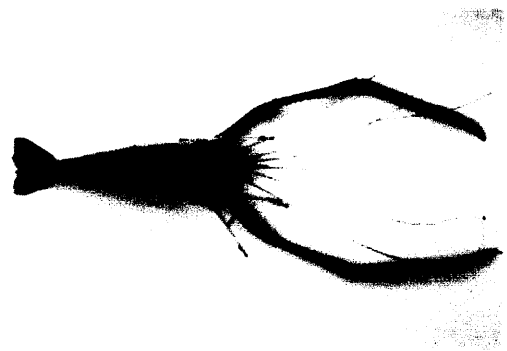
บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามจัดอยู่ในจำพวกสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง มีเปลือกหุ้มอยู่ภายนอก (exoskeleton) รูปร่างของกุ้งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนท้อง (abdomen) ส่วนหัวและอกจะคลุมด้วยเปลือกชิ้นเดียวกัน เรียกว่า carapace ปลายสุดของส่วนหัวจะมีส่วนที่ยื่นแหลมออกไป เรียกว่า กรี (rostrum) ซึ่งมีลักษณะแบนด้านข้างและค่อนข้างยาว ที่สันกรีด้านบนและด้านล่างมีหยักหนามคล้ายฟันเลื่อย (serrated หรือ teeth) ประภาส โฉลกพันธ์รัตน์ (2541) ได้กล่าวถึงลักษณะของกุ้งก้ามกรามว่า มีจำนวนหนามสันกรีด้านบนมี 12-15 ซี่และสันกรีล่าง 8-14 ซี่ ระยางค์ส่วนหัวมีทั้งหมด 5 คู่ ประกอบด้วยหนวด 2 คู่ (1^{st} antenna และ 2^{nd} antenna) และระยางค์อีก 3 คู่ จะเป็นส่วนประกอบของปากทำหน้าที่เกี่ยวกับการกินอาหาร ระยางค์ส่วนอกมี 8 คู่ประกอบด้วย ระยางค์รอบปาก (oral appendages) 3 คู่ และระยางค์สำหรับเดินหรือขาเดิน (walking leg หรือ periopods) 5 คู่ โดยที่ขาเดิน 2 คู่แรกจะเป็นก้ามหนีบและคู่ที่ 2 จะมีขนาดใหญ่มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกุ้งตัวผู้ ส่วนขาเดินคู่ที่ 3, 4 และ 5 มีลักษณะเป็นปลายแหลมธรรมดา ส่วนท้องจะแบ่งออกเป็นปล้องๆ รวม 6 ปล้อง มีระยางค์ 6 คู่ โดยเป็นขาว่ายน้ำ (swimmerets หรือ pleopods) จำนวน 5 คู่อยู่ระหว่างปล้องที่ 1 ถึงปล้องที่ 5 ระยางค์คู่สุดท้ายจะเป็นส่วนของแพนหาง (tail fan) (ภาพที่ 1) กุ้งก้ามกรามจะมีตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas) ขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหัวและอก ระบบขับถ่ายมีลักษณะเป็นต่อมกลมๆ สีเหลืองแกมน้ำตาลหรือสีเขียว นอกจากนี้ยังมีระบบหมุนเวียนเลือดเป็นแบบเปิด (open-circulatory system) คือ เลือดไหลเวียนอยู่ภายในลำตัว ไม่มีสีหรือมีสีฟ้าอ่อน เพราะมีรงควัตถุพวก haemocyanin (New, 1988)



ภาพที่ 1 กุ้งก้ามกราม (*Macrobranchium rosenbergii* de Man)
ที่มา : http://www.jjphoto.dk/animal_archive/macrobranchium_rosenbergii.htm

อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกรามตามการจัดของ Holthuis (1980) สามารถสรุปได้ดังนี้

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Series	Eumalacostraca
Superorder	Eucarida
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Family	Palaemonidae
Genus	*Macrobrachium*
Species	*Macrobranchium rosenbergii* (de Man)

ความแตกต่างระหว่างเพศของกุ้งก้ามกรามจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนในกุ้งตัวเต็มวัย ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งเพศผู้จะมีขาเดินคู่ที่ 2 เป็นก้ามขนาดใหญ่และยาว บริเวณช่วงท้องระหว่างเปลือกแคบ มีช่องเปิดน้ำเชื้อที่โคนขาเดินคู่ที่ 5 ด้านใน และมีติ่งยื่นออกมาที่โคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 คือ appendix musculina และ appendix interna ส่วนลักษณะของกุ้งเพศเมียจะมีขาเดินคู่ที่ 2 เป็นก้ามขนาดเล็กและสั้นกว่าเพศผู้ บริเวณช่วงท้องระหว่างเปลือกกว้างกว่า ที่โคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 มีเฉพาะ appendix interna และในฤดูวางไข่จะเห็นรังไข่ที่บริเวณส่วนหัว ส่วนลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามนั้น ต่อมผลิตน้ำเชื้อตัวผู้จะมีลักษณะเป็นพูแบน 2 พู

