

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเรื้อรังในโรงพยาบาลกึ่งกักกัน

4.1.1 การรวบรวมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเรื้อรังในโรงพยาบาลกึ่งกักกัน

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกึ่งกักกันที่เกิดโรคเรื้อรังจากโรงพยาบาลกึ่งกักกันจากหน่วยงานราชการในเขตพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ อุรธานี และสุรินทร์ ที่เกิดโรคเรื้อรังในโรงพยาบาลกึ่งกักกันได้เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 6 ชนิด รวมทั้งสิ้น 59 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ 1 ซึ่งมีการใส่รหัสสายพันธุ์ KKU หมายถึง Khon Kaen University ตัวเลขสองตัวแรก หมายถึง ปี พ.ศ. ที่เก็บตัวอย่าง เช่น ตัวเลข 46 หมายความว่าเก็บในปี 2546 เป็นต้น ส่วนตัวเลขอีกสามตัวสุดท้าย คือ ลำดับที่ที่พบเชื้อ แต่นำมาศึกษาคุณสมบัติของเชื้อเพียง 18 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกเฉพาะสกุล *Vibrio* ที่เจริญได้ดีที่สุด (ตารางที่ 7)

4.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้นจากสถานที่เก็บตัวอย่าง

การตรวจวัดคุณภาพน้ำจากสถานที่เก็บตัวอย่างกึ่งกักกันที่เกิดโรคเรื้อรังพบว่าคุณภาพน้ำเบื้องต้นในโรงพยาบาลกึ่งกักกัน มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 7.5- 7.8 อุณหภูมิมีค่าอยู่ระหว่าง 27-28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นด่าง อยู่ระหว่าง 68-108 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเค็มมีค่าอยู่ระหว่าง 12-15 ส่วนในพันส่วน และค่าแอมโมเนียอยู่ที่ระดับ 0.61-0.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่ทำให้เกิดการตายได้ (ตารางที่ 6)

4.1.3 การศึกษาชนิดของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเรื้อรัง

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกึ่งป่วยเป็นโรคเรื้อรังจากโรงพยาบาลพบว่าโคโลนีมีลักษณะ กลม ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย มีสีขาวครีม เรืองแสงได้ในที่มืด สีเขียวปนเหลือง เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำการศึกษาโดยการย้อมแกรม พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากกึ่งกักกันที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรังในโรงพยาบาลกึ่งกักกัน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น บางเซลล์มีลักษณะโค้งงอซึ่งเป็นลักษณะที่พบในสกุล *Vibrio* ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อโดยการทดสอบด้วย API 20 NE ตามภาพที่ 1 และ API 20 E พบว่าจำนวนเชื้อ 48 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 81.36 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณเชื้อทั้งหมด อยู่ในสกุล *Vibrio* โดยมีชนิด *V. cholerae* จำนวน 27 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 45.76 เปอร์เซ็นต์ *V. parahaemolyticus* จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 20.33 เปอร์เซ็นต์ *V. mimicus* 4 สายพันธุ์ ซึ่งคิด

เป็น 6.77 เปอร์เซ็นต์ และเป็น unidentify vibrios จำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 8.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่างจาก *V. harveyi* ATCC 14126 โดยคุณสมบัติของเชื้อแสดงไว้ในตารางที่ 8 นอกจากนี้พบว่าในการแยกเชื้อดังกล่าวมีเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่นด้วย จากการทดสอบพบว่าเป็นเชื้อในสกุล *Aeromonas* ชนิด *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* จำนวน 11 สายพันธุ์ จากจำนวนทั้งหมด 59 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.64 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณเชื้อทั้งหมด

ตารางที่ 6 คุณภาพน้ำในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง

สถานที่เก็บ	ความเป็นกรด เป็นด่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม/ ลิตร)	แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)
Station 1	7.5	28	108	0.80	15
Station 2	7.6	27	98	0.61	12
Station 3	7.8	28	68	0.65	15

