และแบบ post-treatment ชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจ Cocktail 1 กับยาปฏิชีวนะ และชุดการบ่มเชื้อระหว่างเฟจ Cocktail 2 กับยาปฏิชีวนะ มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *A. dhakensis* AM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในขณะที่ชุดการทดลอง Cocktail 3 ทั้งในการทดสอบการยับยั้งและแบบ pre-treatment สามารถยับยั้งเชื้อได้ถึง 12 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นเชื้อสามารถกลับมาเจริญได้ใหม่ ในส่วนของปริมาณเฟจในชุดควบคุมและชุดทดลองที่บ่มร่วมกับเชื้อพบว่า เฟจอยู่รอดได้ตลอดทั้ง 48

ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลอง ต่อมาได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ยา amoxicillin ความเข้มข้น  $\frac{1}{2}$  MIC ร่วมกับเฟจแบบผสม จากการทดสอบพบว่าการยับยั้งเชื้อแบบ pre-treatment โดยใช้ยา amoxicillin ในระดับ  $\frac{1}{2}$  MIC ร่วมกับเฟจ Cocktail 1 หรือร่วมกับเฟจ Cocktail 2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* AM ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่า เชื้อสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ที่ติดต่อกับเฟจจะมีการพัฒนาการต่อต้านเฟจผ่านกลไกต่าง ๆ<sup>(62)</sup> หนึ่งในกลไกที่สำคัญคือ การยับยั้งการเข้าเกาะของเฟจซึ่งเป็นกลไกที่มีการรายงานมากที่สุด<sup>(117)</sup> การสูญเสียหรือเปลี่ยนแปลง receptor เป็นอีกกลไกหนึ่งซึ่งทำให้เชื้อสามารถเกิดการกลับไปกลับมาระหว่างการไวและติดต่อกับเฟจหรือยาปฏิชีวนะได้<sup>(118)</sup> เนื่องจาก receptor บนผิวเซลล์เป็นบริเวณที่เฟจเข้าเกาะและเป็นตำแหน่งที่ยาปฏิชีวนะที่จำเพาะต่อผนังเซลล์เข้าทำลายเชื้อ หากเชื้อซึ่งเดิมติดต่อกับยาปฏิชีวนะแต่ไวต่อการติดเชื้อด้วยเฟจ เมื่อเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง receptor เพื่อให้ติดต่อกับเฟจด้วยเฟจ อาจส่งผลให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะได้<sup>(119, 120)</sup> จากการศึกษาครั้งนี้ถือเป็นการศึกษาครั้งแรกในการประยุกต์ใช้เฟจผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อ *A. dhakensis* ซึ่งไม่เพียงแต่จะสามารถลดปริมาณเชื้อได้เท่านั้น แต่ยังสามารถลดปริมาณการให้ยาได้อีกด้วย

จากการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการใช้เฟจทั้งในรูปแบบเดี่ยวและแบบผสมสามารถยับยั้งเชื้อ *A. dhakensis* ในระดับห้องปฏิบัติการได้ โดยเฉพาะการใช้เฟจในรูปแบบผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีและนานที่สุด และยังสามารถลดปริมาณยาปฏิชีวนะที่ใช้ลงอีกด้วย นอกจากนี้การใช้เฟจในรูปแบบผสมร่วมกับยาปฏิชีวนะยังสามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดขึ้นของสายพันธุ์ที่กลายของเชื้อที่ติดต่อกับเฟจหรือติดต่อกับเฟจซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเชื้อสัมผัสกับยาปฏิชีวนะหรือเฟจ ดังนั้นการใช้เฟจร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับ sublethal นี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อที่มีการติดต่อกับยาในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำต่อไป

## บรรณานุกรม

1. Esteve C, Alcaide E, Blasco MD. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes Environ.* 2012;27(4):367-73
2. Jagoda SD, Wijewardana T, Arulkanthan A, Igarashi Y, Tan E, Kinoshita S, et al. Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicemia. *Dis Aquat Organ.* 2014;109(2):127-37.
3. Pérez L, Abarca ML, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ.* 2015;116(1):69-74.
4. Yi SW, You MJ, Cho HS. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Vet Microbiol.* 2013;164(1-2):195-200.
5. Soto-Rodriguez SA, Cabanillas-Ramos J, Alcaraz U, Gomez-Gil B, Romalde JL. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mossellii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *J Appl Microbiol.* 2013;115(3):654-62.
6. Bartie KL, Ngô T, Bekaert M, Dang TH, Hoare R, Adams A, et al. *Aeromonas hydrophila* ST251 and *Aeromonas dhakensis* are major emerging pathogens of striped catfish in Vietnam. *Front Microbiol.* 2022;13:5312.
7. Huys G, Kämpfer P, Albert MJ, Kühn I. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (approved lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(3):705-12.
8. Wu CJ, Wang HC, Chen CS, Shu HY, Kao AW, Chen PL, et al. Genome sequence of a novel human pathogen, *Aeromonas aquariorum*. *J Bacteriol.* 2012;194(15):4114-5.
9. Chen PL, Lamy B, Ko WC. *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen. *Front Microbiol.* 2016;7:793.
10. Khor WC, Pua SM, Koh TH, Tan JA, Puthuchery SD, Chua KH. Comparison of