ขนาดกว้างประมาณ 3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 9 มิลลิเมตร ที่ปลายเชื่อมติดกันอยู่ทางด้านล่างของหัวใจ ทางส่วนท้ายของต่อมผลิตน้ำเชื้อจะมีท่อน้ำเชื้อยื่นตรงออกมา 2 ข้างแล้วขดเป็นวงก่อนเชื่อมที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ลักษณะของเชื้อตัวผู้จากกล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะคล้ายดอกเห็ดขนาดประมาณ 7.5 ไมครอน มีหางหรือหนามเล็กๆ ยาวประมาณ 12.5 ไมครอนและไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ส่วนในกุ้งเพศเมียมีรังไข่อยู่ตำแหน่งเดียวกับต่อมผลิตน้ำเชื้อตัวผู้ ลักษณะเป็นพูแบนๆ 2 พูเชื่อมติดกันทางด้านท้าย ในช่วงที่มีไข่จะขยายใหญ่มากแผ่ไปทั้งช่วงหัวและอกคลุมส่วนของหัวใจ ท่อนำไข่จะเชื่อมต่อไปยังช่องเปิดที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ไข่มีลักษณะกลมรีเล็กน้อยขนาด 0.6-0.7 มิลลิเมตร (ยนต์ มุสิก, 2529)

กุ้งก้ามกรามสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดปี การผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นเมื่อตัวเมียที่มีไข่จะลอกคราบแล้วตัวผู้จึงจะเข้าผสม น้ำเชื้อตัวผู้มีลักษณะเป็นสารเหนียวจะไปติดอยู่กับส่วนหน้าอกระหว่างขาเดินของตัวเมีย หลังจากผสมพันธุ์ไข่ที่ปล่อยออกมาจะถูกผสมกับเชื้อตัวผู้แล้วไข่ก็จะถูกนำเข้าไปเก็บอยู่บริเวณส่วนท้องระหว่างขาว่ายน้ำ โดยขาว่ายน้ำจะทำหน้าที่โบกพัดน้ำไหลผ่านเพื่อให้ออกซิเจนแก่ไข่ ไข่กุ้งที่ได้รับการผสมแล้วจะค่อยๆ พัฒนาไปเรื่อยๆ และสีของไข่จะเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีน้ำตาลและเป็นสีเทาดำเมื่อใกล้จะฟักออกเป็นตัว ไข่ที่เป็นสีเทาดำจะฟักออกเป็นตัวภายใน 2 - 3 วัน (ทีมงานสัตว์น้ำเศรษฐกิจ, 2546) ความดกของไข่สำหรับกุ้งที่โตเต็มที่อาจสูงถึง 80,000-100,000 ฟองต่อแม่ แต่โดยปกติแล้วแม่กุ้งท้องแรกจะมีความดกของไข่อยู่ระหว่าง 5,000-20,000 ฟองทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่กุ้งด้วย แม่กุ้งบางตัวอาจจะวางไข่และฟักไข่ได้ถึง 2 ครั้งในช่วง 1 เดือน (กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา สาขาการประมง, 2532)

ลูกกุ้งก้ามกรามที่เพิ่งฟักออกเป็นตัวจะมีความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ว่ายล่องลอยอยู่ในกระแสน้ำโดยหงายท้องว่ายถอยหลัง ลูกกุ้งในระยะนี้จะต้องอยู่ในน้ำกร่อยจึงจะมีชีวิตอยู่รอดได้ ถ้าฟักออกเป็นตัวในน้ำจืดก็จะตายภายในไม่กี่วัน ลูกกุ้งจะพัฒนาเข้าสู่ระยะต่างๆ 11 ระยะจึงจะกลายเป็นกุ้งคว่ำมีลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการ ว่ายน้ำไปข้างหน้าโดยคว่ำหน้าลงตามปกติ และจะเริ่มลงอยู่ตามพื้นหรือเกาะตามขอบบ่อ ลูกกุ้งก้ามกรามในระยะที่ 11 ก่อนคว่ำจะมีขนาดความยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร อนันต์ ตันสุตะพานิช และพจนีย์ แพงไพรี (2524) ได้แบ่งระยะการพัฒนาของลูกกุ้งก่อนคว่ำออกเป็น 11 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ไม่มีก้านตา ตาจะติดอยู่ที่ด้านข้าง แพนหางเป็นแผ่นเดียวกับส่วนหาง
ระยะที่ 2 ตามีก้านตา แพนหางยังติดอยู่เป็นแผ่นเดียวกับส่วนหาง
ระยะที่ 3 แพนหางเริ่มแยกออกจากส่วนหาง ส่วนหางปลายยังแผ่กว้าง
ระยะที่ 4 กรีด้านบนมีหนาม 2 ซี่
ระยะที่ 5 ส่วนหางปลายแคบเข้าและยาวออก
ระยะที่ 6 ขาว่ายน้ำเริ่มโผล่ให้เห็นเป็นปุ่มๆ
ระยะที่ 7 ส่วนปลายขาว่ายน้ำแยกออกเป็น 2 แขนง ไม่มีขน

