บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งก้ามกรามที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักจากรัฐบาลในเขตพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี และสุรินทร์ ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างเชื้อตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2547 ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 35 สายพันธุ์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งสิ้น การทดสอบ O/129 sensitivity test พบว่า ให้ผลเป็นบวก 20 สายพันธุ์ oxidase ให้ผลเป็นบวก 25 สายพันธุ์ และ catalase ให้ผลเป็นบวกทุกสายพันธุ์ การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม และเอธิลอัลกอฮอล์จากเชื้อแบคทีเรียได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 100-530 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อนำมาทดสอบกับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า สภาวะที่เหมาะสมเป็น ดังนี้ สารที่ใช้ในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร และ Taq polymerase 0.15 ไมโครลิตร กำหนดโปรแกรมในเครื่อง Thermocycler ดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 29 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ผลจากการหาลำดับเบสโดยใช้ผลผลิตที่สังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ลำดับเบสที่ได้เหมือนกับลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GENBANK ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบได้ถูกต้องตามที่ออกแบบไว้ เมื่อทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบจากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 35 สายพันธุ์ ไม่พบผลผลิตดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงนั้นไม่ใช่ *V. harveyi* และเมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 กับดีเอ็นเอต้นแบบของกุ้งก้ามกราม พบว่า ไม่สามาถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส หรือแถบดีเอ็นเออื่นที่ไม่จำเพาะในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ควรมีการศึกษาต่อไป

โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างของเชื้อ *V. harveyi* และเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการศึกษาเพิ่มขึ้นเพื่อยืนยันผลการศึกษาให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

เชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* พบเป็นปัญหาทั่วไปในการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในน้ำเค็มและน้ำกร่อย ในประเทศไทยพบปัญหาสำคัญ คือ การเรืองแสงในโรงเพาะกุ้ง ทั้งกุ้งทะเลและกุ้งก้ามกราม ซึ่งส่วนใหญ่แล้วรายงานว่า โรคเรืองแสงเกิดจากเชื้อ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียว (Saeed, 1995; Liu *et al.*, 1996; Lightner and Redman, 1998; Alabi *et al.*, 1999; Zhang and Austin, 2000; Soto *et al.*, 2003) จากรายงานการศึกษาอื่นแสดงว่า มีเชื้อสกุล *Vibrio* ชนิดอื่นที่สามารถทำให้เกิดการเรืองแสงได้ Shimada *et al.* (1995) ทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากกุ้งน้ำจืดที่เป็นโรค Light Disease of Shrimp ได้แบคทีเรียเรืองแสง 4 สายพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์แล้วพบว่าเป็น *V. cholerae* serogroup O28 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้จากการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อสายพันธุ์ KKU 46001, KKU 46002, KKU 47005, KKU 47011 และ KKU 47012 ที่พบในกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงนั้นเป็นเชื้อ *V. cholerae* เช่นกัน

การจำแนกชนิดของเชื้อ *V. harveyi* และ *Vibrio* สกุลอื่นๆ ทำได้ค่อนข้างยากและยังขาดความถูกต้องแน่นอน จากรายงานของ Leano *et al.* (1998) และ Caccamo *et al.* (1999) ได้ทำการจำแนกเชื้อเรืองแสงจากลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีจำนวน 30 และ 33 ลักษณะตามลำดับ ซึ่งการทดสอบดังกล่าวเหมือนกันเพียง 5 ลักษณะ คือ arginine dihydrolase (ADH), lysine decarboxylase (LDC), omithine decarboxylase, indole และ urease Leano *et al.* (1998) ได้ทำการแยกเชื้อจากตับของกุ้ง *P. monodon* ระยะ juvenile ที่เป็นโรค vibriosis ทั้งหมด 172 สายพันธุ์ พบว่า เป็นสกุล vibrios ถึง 155 สายพันธุ์ (90.12 เปอร์เซ็นต์) โดยพบเชื้อ *V. harveyi* มากที่สุดเป็นจำนวนถึง 48 สายพันธุ์ ในการจำแนกเชื้อใช้ลักษณะทางชีวเคมีและการเจริญเติบโตของเชื้อจำนวน 30 ลักษณะ ซึ่ง *V. harveyi* ทำการทดสอบเพียง 22 ลักษณะและพบว่า การทดสอบ H_2S production, sensitivity 0/129 และ urease test สามารถเกิดได้ทั้งผลบวกและลบ ส่วน Caccamo *et al.* (1999) ใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ 33 ลักษณะเพื่อจำแนกแบคทีเรียเรืองแสงจำนวน 15 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อทั้ง 15 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ NCIMB 1280 พบว่า ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียทั้ง 15 สายพันธุ์และ *V. harveyi* สายพันธุ์ NCIMB 1280 เหมือนกันอยู่เพียง 23 ลักษณะ ส่วนอีก 10 ลักษณะ คือ การทดสอบ ADH, citrate, saccharose, melibiose, urease, การทดสอบการเจริญบน glucose, manitol, mannose, phenylacetate และ saccharose มีความแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ต้องใช้เทคนิค Restriction analysis of amplified 16s rDNA (ARDRA) เข้ามาช่วย และสามารถแบ่งชนิดของเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มตาม ARDRA patterns คือ เป็น *V. harveyi* จำนวน 10 สายพันธุ์, *V. splendidus* I จำนวน 1 สายพันธุ์ และอีก 4 สายพันธุ์ไม่สามารถระบุชนิด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์ของ *V. harveyi* สายพันธุ์