หมายเหตุ: Station 1 = ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี

Station 2 = ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุรินทร์

Station 3 = สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาฬสินธุ์

ตารางที่ 7 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติบางประการ

ชนิด	สายพันธุ์	สถานที่เก็บตัวอย่าง
<i>V. cholerae</i>	KKU 46001	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 46002	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 46006	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 46008	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 47001	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 47014	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 47016	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 47017	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. cholerae</i>	KKU 47024	ศพจ.อุดรธานี
<i>V. mimicus</i>	KKU 46004	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. mimicus</i>	KKU 46009	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. mimicus</i>	KKU 46010	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. parahaemolyticus</i>	KKU 46005	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. parahaemolyticus</i>	KKU 46007	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. parahaemolyticus</i>	KKU 47015	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. parahaemolyticus</i>	KKU 47018	สปจ.กาฬสินธุ์
<i>V. parahaemolyticus</i>	KKU 47019	ศพจ.สุรินทร์
<i>V. parahaemolyticus</i>	KKU 47025	ศพจ.สุรินทร์
หมายเหตุ:	ศพจ. ย่อมาจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด	
	สปจ. ย่อมาจาก สถานีประมงน้ำจืด	

ตารางที่ 8 คุณสมบัติของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงจาก
โรงเพาะฟัก

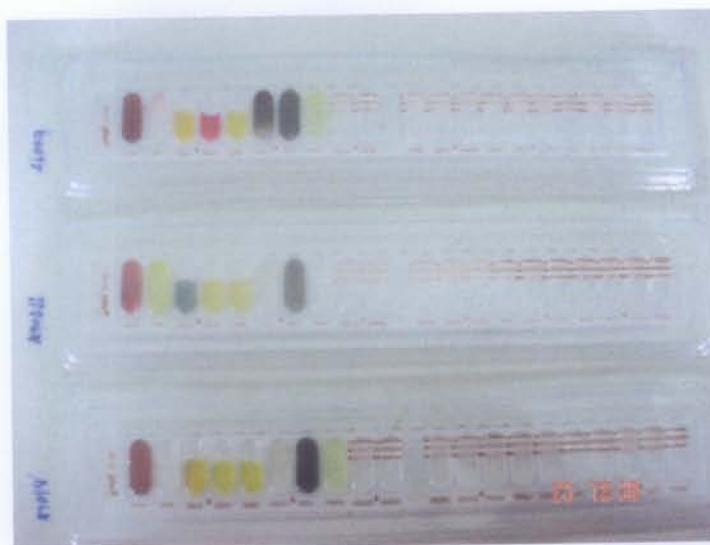
คุณสมบัติ	<i>V. cholera</i> (27 สายพันธุ์)	<i>V. parahaemolyticus</i> (12 สายพันธุ์)	<i>V. mimicus</i> (4 สายพันธุ์)	<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	Unidentified (5 สายพันธุ์)
Growth on Marine agar	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม
Luminescent	+	+	+	+	-
Gram stain	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Reduction of nitrates to nitrites	+	+	+	+	-
ONPG hydrolysis	+	-	-	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	-
Citrate	+	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-
Tryptophane desaminase	-/+	-	-/+	-	-
Indole production	-	-	-	+	-
Voges-Proskauer	+	-	-	-	+

ตารางที่ 8 คุณสมบัติของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงจาก
โรงเพาะฟัก (ต่อ)

คุณสมบัติ	<i>V. cholera</i> (27 สายพันธุ์)	<i>V. parahaemolyticus</i> (12 สายพันธุ์)	<i>V. mimicus</i> (4 สายพันธุ์)	<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	Unidentified (5 สายพันธุ์)
Gelatin	+	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	-
Inositol	-	-/+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Amylase	-	-	-	+	-
Arabinose	-	-	-	+	-
hydrolysis esculine	-	-	-	-	+
Manitol	+	-	+	+	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Sensitive to 0/129 (150 ug)	S	S	S	S	S

หมายเหตุ + = ให้ผลเป็นบวก - = ให้ผลเป็นลบ

S = Sensitive: มีความไวต่อการทดสอบ



ภาพที่ 1 การทดสอบเชื้อด้วย API 20 NE (Biomerieux, France)