ระยะที่ 8 ขาว่ายน้ำเริ่มมีขนเล็ก ๆ
ระยะที่ 9 แขนงด้านในของขาว่ายน้ำจะมีติ่งเล็ก ๆ เกิดขึ้น
ระยะที่ 10 กรีด้านบนมีหนาม 3-4 ซี่
ระยะที่ 11 กรีด้านบนมีหนาม 7-9 ซี่

อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามจะขึ้นอยู่กับความถี่ในการลอกคราบ ซึ่งการเพิ่มขนาดจะเกิดขึ้นเฉพาะในตอนลอกคราบเท่านั้น ถึงแม้การแบ่งเซลล์และการเพิ่มโปรโตพลาสซึมจะดำเนินต่อมาโดยตลอด ปัจจัยที่มีผลต่อการลอกคราบของกุ้งอาจเป็นปัจจัยภายในตัวกุ้งเอง เช่น ขนาดกุ้ง ช่วงการผสมพันธุ์ และปัจจัยภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ความถี่ในการลอกคราบของกุ้งก้ามกรามจะลดลงเมื่อกุ้งโตเพิ่มขึ้น (ศุภชัย นิลวานิช, 2543)

กุ้งก้ามกรามมีนิสัยชอบเกาะซุกซ่อนตัว อาจอยู่ตามเศษไม้ รากไม้ และตามก้อนหินที่จมอยู่ใต้น้ำ มีความไวต่อแสง ว่องไวปราดเปรียว หลบหลีกศัตรูได้คล่องแคล่วเมื่อถูกรบกวน ตามปกติกุ้งก้ามกรามจะออกหากินในเวลากลางคืน ส่วนตอนกลางวันจะซ่อนตัว กินอาหารได้ทุกประเภททั้งพืช สัตว์ และซากเน่าสลาย ได้แก่ ปลา หอย พันธุ์ไม้น้ำ เมล็ดข้าว หนอน ถั่ว ตัวอ่อนของแมลง เป็นต้น นอกจากนั้นยังกินกันเอง โดยเฉพาะในระยะที่กำลังลอกคราบ กุ้งที่อ่อนแอกว่าจะถูกทำร้ายและเป็นเหยื่อของตัวที่แข็งแรงกว่า (กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา, 2532) ถิ่นกำเนิดของกุ้งก้ามกรามอยู่ในทวีปเอเชีย พบชุกชุมในประเทศไทย พม่า เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ในประเทศไทยพบกุ้งก้ามกรามแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดที่มีทางติดต่อกับทะเลในทุกภาคของประเทศ รวมทั้งแหล่งน้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำลำคลองและทะเลสาบ แม้แต่ในภาคเหนือก็พบกุ้งชนิดนี้อยู่ในแม่น้ำเมยซึ่งเป็นสาขาของแม่น้ำสาละวินของพม่าที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก ในภาคกลางพบชุกชุมในแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำปราณบุรี และแม่น้ำนครนายก ภาคตะวันออกในแม่น้ำจันทบุรี แม่น้ำเวฬุ แม่น้ำระยอง และแม่น้ำตราด ภาคใต้ในแม่น้ำหลังสวน แม่น้ำตาปี แม่น้ำกระบุรี แม่น้ำตรัง แม่น้ำปัตตานี และทะเลสาบสงขลา (ยนต์ มุสิก, 2529)

2.2 โรคเรืองแสง (Luminescent Disease)

โรคนี้มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงชนิด *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในน้ำเค็ม ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในธุรกิจการเลี้ยงกุ้งทั่วโลก สร้างความเสียหายทั้งในโรงเพาะฟักและบ่อดิน (Saeed, 1995; Liu *et al.*, 1996; Lightner and Redman, 1998; Alabi *et al.*, 1999) ประเทศในแถบอเมริกาใต้ เช่น ประเทศเม็กซิโกที่มีรูปแบบการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิมนั้น มีผลผลิตกุ้งทะเลในกลุ่ม penaeids ลดลงเนื่องจาก *V. harveyi* (Soto *et al.*,

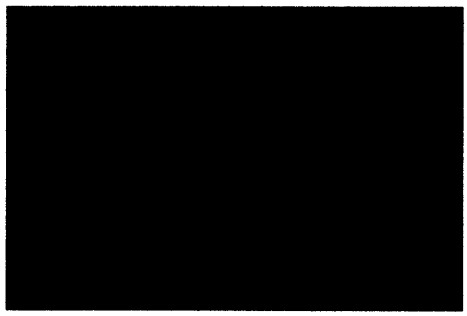
2003) นอกจากนั้นยังมีรายงานการก่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. harveyi* ในสัตว์ทะเลอีกหลายชนิด เช่น หอยมุก (*Pinctata maximus*) (Pass *et al.*, 1987), ม้าน้ำ (*Hippocampus* sp.) (Alcaide *et al.*, 2001), ปลา silvery black porgy (*Acanthopagrus cuvieri*), ปลากะรังจุดน้ำตาล (*Epinephelus tauvina*) (Saeed, 1995) และปลากลุ่ม salmonids (Zhang and Austin, 2000) เป็นต้น