NCIMB 1280 กับ *V. orientalis* สายพันธุ์ NCIMB 2195, *V. splendidus* สายพันธุ์ NCIMB 1 และ *V. fisheri* สายพันธุ์ NCIMB 1281 พบว่า มีลักษณะที่เหมือนกันถึง 25, 17 และ 16 ลักษณะ ตามลำดับ ทำให้แยกความแตกต่างได้ยาก และเมื่อนำการจำแนกเชื้อของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1 (Baumann and Schubert, 1965) ที่ใช้ใน *V. harveyi* มาเปรียบเทียบ พบว่า ต้องใช้การทดสอบทั้งหมดถึง 120 ลักษณะ เพื่อแยก *Vbrio* ชนิดต่างๆ จำนวน 20 ชนิด และ type strains เป็นเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

การใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปปัจจุบันนิยมกันอย่างมาก เนื่องจากทำการทดสอบได้ง่าย มีความสะดวกรวดเร็ว และใช้เวลาน้อย แต่จากการศึกษาของ Santos *et al.* (1993) ที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างปลาชนิดต่างๆ จำนวน 223 สายพันธุ์ แล้วทำการจำแนกเชื้อจากการทดสอบ API-20E และนำมาเปรียบเทียบกับการจำแนกเชื้อที่ได้จากลักษณะทางชีวเคมีมาตรฐาน (standard biochemical test) ซึ่ง API 20E สามารถจำแนกได้เชื้อ motile Aeromonads, *A. salmonicida*, *V. anguillalum*, *Pasteurella piscicida* และ *Yersinia ruckeri* ได้ แต่การแปลผลไม่แน่นอนในการหมักน้ำตาล lysine decarboxylase (LDC), Voges Proskauer (VP), citrate และ gelatinase reaction นอกจากนี้ผลการจำแนกเชื้อจาก API-20E พบว่าสามารถจำแนกเป็นเชื้อ *A. salmonicida* ได้ 13 สายพันธุ์จากทั้งหมด 32 สายพันธุ์ และจำแนกเชื้อ *Y. ruckeri* ได้เพียง 9 สายพันธุ์จากทั้งหมด 53 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อในกลุ่ม motile Aeromonads 45 สายพันธุ์ จำแนกจากลักษณะทางชีวเคมีได้เชื้อ *A. hydrophila* 34 สายพันธุ์, *A. sobria* 10 สายพันธุ์ และ *A. caviae* 1 สายพันธุ์ แต่เมื่อทำการทดสอบด้วย API-20E จำแนกเป็นเชื้อ *A. hydrophila* ทั้งหมด นอกจากนี้ API-20E ยังจำแนกเชื้อ *V. anguillarum* จำนวน 35 สายพันธุ์ เป็น *A. hydrophila* และยังจำแนกเชื้อ *P. piscicida* ทุกสายพันธุ์เป็น *Pseudomonas fluorescens/putida* นอกจากนี้มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกันเพื่อช่วยในการแบ่งกลุ่มและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งน่าจะทำให้มีความแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นตัวกำหนดการสร้างกรดอะมิโนต่างๆ และควบคุมการแสดงออก ซึ่ง Urakawa *et al.* (1997) ทำการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae ด้วยเทคนิค RFLP-PCR เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ใช้ทั้งหมด 5 ชนิด คือ *HhaI*, *DdeI*, *RsaI*, *Sau3AI* และ *MspI* ทำให้เกิด 16s rDNA genotype 27 แบบจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 35 ชนิด 49 สายพันธุ์ บางกรณีเทคนิค RAPD-PCR สามารถแยกความแตกต่างของลำดับเบส 16 s rDNA ที่มีความแตกต่างกันเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ระหว่าง *V. cholerae* และ *V. mimicus* ได้ และบางกรณีลำดับเบสที่แตกต่างกัน 4.1 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียชนิด *V. carchariae* และ *V. vulnificus* ออกจากกัน นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบ 16s rDNA genotype ที่ได้จากเทคนิค RAPD-PCR กับลำดับเบสส่วน 16s rDNA ในฐานข้อมูลจำนวน 32