4.2 การศึกษา homogeneity ของเชื้อที่แยกได้ โดยการทำ DNA-DNA hybridization

จากการศึกษา DNA-DNA hybridization ของเชื้อแบคทีเรียที่รวบรวมได้จากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง สกุล *Vibrio* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ATCC 14126 พบว่า ไม่มีสายพันธุ์ใดที่มี hybridization กันอย่างสมบูรณ์ โดยเชื้อชนิดเดียวกันมี homogeneity แตกต่างกัน เช่น เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. cholerae* มี homogeneity ระหว่างสายพันธุ์ 85.74 – 93.97 เปอร์เซ็นต์ ชนิด *V. mimicus* มี homogeneity ระหว่างสายพันธุ์ 86.28 – 93.83 เปอร์เซ็นต์ ชนิด *V. parahaemolyticus* มี homogeneity ระหว่างสายพันธุ์ 85.24 – 90.70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *V. cholerae* มี homogeneity กับ *V. mimicus* อยู่ระหว่าง 71.63 – 78.74 เปอร์เซ็นต์ *V. cholerae* มี homogeneity กับ *V. parahaemolyticus* อยู่ระหว่าง 67.11 – 77.97 เปอร์เซ็นต์ และ *V. cholerae* มี homogeneity กับ *V. harveyi* อยู่ระหว่าง 82.37 – 90.73 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ทำการทดสอบเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ATCC 14126 กับ negative control แบคทีเรียชนิด *E. coli* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมี homogeneity กับ *E. coli* มีค่าอยู่ระหว่าง 7.38 – 29.23 , 10.33 – 29.75, 8.70 – 20.90 และ 11.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงสรุปไว้ในตารางที่ 9

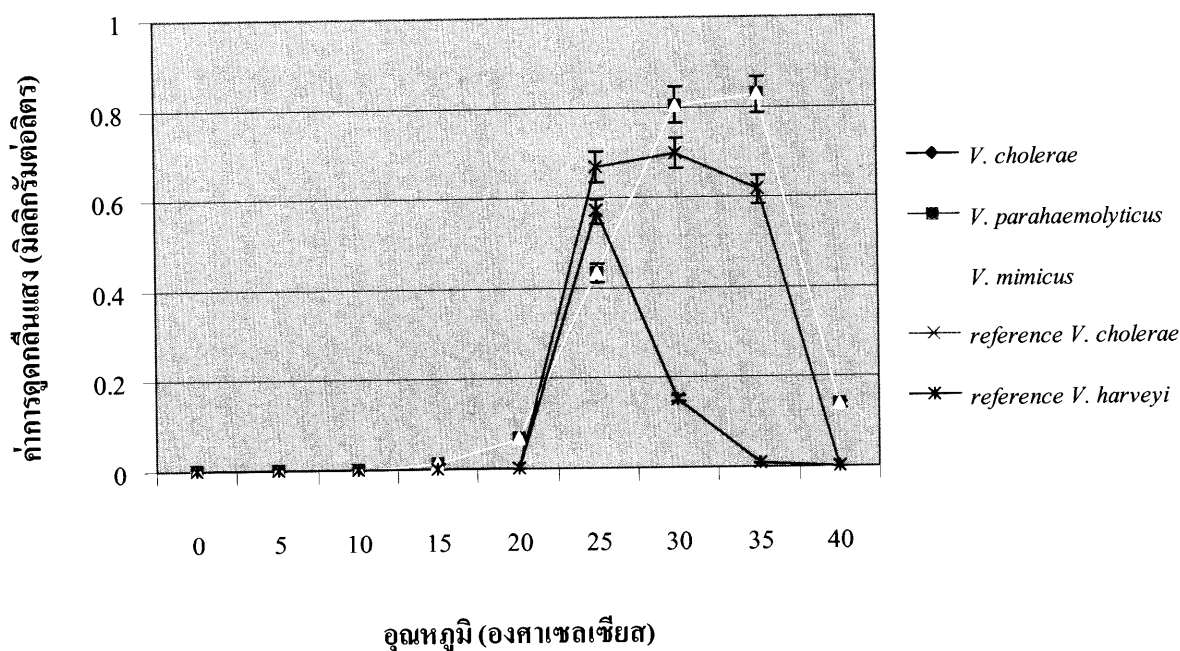
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ homogeneity ของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่รวบรวมได้จากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสง

ชนิดของเชื้อ		เปอร์เซ็นต์ homogeneity
Unlabeled DNA	labeled DNA	
<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i>	85.74 – 93.97
<i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i>	86.28 – 93.83
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	85.24 – 90.70
<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	71.63 – 78.74
<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	67.11 – 77.97
<i>V. cholerae</i>	<i>V. harveyi</i>	82.37 – 90.73
<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	70.17 – 77.40
<i>V. mimicus</i>	<i>V. harveyi</i>	77.33 – 88.38
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	75.77 – 93.98
<i>V. cholerae</i>	<i>E. coli</i>	7.38 – 29.23
<i>V. mimicus</i>	<i>E. coli</i>	10.33 – 29.75
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	8.70 – 20.90
<i>V. harveyi</i>	<i>E. coli</i>	11.87

4.3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อ

4.3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ

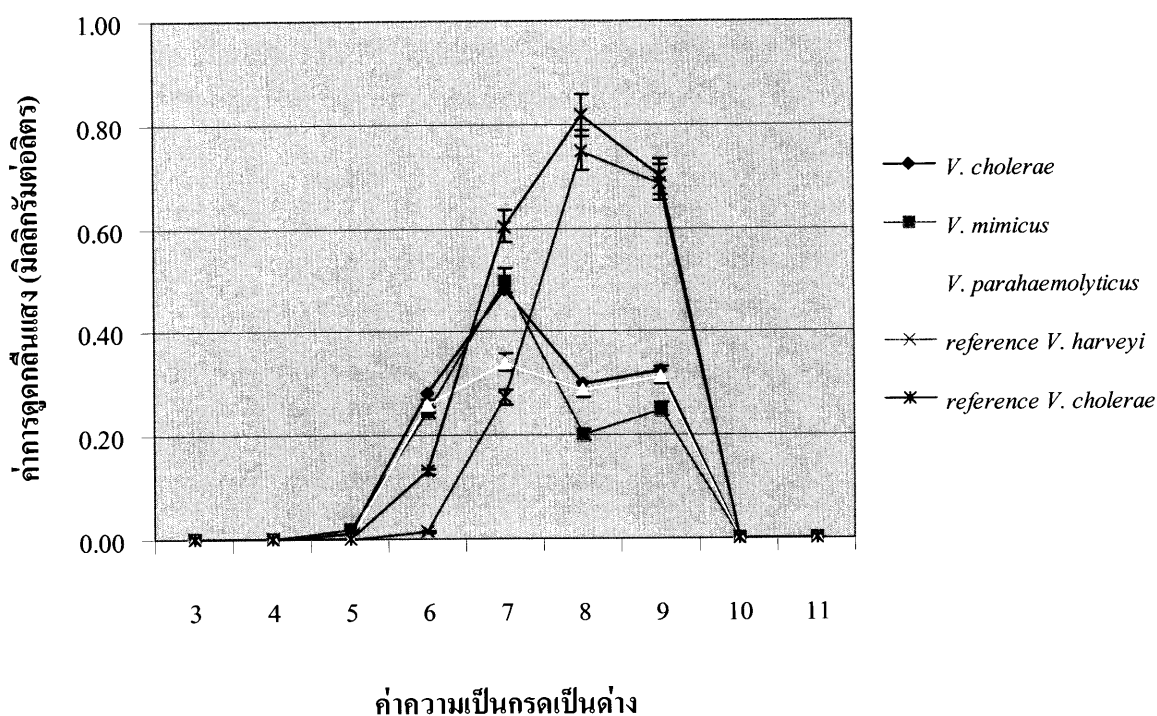
ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกราม พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 18 สายพันธุ์ ที่ทำการทดสอบและสายพันธุ์อ้างอิง ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *V. harveyi* ATCC 14126 และ *V. cholerae* R1 ที่แยกจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อยังมีชีวิตอยู่แต่ไม่สามารถเจริญได้ ส่วน *V. cholerae* KKU 46008 และ *V. parahaemolyticus* KKU 47019 ที่อุณหภูมิ 5-15 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อยังมีชีวิตอยู่แต่ไม่สามารถเจริญได้ และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้บางสายพันธุ์ ยกเว้น *V. cholerae* สายพันธุ์ KKU 47016, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KKU 47018, *V. cholerae* KKU 47024 รวมถึงสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่พบว่ามีชีวิตอยู่แต่ไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม

4.3.2 การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญของเชื้อ

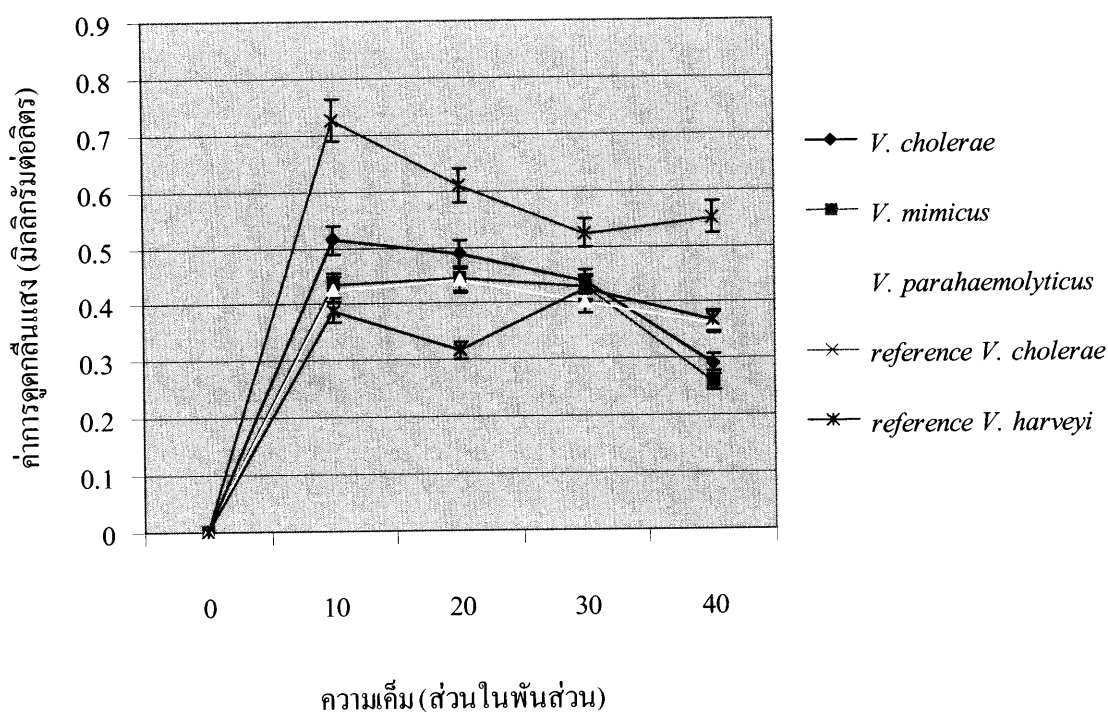
ผลการศึกษาของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญของเชื้อในสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโต ได้ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0-9.0 และเจริญได้ดีที่ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 7.0 แต่มีส่วนหนึ่งคือ *V. cholerae* สายพันธุ์ KKU 47014, KKU 47016, KKU 47017, KKU 47024, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KKU 47015, KKU 47018, KKU 47019, KKU 47025 และสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 5.0 ส่วนสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดเป็นด่างสูง 8.0 และ *V. cholerae* สายพันธุ์ KKU 47024 และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KKU 47025 ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 9.0 แต่ยังมีชีวิตอยู่ สำหรับที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 3.0, 4.0, 10.0 และ 11.0 เชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม

4.3.3 การศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของเชื้อ

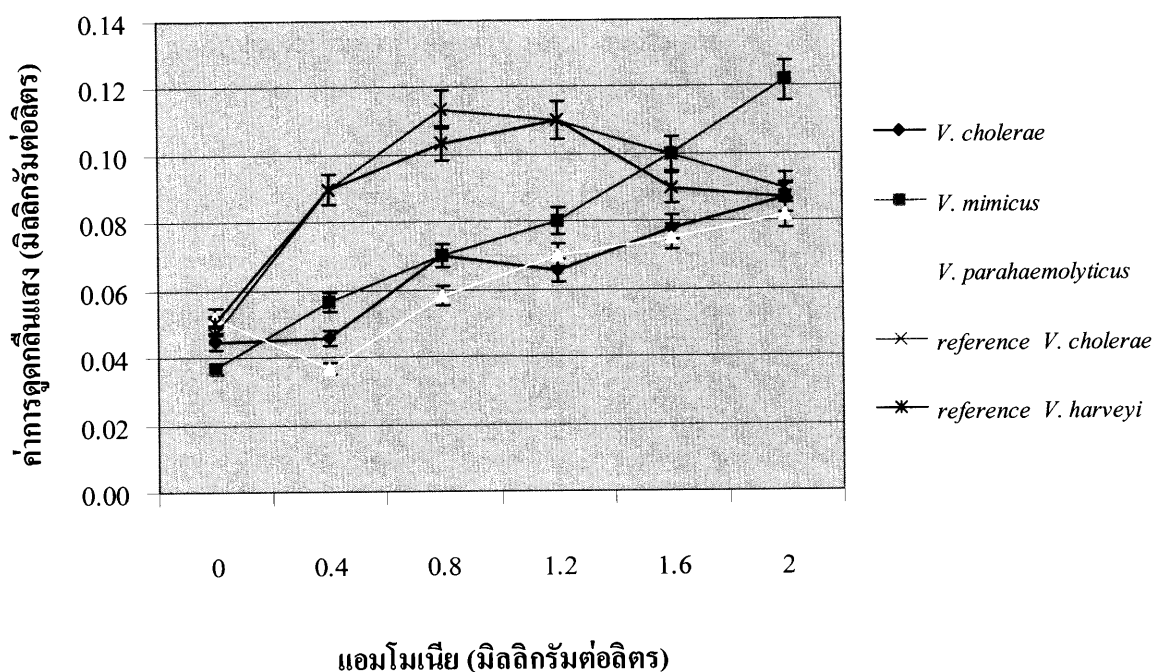
จากการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของเชื้อสกุล *Vibrio* ทุกสายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่ความเค็ม 10-40 ส่วนในพันส่วน และสามารถเจริญได้ดีที่ความเค็ม 10-30 ส่วนในพันส่วน และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเค็มสูงขึ้น นอกจากนี้พบว่าที่ระดับความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถเจริญได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลของความเค็มต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม

4.3.4 การศึกษาผลของแอมโมเนียต่อการเจริญของเชื้อ

เชื้อ *Vibrio* ทุกสายพันธุ์ ที่นำมาศึกษาผลของแอมโมเนียต่อการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อทั้งหมดที่ทำการศึกษาศึกษาสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีหรือไม่มีแอมโมเนีย คือ ตั้งแต่ระดับ 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ระดับแอมโมเนีย 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญได้ โดยทุกชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ระหว่าง 0.04-0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 5) ยกเว้นสายพันธุ์ ชนิด KKU 46004 เจริญได้น้อยในความเข้มข้นของแอมโมเนียทุกระดับและเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ทำการศึกษาทุกสายพันธุ์ในระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียต่างๆ พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีขึ้นเมื่อมีปริมาณแอมโมเนียที่สูงขึ้นซึ่งระดับสูงสุดในการศึกษาค้างนี้คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสอดคล้องกับค่าแอมโมเนียที่วัดได้จากน้ำในโรงเพาะฟักที่เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่เกิดโรคเรืองแสง ซึ่งมีค่าอยู่ที่ระดับ 0.61-0.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในระดับที่เชื้อ *Vibrio* ทุกสายพันธุ์ เจริญได้ดี