สำหรับในกุ้งขาววานาไม (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมเลี้ยงในบ้านเรานั้น ก็มีรายงานว่ามีแบคทีเรียชนิดนี้อยู่เช่นกัน Vandenburghe *et al.* (1999) รายงานว่า *V. harveyi* พบมากในลูกกุ้งระยะ postlarva, juvenile และพ่อแม่พันธุ์ที่เป็นโรค แต่ในระยะ nauplius และ zoea จะพบ *V. alginolyticus* สูงทั้งในลูกกุ้งปกติและลูกกุ้งที่เป็นโรค นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อสกุล *Vibrio* มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อ Aguirre-Guzman *et al.* (2001) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสกุล *Vibrio* จำนวน 4 ชนิด คือ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. penaeicida* ในกุ้งขาววานาไมตั้งแต่ระยะ nauplius ถึง postlarva I โดยวิธีการแช่ พบว่าแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตรนั้น *V. penaeicida* จะทำให้เกิดอัตราการตายสูงสุด รองลงมาจะเป็น *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ส่วน *V. alginolyticus* ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ

2.2.1 อาการของโรคเรืองแสง

อาการของลูกกุ้งที่ติดเชื้อเรืองแสง พบว่า ลูกกุ้งอ่อนแอ ไม่กินอาหาร ตัวขุ่นขาว ลูกกุ้งที่ตายหรืออ่อนแอใกล้ตายจะล่องลอยไปตามการเคลื่อนไหวของน้ำ สังเกตลูกกุ้งในเวลากลางคืนจะเห็นการเรืองแสงภายในตัวกุ้งซึ่งจะเป็นแสงสีเขียว โรคเรืองแสงนี้จะทำให้ลูกกุ้งตายภายใน 1-2 วัน สำหรับกุ้งในบ่อดิน พบว่า กุ้งที่ป่วยจะว่ายน้ำไม่มีทิศทางหรือว่ายน้ำผิดปกติ บางตัวจะขึ้นมาเกยตามขอบบ่อหรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ เมื่อเช็คการกินอาหาร พบว่า กุ้งกินอาหารลดลงจากเดิม ไม่มีอาหารในลำไส้กุ้ง ในบ่อมีขี้กุ้งอยู่น้อยไม่เป็นสาย ตัวหลวม เปลือกที่ลำตัวมีสีเข้ม สกปรก มีตะกอนเกาะตามผิว ซี่เหงือกมีสีดำ และจะเห็นการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน (ภาพที่ 2) เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบโดยนำส่วนของตับและตับอ่อนหรือเลือกกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วย พบว่า ส่วนตับและตับอ่อนนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรง ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากตับและตับอ่อนถูกทำลายแล้วยังพบว่า ลำไส้เกิดเซลล์ตายและมีอาการอักเสบอย่างชัดเจนเช่นกัน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543) นอกจากนี้อาการของโรคเรืองแสงยังสังเกตได้ไม่ชัดเจนหากเกิดในลูกกุ้งมีขนาดเล็กและแสดงอาการของโรคคล้ายกับโรคอื่นๆ เช่น โรคที่มีสาเหตุ

มาจากการติดเชื้อไวรัส ทำให้การแยกความแตกต่างเป็นไปได้ยากและไม่สามารถวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้โดยดูจากลักษณะอาการภายนอกเพียงอย่างเดียว (Zafran *et al.*, 1998)



ภาพที่ 2 ตัวกุ้งเรืองแสงในเวลากลางคืน
ที่มา : ชลอ (2543)

2.2.2 การระบาดและการแพร่กระจาย

นิลุบล กิจอันเจริญ (2544) กล่าวว่า การระบาดของโรคมักเกิดขึ้นในช่วงที่อุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้นและอยู่ในสภาพการเลี้ยงที่หนาแน่น โดยเฉพาะในน้ำที่มีความเค็มและปริมาณสารอินทรีย์สูง นอกจากนั้นความบอบช้ำเนื่องจากการขนส่งลำเลียง และปรสิตยังเป็นปัจจัยเสริมให้เกิดการระบาดและการแพร่กระจายของโรค ระยะพักตัวของโรคจะขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อและอุณหภูมิของน้ำ ส่วนความรุนแรงของโรคจะขึ้นกับระยะและขนาดของกุ้ง เชื้อสกุล *Vibrio* อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของกุ้งและแพร่กระจายออกมาสู่แหล่งน้ำเมื่อแม่กุ้งวางไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และการเพิ่มจำนวนของสารอินทรีย์มีผลต่อการระบาดและความรุนแรงของโรคนี้ด้วย