accession number พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มได้เหมือนกันอยู่ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. carchaiae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* มีความเหมือนกัน 95.9-99.9 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *V. anguillarum* และ *V. ordalii* มีความเหมือนกัน 99.7 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *V. Pelagius* และ *V. tubiashii* มีความเหมือนกัน 98.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *Photobacterium leiognathi*, *P. phosphoreum* และ *V. iliopiscarius* มีความเหมือนกัน 96.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Thompson *et al.* (2001a) ได้ทำการศึกษาพันธุกรรมของแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae จำนวน 506 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Fluorescent Amplified Fragements Length Polymorphisms (FAFLP) ผลการทดลองได้ FAFLP paterns ทั้งหมด 69 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มแบ่งความเหมือนกันที่ 45 เปอร์เซ็นต์ โดยที่กลุ่ม A36 *V. harveyi* อยู่รวมกับ *V. carchariae* และมีความเหมือนกันที่ 79 เปอร์เซ็นต์

การนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใช้ในการตรวจหาเชื้อที่ก่อโรคในกุ้งทะเลและกุ้งน้ำจืดเริ่มมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากการระบาดของโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและทำการรักษาได้ค่อนข้างยาก ในการรักษาโรคที่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง และยาบางชนิดที่สามารถใช้ในการรักษาได้แต่หาซื้อได้ยากหรือไม่ได้เป็นยาในกลุ่มที่กรมประมงอนุญาตให้ใช้ ซึ่งเทคนิคนี้จะช่วยในการตรวจหาเชื้อก่อโรคกับลูกพันธุ์กุ้งก่อนนำมาเลี้ยง เพื่อช่วยลดความเสี่ยงของเชื้อก่อโรคที่มาพร้อมกับกุ้ง ซึ่ง Ramaiah *et al. (2000a)* ได้ทำการสร้างไพรเมอร์จากส่วนของ *luxA* ในยีนเรืองแสง (lux operon) พบว่า สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 745 คู่เบส ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรีย reference strains จำนวน 5 สายพันธุ์ จากจำนวนทั้งหมด 53 สายพันธุ์ คือ *V. fisheri* สายพันธุ์ UM 1373, *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14216, UM 1503 และ UM BB7 และ *V. cholerae* สายพันธุ์ ATCC 14547 ผลผลิตที่ได้ขนาด 745 คู่เบสนี้ จะถูกนำมาสร้างโพรบซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน *luxA* จากนั้นเก็บตัวอย่างแบคทีเรียในน้ำจาก Chesapeake Bay จำนวน 650 โคโลนีและเป็นแบคทีเรียที่ไม่เรืองแสงทั้งหมด สามารถตรวจหาแบคทีเรียที่มียีน *luxA* ได้เพียง 18 โคโลนี (น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์) Conejero and Hedreyda (2003) สร้างไพรเมอร์จากส่วนของยีน *toxR* ที่มีความจำเพาะกับ *V. harveyi* พบว่า สามารถเกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีขนาด 390 คู่เบสและมีความจำเพาะกับ *V. harveyi* 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* ชนิดอื่นๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ต้องการตรวจหาเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งก้ามกราม โดยไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่สร้างขึ้นนี้มีความจำเพาะกับลำดับเบสส่วน 16 s rDNA ของ *V. harveyi* จากผลการทดลองแม้ว่า การตรวจสอบหาเชื้อ *V. harveyi*

ด้วยไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 กับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงนั้น ไม่พบเชื้อ *V. harveyi* ทั้ง 35 ตัวอย่าง แต่ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจหา *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ได้ เพราะไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้ถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับตัวเชื้อ *V. harveyi* เท่านั้น