- clinical isolates of *Aeromonas* from Singapore and Malaysia with regard to molecular identification, virulence, and antimicrobial profiles. *Microb Drug Resist*. 2018;24(4):469-78.
11. Kitagawa H, Ohge H, Yu L, Kayama S, Hara T, Kashiwama S, et al. *Aeromonas dhakensis* is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan. *J Infect Chemother*. 2020;26(2):316-20.
  12. Lau TT, Tan JA, Puthuchearu SD, Pua SM, Chua KH. Genetic relatedness and novel sequence types of clinical *Aeromonas dhakensis* from Malaysia. *Braz J Microbiol*. 2020;51:909-18.
  13. Sun Y, Zhao Y, Xu W, Fang R, Wu Q, He H, et al. Taxonomy, virulence determinants and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from bacteremia in southeastern China. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10:1-9.
  14. Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol*. 2013;36(3):171-6.
  15. Ngo TP, Vu HT, Le TT, Bui HC, Liles MR, Rodkhum C. Comparative genomic analysis of hypervirulent *Aeromonas hydrophila* strains from striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam. *Aquaculture*. 2022;558:738364.
  16. Oliveira J, Castilho F, Cunha A, Pereira MJ. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquac Int*. 2012;20(5):879-910.
  17. Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int*. 2008;34(8):1215-26.
  18. Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Balcázar JL. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends Microbiol*. 2018;26(11):896-903.
  19. Percival SL, Williams DW. Chapter three - *Aeromonas*. 2nd ed. London: Academic

- Press; 2014. 49-64.
20. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. Genus *Aeromonas*. 1994. 190-1.
  21. Austin DA, McIntosh D, Austin B. Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov. Syst Appl Microbiol. 1989;11(3):277-90.
  22. Larry A. Hanson WGH, John P. Hawke. Motile aeromonas septicemia (MAS) in fish. 2019. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Ahmad-Al-Khraisat-2/post/What\\_is\\_the\\_possible\\_treatment\\_for\\_Motile\\_Aeromonas\\_Septicemia\\_in\\_fish/attachment/602cdab002cee40001bd3c07/AS%3A992124426276869%401613552304666/download/SRAC\\_0478.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ahmad-Al-Khraisat-2/post/What_is_the_possible_treatment_for_Motile_Aeromonas_Septicemia_in_fish/attachment/602cdab002cee40001bd3c07/AS%3A992124426276869%401613552304666/download/SRAC_0478.pdf)
  23. Chen PL, Wu CJ, Tsai PJ, Tang HJ, Chuang YC, Lee NY, et al. Virulence diversity among bacteremic *Aeromonas* isolates: *Ex vivo*, animal, and clinical evidences. PLoS One. 2014;9(11):e111213.
  24. Santos Y, Toranzo AE, Dopazo CP, Nieto TP, Barja JL. Relationships among virulence for fish, enterotoxigenicity, and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*. Aquaculture. 1987;67(1):29-39.
  25. Martin-Carnahan A, Joseph SW. Aeromonadales ord. nov.. In: Garrity GM, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Boston: Springer; 2005. p. 556-587.
  26. Carriero MM, Mendes Maia A, Moro Sousa R, Henrique-Silva F. Characterization of a new strain of *Aeromonas dhakensis* isolated from diseased pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in Brazil. J Fish Dis. 2016;39(11):1285-95.
  27. Soler L, Marco F, Vila J, Chacón MR, Guarro J, Figueras MJ. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp.. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5732.
  28. Lamy B, Laurent F, Verdier I, Decousser JW, Lecaillon E, Marchandin H, et al. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(1):9-14.
  29. Huys G, Pearson M, Kampfer P, Denys R, Cnockaert M, Inglis V, et al. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in

- Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(3):885-91.
30. Awan F, Dong Y, Liu J, Wang N, Mushtaq MH, Lu C, et al. Comparative genome analysis provides deep insights into *Aeromonas hydrophila* taxonomy and virulence-related factors. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1-18.
31. da Silva Filho AC, Marchaukoski JN, Raittz RT, De Pierri CR, de Jesus Soares Machado D, Fadel-Picheth CMT, et al. Prediction and analysis *in silico* of genomic islands in *Aeromonas hydrophila*. *Front Microbiol*. 2021;12:769380.
32. Aravena-Román M, Harnett GB, Riley TV, Inglis TJ, Chang BJ. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):3006-8.
33. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2761-4.
34. Martínez-Murcia A, Monera A, Alperi A, Figueras MJ, Saavedra MJ. Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov.. *Curr Microbiol*. 2009;58:76-80.
35. Wu CJ, Tsai PJ, Chen PL, Wu IC, Lin YT, Chen YH, et al. *Aeromonas aquariorum* septicemia and enterocolitis in a cirrhotic patient. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74(4):406-8.
36. Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, López-Alvarez M, Lara E, et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34(3):189-99.
37. Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, Rosteghin M, Manfrin A, Patarnello T, et al. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(14):4986-5000.
38. Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A, Lamy B. Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):1-23.
39. Tomás JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors. *Int Sch Res Notices*

2012;2012:256261.