2.2.3 การป้องกันและการควบคุมโรค

การป้องกันการเกิดโรคเรืองแสงสามารถทำได้โดยปรับปรุงระบบการจัดการให้ดี โดยการควบคุมคุณภาพน้ำและดูแลจัดการระบบการเลี้ยง ปัจจัยร่วมที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคเรืองแสงนั้น คือ มีปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำสูง ดังนั้นการลดปริมาณสารอินทรีย์โดยมีบ่อพักน้ำจะช่วยปรับคุณภาพน้ำก่อนนำมาใช้ การกำจัดสารตกค้างโดยใช้ซีโอไลท์หรือการควบคุมอัตราความหนาแน่นในการเลี้ยงอย่างเหมาะสม อัตราการปล่อยกุ้งควรอยู่ที่ประมาณ 32,000-50,000 ตัวต่อไร่ และควรทำการฆ่าเชื้อในน้ำรวมทั้งอุปกรณ์เครื่องมือให้สะอาดก่อนที่จะทำการเลี้ยงกุ้ง การใช้สารเคมีในการกำจัดแบคทีเรีย ได้แก่ คลอรีน ฟอร์มาลิน บีเคซี หรือโพวิโดน

ไอโอดีน อย่างไรก็ตามในบางครั้งก็อาจพบการระบาดของโรคนี้แม้จะมีการควบคุมดูแลระบบการเลี้ยงเป็นอย่างดี ในการรักษานิยมใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหาร เช่น oxytetracycline sulphonamides หรือ oxolinic acid แต่ปัญหาที่สำคัญของการรักษาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ คือ การดื้อยาของเชื้อ

2.3 เชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae

เชื้อแบคทีเรียในวงศ์นี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งสั้น (Gram-negative rod) เป็นแท่งตรงหรือโค้งงอ ขนาด 0.3-1.3 x 1.4-5.0 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา (flagella) ที่ปลายเซลล์ เชื้อในวงศ์นี้ส่วนมากมีเอ็นไซม์ oxidase บางชนิดต้องการโซเดียมคลอไรด์เพื่อกระตุ้นการเจริญ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนได้ ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้พลังงานจากการหายใจ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้พลังงานจากโดยการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เชื้อกลุ่มนี้พบได้ทั้งในน้ำทะเลและน้ำจืด (ขจร เจริญศิริ และฉัตรชัย ศรไชย, 2536) แบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae นี้คล้ายกับวงศ์ Enterobacteriaceae ตรงที่มีกระบวนการเมตาบอลิซึมทั้งแบบการหมักและการหายใจ แต่ต่างกันตรงที่วงศ์ Vibrionaceae นี้มีปฏิกิริยา oxidase เป็นบวก และมีแฟลกเจลลาที่ขั้ว (polar flagella) คุณสมบัติของเชื้อในวงศ์ Vibrionaceae แสดงในตารางที่ 1 สกุลที่เป็นสมาชิกของวงศ์นี้ คือ *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* และ *Plesiomonas* นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ (2544) ได้สรุปความแตกต่างของแต่ละสกุลแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ลักษณะ[a]ของแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae, Vibrionaceae และ Pseudomonadaceae

คุณสมบัติ	Enterobacteriaceae	Vibrionaceae	Pseudomonadaceae
การเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน	+	+	+
การเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน	+	+	-
การหมัก D-glucose	+	+	-
แฟลกเจลลา	peritrichous	polar[b]	polar
เอนไซม์ oxidase	-	+	+
การเรืองแสง (bioluminescent)	-	+	-
ความต้องการ Na^+	-	+	-
การยับยั้งด้วย 0/129	-	+	-

a : มีข้อยกเว้นในบางชนิด

b : vibrios บางชนิดมี sheathed polar flagella เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว แต่มี peritrichous flagella เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ (2544)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของสกุลต่างๆ ในวงศ์ Vibrionaceae

คุณสมบัติ	*Vibrio*	*Photobacterium*	*Aeromonas*	*Plesiomonas*
ค่า G+C content	38-51	40-44	57-63	51
ต้องการ Na^+ ในการเจริญ	+	+	-	-
ไวต่อ Vibriostat 0/129	+	+	-	+
Lipase	+	v	+	-
การหมัก D-manitol	+	-	+	-
Sheathed polar flagella	+	-	-	-
สะสม poly-β-hydroxyButyrate แต่ไม่ใช้ β-hydroxy-Butyrate	-	-	+	ND

v : ผลไม่แน่นอน

ND : ไม่มีข้อมูล

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ (2544)

2.3.1 แบคทีเรียสกุล *Vibrio*

เชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อย (comma-shaped) รูปร่างของเชื้อที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เซลล์ของเชื้อ vibrios มีขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูล (capsule) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาจำนวน 1 เส้นหรือมากกว่าที่ปลายเซลล์ แต่บางชนิดก็ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เชื้อ vibrios สามารถเจริญได้ทั้งในที่สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ลักษณะโคโลนีของเชื้อ vibrios บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปจะกลมมีผิวเรียบ โค้ง สีขาวอมเทา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1-3 มิลลิเมตร หลังจากบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีกระบวนการเมตาบอลึซึมแบบ chemoorganotropic และไวต่อ vibriostat 2, 4 diamino-6, 7-diisopropyl pteridine phosphate (0/129) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญ และเป็นลักษณะที่สำคัญของเชื้อในสกุลนี้ที่แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม aeromonads มีเอนไซม์ oxidase, catalase, β-galactosidase และ arginine dihydrolase ไม่สร้างก๊าซในการหมักคาร์โบไฮเดรต สามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ เชื้อ vibrios พบทั่วไปในน้ำกร่อยและน้ำทะเล มักจะพบมากในบริเวณน้ำนิ่ง พื้นก้นบ่อนิ่มและมีปริมาณสารอินทรีย์สูง บางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์เช่นกัน เชื้อในสกุลนี้มีค่า G+C content อยู่ในช่วงกว้างโดยอยู่ระหว่าง 38-51 mol% ในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 และเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5-7.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารอินทรีย์ (organic matter) เป็นแหล่งของอาหาร มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ (วิภาวดี แมนมนตรี, 2540; นิลุบล กิจอันเจริญ, 2544) เชื้อ vibrios สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำทะเลหรือผสมโซเดียมคลอไรด์ 1-2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกลือโซเดียมมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อเป็นอย่างมาก โดยทั่วไปนิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate Citrate Bile Salt (TCBS) ในการแยกและเลี้ยงเชื้อสกุล *Vibrio* เนื่องจากอาหารดังกล่าวจะยับยั้งการเจริญของแบคเรียในกลุ่มอื่นๆ (selective media) สีของโคโลนีบน TCBS จะเป็นสีเขียว (non - sucrose fermenter) หรือสีเหลือง (sucrose fermenter) ชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่มีรายงานไว้ว่า ก่อให้เกิดโรคในกุ้งทะเลและกุ้งน้ำจืด ได้แก่ *V. harveyi* (Liu *et al.*, 1996), *V. alginolyticus* (Sudheesh *et al.*, 2002), *V. parahaemolyticus* (Kourany and Vasquez, 1975; Nolan *et al.*, 1984), *V. vulnificus* (Hoffmann *et al.*, 1988), *V. damsella* (Nash *et al.*, 1992), *V. campbellii* (Xu *et al.*, 1994), *V. cholerae* (Blake *et al.*, 1980; Coelho *et al.*, 1995) และ *V. splendidus* (Baticados *et al.*, 1990) เป็นต้น *V. harveyi* มีชื่อพ้อง (synnonym) คือ *V. trachuri* (Thompson *et al.*, 2002b) และ *V. carchariae* (Pedensen *et al.*, 1998)

อนุกรมวิธานของเชื้อ *V. harveyi* สามารถสรุปได้ ดังนี้

Kingdom	Eubacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Vibrionales
Family	Vibrionaceae
Genus	*Vibrio*
Species	*Vibrio harveyi*

(http://www.aapqis.net/main/ sp/path/viewpath_tax.asp?PathID=209&sec=tax&action=)

2.3.2 กลไกของปฏิกิริยาการเรืองแสง

ปฏิกิริยาการเรืองแสงของแบคทีเรียเกิดจากการออกซิเดชั่นของ long-chain aliphatic aldehyde และการรีดักชั่นของ flavin mononuclotide ($FMNH_2$) โดยจะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ luciferase จากปฏิกิริยานี้ก็จะปลดปล่อยพลังงานจำนวนมากออกมาในรูปของแสงสีเขียวน้ำเงินที่มีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ปฏิกิริยาการเรืองแสงสามารถเขียนเป็นไดอะแกรม ได้ดังนี้ (Losick and Kaiser, 1997)

$$FMNH_2 + RCHO + O_2 \xrightarrow{\text{Luciferase}} FMN + RCOOH + H_2O + \text{Light (490 นาโนเมตร)}$$

2.4 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นล้านเท่าภายในระยะเวลาอันสั้น มีหลักการและวิธีการที่ง่ายจึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เทคนิคนี้เริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์งานทางด้านดีเอ็นเอและใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค หลักการโดยทั่วๆ ไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ (ปรียา พวงสำลี, 2541; พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ, 2543)

ขั้นตอนที่ 1 template denaturation คือ การแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นเกลียวคู่ออกเป็นเส้นเดี่ยว โดยทำลายพันธะไฮโดรเจนด้วยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 92 – 96 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 primer annealing คือ การลดอุณหภูมิลงและไพรเมอร์จะเข้าไปจับคู่กับลำดับเบสที่เป็นคู่สมที่อยู่บนสายดีเอ็นเอต้นแบบหรือดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิประมาณ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของ

เบสในไพรเมอร์ที่ใช้ อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า melting temperature (Tm) ในกรณีของไพรเมอร์สามารถคำนวนค่า Tm โดยประมาณได้จากสูตร Tm = 4(G+C) + 2(A+T) โดยที่ G, C, A และ T คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายไพรเมอร์ ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 3 primer extention คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าด้านปลายทางด้าน 5' ของไพรเมอร์ นิวคลีโอไทด์ที่ถูกนำเข้าไปต่อมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทั้งนี้เนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นที่เอนไซม์ Taq polymerase ทำงานได้ดีที่สุด

เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุลจะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8, ... เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 2n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