40. Morinaga Y, Yanagihara K, Eugenin FL, Beaz-Hidalgo R, Kohno S, Salvat MJ. Identification error of *Aeromonas aquariorum*: a causative agent of septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(1):106-9.
41. Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect*. 1999;1(13):1129-37.
42. Xu XJ, Ferguson MR, Popov VL, Houston CW, Peterson JW, Chopra AK. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infect Immun*. 1998;66(8):3501-9.
43. Sha J, Kozlova E, Chopra A. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*. 2002;70(4):1924-35.
44. Sha J, Wang S, Suarez G, Sierra J, Fadl A, Erova T, et al. Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*—part I. *Microb Pathog*. 2007;43(4):127-46.
45. Suarez G, Sierra JC, Sha J, Wang S, Erova TE, Fadl AA, et al. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog*. 2008;44(4):344-61.
46. Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, Chopra AK. Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. *Microbiology*. 2010;156(12):3678.
47. Suarez G, Sierra J, Erova T, Sha J, Horneman A, Chopra A. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol*. 2010;192(1):155-68.
48. Ponnusamy D, Kozlova EV, Sha J, Erova TE, Azar SR, Fitts EC, et al. Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(3):722-7.
49. Mosser T, Talagrand-Reboul E, Colston SM, Graf J, Figueras MJ, Jumas-Bilak E, et al. Exposure to pairs of *Aeromonas* strains enhances virulence in the *Caenorhabditis*

- elegans* infection model. Front Microbiol. 2015;6:1218.
50. McGrath S, Sinderen DV, editors. Bacteriophage: Genetics and molecular biology. Caister Academic Press; 2007.
51. Nobrega F, Vlot M, Jonge P, Dreesens L, Beaumont H, Lavigne R, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. Nat Rev Microbiol. 2018;16(12):760-773.
52. Doss J, Culbertson K, Hahn D, Camacho J, Barekzi N. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. Viruses. 2017;9(3):50.
53. Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. Curr Opin Microbiol. 2015;23:171–8.
54. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 4th ed. Dubuque, Wm.C. Brown Publishers; 1996. p. 498-500.
55. Kowalska JD, Kazimierczak J, Sowinska PM, Wójcik EA, Siwicki AK, Dastyk J. Growing trend of fighting infections in aquaculture environment—opportunities and challenges of phage therapy. Antibiotics. 2020;9(6):301.
56. Silva YJ, Costa L, Pereira C, Cunha Â, Calado R, Gomes NCM, et al. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. Microb Biotechnol. 2014;7(5):401–13.
57. Boyd EF, Brüßow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. Trends Microbiol. 2002;10(11):521-9.
58. Wang JB, Yu MS, Tseng TT, Lin LC. Molecular characterization of Ahp2, a lytic bacteriophage of *Aeromonas hydrophila*. Viruses. 2021;13(3):477.
59. Pallavi B, Puneeth TG, Shekar M, Girisha SK. Isolation, characterization and genomic analysis of vB-AhyM-AP1, a lytic bacteriophage infecting *Aeromonas hydrophila*. J Appl Microbiol. 2021;131(2):695-705.
60. Cheng Y, Gao D, Xia Y, Wang Z, Bai M, Luo K, et al. Characterization of novel bacteriophage AhyVDH1 and its lytic activity against *Aeromonas hydrophila*. Curr Microbiol. 2021;78(1):329-37.



61. Dien LT, Ky LB, Huy BT, et al. Characterization and protective effects of lytic bacteriophage pAh6.2TG against a pathogenic multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transbound Emerg Dis*. 2021; 69(4):e435-50.
62. Azam A, Tanji Y. Bacteriophage-host arm race: An update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:2121-31.
63. Divya Ganeshan S, Hosseinidoust Z. Phage therapy with a focus on the human microbiota. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):131.
64. Fernández L, Gutiérrez D, García P, Rodríguez A. The perfect bacteriophage for therapeutic applications-a quick guide. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):126.
65. Ssekatawa K, Byarugaba DK, Kato CD, Wampande EM, Ejobi F, Tweyongyere R, et al. A review of phage mediated antibacterial applications. *Alexandria J Med*. 2021;57(1):1-20.
66. Chandrarathna H, Nikapitiya C, Dananjaya S, De Silva B, Heo G-J, De Zoysa M, et al. Isolation and characterization of phage AHP-1 and its combined effect with chloramphenicol to control *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol*. 2020;51:409-16.
67. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
68. Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. USA: Wiley; 1991.
69. Dong H, Techatanakitarnan C, Jindakittikul P, Thaiprayoon A, Taengphu S, Charoensapsri W, et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Dis*. 2017;40(10):1395-403.
70. Brown J, Pirrung M, McCue LA. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*. 2017;33(19):3137-9.

71. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.
72. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068-9.
73. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TT, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D517-D25.
74. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16-W21.
75. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(suppl\_2):W347-W52.
76. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903.
77. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:1-9.
78. Grant JR, Stothard P. The cgview server: The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(suppl\_2):W181-W4.
79. Tynecki P, Guzinski A, Kazimierczak J, Jadczyk M, Dastyk J, Onisko A. PhageAI- bacteriophage life cycle recognition with machine learning and natural language processing. *bioRxiv.* 2020:2020-07
80. Chan PP, Lowe TM. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences. In: Kollmar M, editor. *Gene prediction: methods and protocols.* New York: Springer; 2019. p. 1-14.
81. Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms.* 2020;8(1):129.
82. Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Gogarten JP, Graf J. Bioinformatic genome

- comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio*. 2014;5(6):e02136-14.
83. Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ, Liles MR, Figueras M-J. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115813.
84. Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resist Updat*. 2016;28:13-27.
85. Okafor AC, Ogbo FC, Cabal Rosel A, Stöger A, Akharaiyi FC, Prieto B, et al. Genome sequence of OXA-726-encoding *Aeromonas dhakensis* Igbk (sequence type 1171) from an edible snail traded in Nigeria. *Microbiol Resour Announc*. 2022;11(7):e00343-22.
86. Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(12):5675-82.
87. Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan AA, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(10):6461-6.
88. Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(10):3046-52.
89. Canellas ALB, de Oliveira BFR, Laport MS. Hiding in plain sight: Characterization of *Aeromonas* species isolated from a recreational estuary reveals the carriage and putative dissemination of resistance genes. *Antibiotics*. 2023;12(1):84.
90. Wu C-J, Wang H-C, Chen P-L, Chang M-C, Sun HS, Chou P-H, et al. AQU-1, a chromosomal class C  $\beta$ -lactamase, among clinical *Aeromonas dhakensis* isolates: distribution and clinical significance. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(5):456-61.

91. Bonomo RA.  $\beta$ -lactamases: A focus on current challenges. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(1):a025239.
92. Zdanowicz M, Mudryk ZJ, Perliński P. Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. Vet Res Commun. 2020;44(1):9-18.
93. Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):557-84.
94. Roberts MC. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria of oral and upper respiratory origin. Int J Antimicrob Agents. 1998;9(4):255-67.
95. Guz L, Kozinska A. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). Bull Vet Inst Pulawy. 2004;48:391-5.
96. Saavedra MJ, Guedes-Novais S, Alves A, Rema P, Tacão M, Correia A, et al. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Int Microbiol. 2004;7(3):207-11.
97. Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J Fish Dis. 2013;36(4):371-88.
98. Galindo CL, Gutierrez Jr C, Chopra AK. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. Microb Pathog. 2006;40(2):56-68.
99. Alperi A, Figueras MJ. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 2010;16(10):1563-7.
100. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):35-73.
101. Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomás JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp.. Int J Food Microbiol. 1995;28(2):157-68.
102. Palma-Martínez I, Guerrero-Mandujano A, Ruiz-Ruiz MJ, Hernández-Cortez C, Molina-López J, Bocanegra-García V, et al. Active shiga-like toxin produced by some

- Aeromonas* spp., isolated in Mexico City. *Front Microbiol.* 2016;7:1522.
103. Janda JM. Chapter 59. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Sussman M, editor. *Molecular medical microbiology*. London: Academic Press; 2002. p. 1237-70.
104. Van Charante F, Holtappels D, Blasdel BG, Burrowes BH. Isolation of bacteriophages. In: Harper DR, McConville ML, Abedon ST, Burrowes BH, editors. *Bacteriophages*. Cham: Springer; 2020. p. 1–32
105. Kim JH, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, Park SC. Biological control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *Aeromonas* phage PAS-1. *Transbound Emerg Dis* 2015;62(1):81-6.
106. Nikapitiya C, Dananjaya SH, Chandrarathna HP, Senevirathne A, De Zoysa M, Lee J. Isolation and characterization of multidrug resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and its infecting novel phage ASP-1 from goldfish (*Carassius auratus*). *Indian J Microbiol.* 2019;59:161-70.
107. Islam MS, Yang X, Euler CW, Han X, Liu J, Hossen MI, et al. Application of a novel phage ZPAH7 for controlling multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* on lettuce and reducing biofilms. *Food Control.* 2021;122:107785.
108. Bull JJ, Gill JJ. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. *Front Microbiol.* 2014;5:618.
109. Akmal M, Rahimi-Midani A, Hafeez-ur-Rehman M, Hussain A, Choi T-J. Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens.* 2020;9(3):215.
110. Abedon ST, Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth. *Pharmaceuticals.* 2021;14(10):1019.
111. Li C, Shi T, Sun Y, Zhang Y. A novel method to create efficient phage cocktails via use of phage-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2022;88(6):e02323-21.
112. กลุ่มวิจัยและพัฒนาฯและเคมีภัณฑ์สัตว์น้ำ. แนวปฏิบัติการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างสมเหตุผลในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรม

- ประมง; 2561 [เข้าถึงเมื่อ 15 ธ.ค. 2564]. เข้าถึงได้จาก: <https://www4.fisheries.go.th/index.php/doffile/fkey/ref77348>
113. Tagliaferri TL, Jansen M, Horz H-P. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:22.
114. Shlezinger M, Coppenhagen-Glazer S, Gelman D, Beyth N, Hazan R. Eradication of vancomycin-resistant enterococci by combining phage and vancomycin. *Viruses.* 2019;11(10):954.
115. Moradpour Z, Yousefi N, Sadeghi D, Ghasemian A. Synergistic bactericidal activity of a naturally isolated phage and ampicillin against urinary tract infecting *Escherichia coli* O157. *Iran J Basic Med Sci.* 2020;23(2):257.
116. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch H. Phage-antibiotic synergy (PAS):  $\beta$ -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *Plos One.* 2007;2(8):e799.
117. Buckling A, Brockhurst M. Bacteria–virus coevolution. In: Soyer OS, editor. *Evolutionary systems biology. Advances in experimental medicine and biology.* New York: Springer; 2012. p. 347-70.
118. North OI, Brown ED. Phage–antibiotic combinations: a promising approach to constrain resistance evolution in bacteria. *Ann N Y Acad Sci.* 2021;1496(1):23-34
119. Chan BK, Sistrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2016;6(1):26717.
120. German GJ, Misra R. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. *J Mol Biol.* 2001;308(4):579-85.



## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหาร Nutrient broth (NB)

peptone	5.00	กรัม
beef extract	3.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหาร Nutrient soft agar

peptone	5.00	กรัม
beef extract	3.00	กรัม
agar	7.50	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 3. อาหาร Nutrient agar (NA)

peptone	5.00	กรัม
beef extract	3.00	กรัม
agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



#### 4. อาหาร *Aeromonas* Isolation Medium สำเร็จรูป

peptone, special	5.00	กรัม
yeast extract	3.00	กรัม
L-Lysine hydrochloride	3.50	กรัม
L-Arginine hydrochloride	2.00	กรัม
inositol	2.50	กรัม
lactose	1.50	กรัม
sorbose	3.00	กรัม
xylose	3.75	กรัม
bile salts	3.00	กรัม
sodium thiosulphate	10.67	กรัม
sodium chloride	5.00	กรัม
ferric ammonium citrate	0.80	กรัม
bromothymol blue	0.04	กรัม
thymol blue	0.04	กรัม
agar	12.50	กรัม

ปรับค่า pH เป็น  $8.0 \pm 0.2$

ชั่งอาหาร *Aeromonas* Isolation Medium สำเร็จรูป 28.15 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดเพื่อให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมแอมพิซิลินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร

#### 5. อาหาร Mueller Hinton agar (MHA) สำเร็จรูป

HM infusion B from	300.00	กรัม
acicase	17.50	กรัม
starch	1.50	กรัม
agar	17.00	กรัม
ปรับ pH เป็น $8.0 \pm 0.2$		

ซึ่งอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) สำเร็จรูป 38.0 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. อาหาร Mueller Hinton broth (MHB)

Beef extract powder	2.00	กรัม
Acid digest of casein	17.50	กรัม
starch	1.50	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

## สารเคมี

## 1. สารละลายบัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl	0.1	โมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. สารละลายบัฟเฟอร์ 50X TBE (tris-Borate-EDTA)

Tris- HCl (pH 8)	108.00	กรัม
boric acid	55.00	กรัม
EDTA	9.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อใช้งานให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 1X

## 3. ไลโซไซม์ (lysozyme)

ไลโซไซม์	50.00	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วใช้งานทันที

## 4. สารละลายโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) ร้อยละ 10

โซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต	100	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 5. สารละลายโซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์

โซเดียมอะซิเตท	408.30	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 1M NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น  
ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา  
15 นาที



## ภาคผนวก ค

### การทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลร้อยละ 1.5-2.0 ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเจลมาดูขนาดของผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อได้ขนาดที่ต้องการ นำผลผลิต PCR 1 volume ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ NT1 2 volume ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กที่ไม่ต้องการและการเข้าจับกันเองของไพรเมอร์ (primer dimer) จากนั้นมาใส่ลงใน NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ที่ส่วนไส้ที่อยู่ข้างล่างของ column จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที (รอบที่ 1) ที่ส่วนไส้ที่อยู่ข้างล่างของ column จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที (รอบที่ 2) ที่ส่วนไส้ที่อยู่ข้างล่างของ column จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที กำจัดสารละลาย ethanol ที่อาจตกค้างจากสารละลายบัฟเฟอร์ NT3 จะทำการบ่ม column เป็นเวลา 2-5 นาทีที่ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up column มาวางบนหลอด microcentrifuge ใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย NE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้นี้ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเจลมาดูผลขนาดของผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นตามขั้นตอน 1.2