ปัจจุบันงานวิจัยต่างๆ ได้นำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับเชื้อ *V. harveyi* ได้มีการนำเอาเทคนิคนี้มาใช้เพื่อการตรวจหาเชื้ออย่างจำเพาะ Oakey *et al.* (2003) ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณที่มีความอนุรักษ์ (conserved region) ใน 16s rDNA ของ *V. harveryi* ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาได้กับ *V. harveryi* ทุกสายพันธุ์ แต่ก็ยังมี *V. alginolyticus* บางสายพันธุ์ที่สามารถเกิดผลผลิตได้ด้วย ส่วน Conejero and Hedreyda (2003) ได้เปรียบเทียบความเหมือนของยีน *toxR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงความรุนแรงของเชื้อ (Global regulator of virulence) และการแสดงออกของ membrane porin gene มีขนาดประมาณ 500-600 คู่เบส จาก *V. harveyi* และ Vibrios ชนิดอื่นๆ พบว่า ยีน *toxR* ของ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. hollisae* มีความเหมือนกับ *V. harveyi* 68, 63 และ 16 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนั้นได้นำประโยชน์จากส่วนของยีน *toxR* มาสร้างไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *V. harveyi* พบว่า สามารถเกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีขนาด 390 คู่เบสและมีความจำเพาะกับ *V. harveyi* Pujalte *et al.* (2003) แยกเชื้อ *V. harveyi* จากอวัยวะภายในและบริเวณที่มีแผลของปลา gilthead sea bream (*Sparus auratus*) และปลา European sea bass (*Dicentrachus labrax*) จำนวน 45 สายพันธุ์ในฟาร์มเลี้ยงแถบชายฝั่งทะเล ประเทศสเปน จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ M13 ที่เป็น universal primer เพื่อใช้ในเทคนิค RAPD-PCR พบว่าได้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 3-8 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 310-1,800 กิโลเบส สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้ (RAPD patterns) ของแต่ละกลุ่มมีความเหมือนกันอย่างชัดเจนที่ 85 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น Hernández and Olmos (2004) ได้สร้างไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสำหรับ *V. harveyi* โดยสร้างจากส่วนของยีน *txR*, ยีน *vhh-1*, ยีน *vhhB*, ยีน *LuxL*, ยีน *LuxM* และยีน *LuxN* โดยผลการทดลอง พบว่า มีเพียงไพรเมอร์ที่สร้างมาจากยีน

LuxN ที่มีความจำเพาะและสามารถใช้ในการตรวจหา *V. harveyi* ได้โดยไม่เกิดผลผลิตกับ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ

McDougald *et al.* (2000) ได้ทำการโคลนยีน *smcR* จากเชื้อ *V. vulnificus* ที่เป็น homologue กับ positive transcriptional regulator ของยีน *luxR* ใน *V. harveyi* จากการนำนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *smcR* ใน *V. vulnificus* มาเปรียบเทียบกับยีน *luxR*, *opaR* และ *hapR* ของเชื้อ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ตามลำดับ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 70-84.5 เปอร์เซ็นต์ และลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกัน 71-96 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นเมื่อนำลำดับของกรดอะโนทั้ง 4 ยีน ไปทำ phylogenetic tree พบว่า *V. harveyi* มีความใกล้ชิดกับ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด รองลงมาเป็น *V. vulnificus* และ *V. cholerae* ตามลำดับ Kim and Jeong (2001) ได้ทำการสร้างไพรเมอร์จากส่วนของ 16s rDNA เพื่อใช้ในการตรวจหาและแยกความแตกต่างของแบคทีเรียชนิด *V. vulnificus* ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นมี 3 สาย คือ Vib1, Vib2 (sense strand) และ Vib3 (antisense strand) ได้แถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขนาด 273 และ 825 คู่เบส และสามารถแบ่ง *V. vulnificus* ออกเป็น 2 กลุ่มตามความแตกต่างกันของลำดับเบส 16s rDNA คือ *V. vulnificus* type A ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทั้งขนาด 273 และ 825 คู่เบส ส่วน *V. vulnificus* type B จะได้แถบดีเอ็นเอเฉพาะขนาด 273 คู่เบส จากนั้นได้ทำการเก็บเชื้อ *V. vulnificus* จากหอยนางรม ดินโคลนชายฝั่ง และน้ำทะเล จำนวน 35, 3 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ พบว่า เป็น *V. vulnificus* type A 35 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 65 เปอร์เซ็นต์เป็น *V. vulnificus* type B

สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกันย่อมมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งทำให้ได้ปริมาณผลผลิตจากปฏิกิริยามากน้อยแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะต้องมีการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ Melting Temperature และจำนวนรอบของปฏิกิริยา ซึ่ง Coleman and Oliver (1996) ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการตรวจหา *V. vulnificus* ไพรเมอร์ออกแบบจากส่วนของยีน hemolysin/cytolysin ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 388 คู่เบส ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสซึ่งใช้ PCR buffer ที่มีความแตกต่างกันของ $MgCl_2$ และค่าความเป็นกรด-ด่างเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งพบว่า PCR buffer ที่มี $MgCl_2$ 12.5 มิลลิโมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.5 จะสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่สามารถเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ (culturable) ทั้งกลุ่มที่มี encapsulated (opaque) และ translucent ได้ แต่ไม่สามารถตรวจหา *V. vulnificus* ที่ไม่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (non-cultureable) ได้ แต่ถ้าใช้ PCR buffer ที่มี $MgCl_2$ 7.5 มิลลิโมลาร์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.0 จะสามารถเพิ่มแถบดีเอ็นเอขนาด 388 คู่เบสของแบคทีเรีย *V. vulnificus* ได้ทั้งกลุ่ม culturable และ non-culturable Vickery *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ R-

PSE420 ที่ใช้ในเทคนิค arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) เพื่อหาความแตกต่างกันของแบคทีเรียชนิด *V. vulnificus* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของหอยนางรม การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ R-PSE420 1.04 μmol พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ที่ได้จาก AP-PCR มีขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 150-1,200 คู่เบสและมีความแตกต่างกันใน *V. vulnificus* แต่ละสายพันธุ์ และมีแถบดีเอ็นเอขนาด 220 คู่เบสที่พบทั้ง 16 ตัวอย่าง

นอกจากนั้นยังมีรายงานของ Ramaiah *et al.* (2000b) ซึ่งได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *ChiA* ที่สร้างเอนไซม์ chitinases จากแบคทีเรียชนิด *Serratia marcescens*, *Alteromonas* sp., *Bacillus circulans* และ *Aeromonas caviae* ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้จะนำไปใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อ *V. harveyi* สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอและเกิดผลผลิตขนาด 225 คู่เบส ผลผลิตที่ได้นำไปสร้างโพรบเพื่อใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียที่มียีน *ChiA* พบว่า ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากกว่า 1,000 ตัวอย่างที่ได้จากน้ำใน Chesapeake Bay สามารถตรวจหาแบคทีเรียที่มียีน *ChiA* จากโพรบได้ 21 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Kong *et al.* (2002) ได้นำเทคนิค multiplex PCR (m-PCR) มาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในน้ำทะเล ทำการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่จากส่วนของยีน aerolysin (*aero*), invasion plasmid antigen H (*ipaH*), attachment invasion locus (*ail*), invasion plasmid antigen B (*ipaB*), enterotoxin extracellular secretion protein (*epsM*) และ species-specfic region ของ 16s-23s rDNA (*Vpara*) เพื่อตรวจหา *Aeromonas hydrophila*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ตัวอย่างน้ำทะเล 19 แห่ง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค multiplex PCR จากไพรเมอร์ได้ 4 คู่ คือ ยีน *Aero*, *IpaB*, *EpsM* และ *Vpara* ส่วนไพรเมอร์อีก 2 คู่ คือ *IpaH* และ *Ail* ไม่เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา ซึ่งการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีนี้มีความรวดเร็วและมีความจำเพาะ และสามารถตรวจสอบเชื้อที่มีปริมาณน้อยได้ถึง 10^0-10^2 cfu ต่อมิลลิลิตร Sudheesh *et al.* (2002) ได้ใช้เทคนิค RAPD-PCR กับแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ Hoeriot-Watt (HW) จำนวน 15 ตัวอย่างที่แยกเชื้อได้จากกุ้งทะเล *Penaeus monodon* ที่เป็นโรคในฟาร์มเลี้ยงกุ้งประเทศไทย และแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* จำนวน 9 ตัวอย่างที่แยกได้จากกุ้งทะเล *P. orientalis* ปกติ และอีก 1 ตัวอย่างเป็น *V. alginolyticus* สายพันธุ์ ATCC 17749 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 20 ตัวและใช้เพียง 7 ตัวในการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ผลจากโปรแกรม PHYLIP version 3.5c พบว่า สามารถรวม *V. parahaemolyticus* อยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมด ส่วน *V. alginolyticus* แยกออกเป็น 2 กลุ่ม โดยที่กลุ่มแรกมีจำนวน 9 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนอีกกลุ่มมีเพียง 1 สายพันธุ์และเป็น *V. alginolyticus* สายพันธุ์ ATCC 17749 นอกจากนั้น Valle *et al.* (2002) นำ arbitrary primers 40 ชนิดมาใช้ในเทคนิค RAPD-PCR

กับแบคทีเรีย *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* ที่เป็นสาเหตุของโรค Pasteurellosis พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ species (species-specific marker) จำนวน 3 แถบ มีขนาด 474, 323 และ 202 คู่เบส นำ markers ที่ได้ทั้ง 3 แถบไปสร้างไพรเมอร์ และเมื่อนำตัวอย่างม้าม ไต และตับของปลา European sea bass (*Dicentrachus labrax*) ที่เป็นโรค Pasteurellosis มาสกัดดีเอ็นเอและใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก markers ทั้ง 3 ตัว ได้ผลผลิตขนาดที่ต้องการและใช้ในการตรวจหา *P. damsela* subsp. *piscicida* ได้