ภาคผนวก ง

ตาราง 25 ยีนดื้อยาปฏิชีวนะที่พบในจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

RG1 Criteria	ARO Term	Detection Criteria	AMR Gene Family	Drug Class	Resistance Mechanism	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
Strict	adeF	protein homolog model	resistance-nodulation- cell division (RND)	fluoroquinolone antibiotic,	antibiotic efflux	43.71	99.06
			antibiotic efflux pump	tetracycline antibiotic	pump		
Strict	rsmA	protein homolog model	resistance-nodulation- cell division (RND)	fluoroquinolone antibiotic,	antibiotic efflux	92.73	101.64
			antibiotic efflux pump	diaminopyrimidine antibiotic, phenicol antibiotic			

ตาราง 25 (ต่อ)

RGI	ARO Term	Detection Criteria	AMR Gene Family	Drug Class	Resistance Mechanism	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
Strict	AQU-2	protein homolog model	AQU beta-lactamase	cephalosporin	antibiotic inactivation	97.63	100.00
Strict	OXA-726	protein homolog model	OXA beta-lactamase	carbapenem, cephalosporin, penam	antibiotic inactivation	98.48	100.00
Strict	adeF	protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic, tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	47.65	97.64

ตาราง 25 (ต่อ)

RG1 Criteria	ARO Term	Detection Criteria	AMR Gene Family	Drug Class	Resistance Mechanism	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
Strict	tet(E)	protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	99.75	100.00
Strict	qacJ	protein homolog model	small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump	disinfecting agents and antiseptics	antibiotic efflux	36.89	101.87
Strict	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	protein variant model	elfamycin resistant EF-Tu	elfamycin antibiotic	antibiotic target alteration	91.09	96.33



ภาคผนวก จ

ตาราง 26 ยีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อและตำแหน่งที่พบในจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

VF class	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshB</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	56907	57509	603	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshC</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	55891	56400	510	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshD</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	55344	55904	561	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshE</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465030	59511	61199	1689	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshF</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	57656	58117	462	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshG</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	58237	59457	1221	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshI</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	66100	66693	594	-

ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshI</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	66794	67606	813	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshJ</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	65453	66100	648	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshK</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	65134	65397	264	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshL</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	63333	64985	1653	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshM</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	62350	63240	891	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshN</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	61253	62353	1101	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshO</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	54514	55344	831	-
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshP</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	54054	54524	471	-

ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Mannose-sensitive hemagglutinin (Msh) pilus	<i>mshQ</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	50413	54054	3642	-
Adherence	Polar flagella	Undetermined	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	41585	42325	741	+
Adherence	Polar flagella	Undetermined	NODE_24_length_78570_cov_117.161021	66966	67490	525	+
Adherence	Polar flagella	<i>cheA-2</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	36646	38718	2073	+
Adherence	Polar flagella	<i>cheB-2</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	38751	39860	1110	+
Adherence	Polar flagella	<i>cheR-3</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	168703	169335	633	-
Adherence	Polar flagella	<i>cheV</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	169546	170457	912	-
Adherence	Polar flagella	<i>cheW</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	42349	43191	843	+
Adherence	Polar flagella	<i>cheY</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	35378	35761	384	+
Adherence	Polar flagella	<i>cheZ</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	35819	36514	696	+
Adherence	Polar flagella	<i>flaA</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	25119	25976	858	+
Adherence	Polar flagella	<i>flaB</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	26610	27461	852	+
Adherence	Polar flagella	<i>flaG</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	27614	27943	330	+
Adherence	Polar flagella	<i>flaH</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	28022	29380	1359	+
Adherence	Polar flagella	<i>flaJ</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	29406	29828	423	+

ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Polar flagella	<i>flgB</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	168241	168639	399	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgC</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	167822	168160	339	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgD</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	167078	167785	708	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgE</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	165733	167067	1335	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgF</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	164836	165582	747	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgG</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	164033	164821	789	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgH</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	163347	164003	657	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgI</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	162241	163287	1047	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgJ</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	161102	162193	1092	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgK</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	159098	161062	1965	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgL</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	157885	159075	1191	-
Adherence	Polar flagella	<i>flgM</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	171375	171695	321	+
Adherence	Polar flagella	<i>flgN</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	171692	172108	417	+
Adherence	Polar flagella	<i>flhA</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	30164	32248	2085	+
Adherence	Polar flagella	<i>flhB</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	28908	30038	1131	+
Adherence	Polar flagella	<i>flhF</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	32265	33677	1413	+

ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Polar flagella	<i>flhG</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	33679	34554	876	+
Adherence	Polar flagella	<i>fliA</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	34568	35266	699	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljE</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	16428	16745	318	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljF</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	16801	18513	1713	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljG</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	18506	19567	1062	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljH</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	19632	20438	807	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljI</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	20568	21833	1266	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljJ</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	21875	22300	426	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljK</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	22392	24398	2007	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljL</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	24456	24974	519	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljM</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	24984	26054	1071	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljN</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	26106	26498	393	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljO</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	26495	26878	384	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljP</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	26865	27644	780	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljQ</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	27672	27941	270	+
Adherence	Polar flagella	<i>fljR</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	28015	28782	768	+

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Polar flagella	<i>flmD</i>	NODE_24_length_78570_cov_117.161021	64848	66104	1257	-
Adherence	Polar flagella	<i>flmH</i>	NODE_24_length_78570_cov_117.161021	67720	68469	750	+
Adherence	Polar flagella	<i>flrA</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	149056	150402	1347	-
Adherence	Polar flagella	<i>flrB</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	147915	148949	1035	-
Adherence	Polar flagella	<i>flrC</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	146495	147838	1344	-
Adherence	Polar flagella	<i>maf-1</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	30132	32219	2088	+
Adherence	Polar flagella	<i>maf-2</i>	NODE_24_length_78570_cov_117.161021	62507	63802	1296	-
Adherence	Polar flagella	<i>motX</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	230245	230838	594	+
Adherence	Polar flagella	<i>motY</i>	NODE_2_length_289620_cov_91.052424	54128	54961	834	+
Adherence	Polar flagella	<i>nueA</i>	NODE_24_length_78570_cov_117.161021	66094	66789	696	-
Adherence	Polar flagella	<i>nueB</i>	NODE_24_length_78570_cov_117.161021	63795	64841	1047	-
Adherence	Polar flagella	<i>pomA2</i>	NODE_5_length_257795_cov_102.337846	119403	120119	717	-
Adherence	Polar flagella	<i>pomA</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	39863	40600	738	+
Adherence	Polar flagella	<i>pomB2</i>	NODE_5_length_257795_cov_102.337846	118498	119352	855	-
Adherence	Polar flagella	<i>pomB2</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	118360	119235	876	-
Adherence	Polar flagella	<i>pomB</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	40603	41526	924	+

ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapB</i>	NODE_9_length_184585_cov_110.417711	116596	118188	1593	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapC</i>	NODE_9_length_184585_cov_110.417711	118301	119545	1245	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapD</i>	NODE_9_length_184585_cov_110.417711	119568	120440	873	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapF</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	84715	85476	762	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapM</i>	NODE_14_length_123275_cov_100.634678	95	1078	984	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapN</i>	NODE_14_length_123275_cov_100.634678	1066	1644	579	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapO</i>	NODE_14_length_123275_cov_100.634678	1641	2240	600	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapP</i>	NODE_14_length_123275_cov_100.634678	2270	2767	498	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapQ</i>	NODE_14_length_123275_cov_100.634678	2814	4985	2172	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapT</i>	NODE_8_length_215741_cov_106.565131	81902	82858	957	-
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapU</i>	NODE_8_length_215741_cov_106.565131	80764	81873	1110	-
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapV</i>	NODE_2_length_289620_cov_91.052424	5100	7256	2157	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapW</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	55611	56735	1125	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tapY1</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	258870	262190	3321	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tppA</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	262193	262600	408	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tppB</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	256836	257249	414	+

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Adherence	Tap type IV pili	<i>tppE</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	256435	256839	405	+
Adherence	Tap type IV pili	<i>tppF</i>	NODE_8_length_215741_cov_106.565131	52922	53539	618	-
Adherence	Type I fimbriae	<i>fimA</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	74901	75278	378	+
Adherence	Type I fimbriae	<i>fimC</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	75892	78369	2478	+
Adherence	Type I fimbriae	<i>fimD</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	78380	79111	732	+
Adherence	Type I fimbriae	<i>fimE</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	79677	80144	468	+
Adherence	Type I fimbriae	<i>fimF</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	80168	80707	540	+
Adherence	Accessory colonization factor ( <i>Vibrio</i> )	<i>acfC</i>	NODE_14_length_123275_cov_100.634678	24393	25127	735	-
Secretion system	T2SS	<i>exeA</i>	NODE_9_length_184585_cov_110.417711	29955	31598	1644	+
Secretion system	T2SS	<i>exeB</i>	NODE_9_length_184585_cov_110.417711	31598	32281	684	+
Secretion system	T2SS	<i>exeC</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	124766	125581	816	+
Secretion system	T2SS	<i>exeD</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	125603	127636	2034	+
Secretion system	T2SS	<i>exeE</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	127636	129141	1506	+
Secretion system	T2SS	<i>exeF</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	129143	130363	1221	+
Secretion system	T2SS	<i>exeG</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	130515	130946	432	+



ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Secretion system	T2SS	<i>exeH</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	131110	131661	552	+
Secretion system	T2SS	<i>exeI</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	131658	132017	360	+
Secretion system	T2SS	<i>exeJ</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	132062	132709	648	+
Secretion system	T2SS	<i>exeK</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	132856	133824	969	+
Secretion system	T2SS	<i>exeL</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	133944	135128	1185	+
Secretion system	T2SS	<i>exeM</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	135125	135616	492	+
Secretion system	T2SS	<i>exeN</i>	NODE_1_length_322842_cov_106.555829	135678	136433	756	+
Secretion system	T6SS	<i>hcp</i>	NODE_7_length_222130_cov_100.899006	25500	26018	519	+
Secretion system	T6SS	<i>hcp</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	155119	155637	519	+
Secretion system	T6SS	<i>vgrG1</i>	NODE_7_length_222130_cov_100.899006	26503	28545	2043	+
Secretion system	T6SS	<i>vgrG3</i>	NODE_10_length_159966_cov_92.131898	155901	157949	2049	+
Toxin	Aerolysin AerA	<i>aerA</i>	NODE_15_length_117874_cov_109.465029	11048	11929	882	-
Toxin	Extracellular hemolysin AHH1	<i>ahh1</i>	NODE_3_length_287163_cov_99.234731	159636	161501	1866	+
Toxin	Hemolysin HlyA	<i>hlyA</i>	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	128340	129659	1320	-
Toxin	Hemolysin III	Undetermined	NODE_27_length_58979_cov_104.850124	40383	41018	636	-

ตาราง 26 (ต่อ)

VFclass	Virulence factors	Related genes	Contig	Start	End	Length	Strand
Toxin	The repeat in toxin (RTX)	<i>rtxA</i>	NODE_22_length_85969_cov_100.510234	69488	83560	14073	+
Toxin	The repeat in toxin (RTX)	<i>rtxB</i>	NODE_22_length_85969_cov_100.510234	66195	68084	1890	-
Toxin	The repeat in toxin (RTX)	<i>rtxC</i>	NODE_22_length_85969_cov_100.510234	69246	69470	225	+
Toxin	The repeat in toxin (RTX)	<i>rtxD</i>	NODE_22_length_85969_cov_100.510234	64834	66198	1365	-
Toxin	The repeat in toxin (RTX)	<i>rtxE</i>	NODE_22_length_85969_cov_100.510234	62672	64837	2166	-
Toxin	The repeat in toxin (RTX)	<i>rtxH</i>	NODE_22_length_85969_cov_100.510234	68659	68988	330	+
Toxin	Thermostable hemolysin (TH)	-	NODE_5_length_257795_cov_102.337846	28463	29143	681	+
Toxin	Exotoxin A (ETA)( <i>Pseudomonas</i> )	<i>toxA</i>	NODE_23_length_83985_cov_94.684678	78831	80678	1848	+
Immune evasion	Capsule ( <i>Acinetobacter</i> )	-	NODE_6_length_254023_cov_96.381750	211039	212172	1134	-
Immune evasion	Polysaccharide capsule ( <i>Bacillus</i> )	<i>galU</i>	NODE_23_length_83985_cov_94.684678	112	948	837	+
Iron uptake	Acinetobactin ( <i>Acinetobacter</i> )	<i>basB</i>	NODE_31_length_42802_cov_112.281709	30177	31700	1524	+
Iron uptake	Acinetobactin ( <i>Acinetobacter</i> )	<i>basG</i>	NODE_31_length_42802_cov_112.281709	37992	39191	1200	+

ภาคผนวก จ

ตาราง 27 ตำแหน่งของ prophage ที่พบในจีโนมของเชื้อ *A. dhakensis* AM

Region	Region length (kb)	Completeness	Region Position	Most common phage	GC content (%)
1	8.4	incomplete	NODE_4_length_272632_cov_89.380820	PHAGE_Bacill_G_NC_023719(2)	64.60
2	7.5	incomplete	NODE_9_length_184585_cov_110.417711	PHAGE_Serrat_CHI14_NC_041996(1)	59.12
3	8	incomplete	NODE_16_length_114246_cov_116.032347	PHAGE_Bacill_vB_BanS_Tsamsa_NC_023007(2)	63.27
4	13.6	incomplete	NODE_17_length_108745_cov_105.362103	PHAGE_Klebsi_ST13_OXA48phi12.1_NC_049453(4)	60.27
5	13.6	incomplete	NODE_21_length_91290_cov_97.438304	PHAGE_Bacill_G_NC_023719(2)	62.24

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธันท์ชนก แสงวงษ์
วัน เดือน ปี เกิด	15 ตุลาคม 2539
สถานที่เกิด	อำเภอบ้านฝืด จังหวัดอุดรธานี ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนราชวินิตบางเขน พ.ศ. 2557 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนราชวินิตบางเขน พ.ศ. 2562 วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2565 วท.ม. (จุลชีววิทยาประยุกต์) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	91/105 หมู่ 2 ตำบลบางคูวัด อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี 11110
ผลงานตีพิมพ์	Sawaengwong T, Sunthornthummas S, Surachat K, Atitthep T, Sarawaneeyaruk S, Pringsulaka O. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages against <i>Aeromonas dhakensis</i> . JCST. In press.