ภาพที่ 5 ผลของแอมโมเนียต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม

4.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ผลของการทดสอบความไวของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม จำนวน 48 สายพันธุ์และสายพันธุ์อ้างอิง 1 สายพันธุ์ ต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 15 ชนิด พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทำทดสอบไวต่อ streptomycin มากและต้านทานต่อยา amoxycillin, ampicillin, erythromycin, penicillin และ sulfamethoxazol-trimethoprim และนอกจากนั้นพบว่า แบคทีเรียทุกชนิดไวต่อยา cloxacillin, doxycycline, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid, oxytetracycline, polymyxin B และ tetracycline ในระดับปานกลาง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงจากโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกราม และ *V. harveyi* 14126 ต่อยาปฏิชีวนะ

ชื่อยาปฏิชีวนะ (ไมโครกรัม)	ผลการทดสอบ (จำนวนสายพันธุ์)				
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	unidentified
Amoxycillin (10)	R(27)	R(4)	R(12)	R(1)	R(5)
Ampicillin (10)	R(27)	R(4)	R(12)	R(1)	R(5)
Cloxacillin (10)	I(27)	I(4)	I(12)	I(1)	I(5)
Doxycycline (30)	S(24) I(3)	S(4)	S(11) I(1)	S(1)	S(3) I(2)
Erythromycin (15)	R(27)	R(4)	R(12)	R(1)	R(5)
Kanamycin (15)	I(27)	I(4)	I(12)	I(1)	I(5)
Neomycin (30)	S(17) I(10)	S(3) I(1)	S(6) I(6)	I(1)	S(3) I(2)
Norfloxacin (10)	S(23) I(4)	S(4)	S(8) I(4)	S(1)	S(1) I(4)
Oxolinic acid (2)	I(27)	I(4)	I(12)	I(1)	I(5)
Oxytetracycline (30)	I(11) R(16)	I(2) R(2)	I(4) R(8)	I(1)	I(1) R(4)
Penicillin (10)	R(27)	R(4)	R(12)	R(1)	R(5)
Polymyxin B (300)	I(14) R(13)	I(3) R(1)	I(7) R(5)	I(1)	I(2) R(3)
Streptomycin (300)	S(27)	S(4)	S(12)	S(1)	S(5)
Sulfamethoxazol-trimethoprim (10)	R(27)	R(4)	R(12)	R(1)	R(5)
Tetracycline (30)	I(10) R(17)	I(1) R(3)	I(7) R(5)	I(1)	I(2) R(3)
หมายเหตุ	S = ไวต่ออย่างมาก I = ไวต่อปานกลาง R = ต้านทานต่อยา				

4.5 การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ

4.5.1 การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในลูกกุ้งก้ามกราม

การหาค่า Median lethal concentration (LC_{50}) ของเชื้อโดยวิธีการแช่ (immersion technique) เพื่อศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในลูกกุ้งก้ามกราม โดยเลือกเชื้อที่แยกได้มาชนิดละ 1 สายพันธุ์ คือ *V. cholerae* สายพันธุ์ KKU 46001, *V. mimicus* สายพันธุ์ KKU 46010, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ KKU 47015 และสายพันธุ์อ้างอิง *V. harveyi* ATCC 14126 เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อแต่ละระดับความเข้มข้น โดยเชื้อที่ต้องการทดสอบ แต่ละกลุ่ม มีความเข้มข้น 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 , 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ทดสอบมีค่า LC_{50} 1.0×10^6 , 1.0×10^6 , 1.79×10^6 และ 1.12×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่า LC_{50} ของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรัง
แสงในโรงเพาะฟัก ในเวลา 96 ชั่วโมง

ชนิดและสายพันธุ์	LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	1.12×10^6
<i>V. parahaemolyticus</i> KKU 47015	1.79×10^6
<i>V. mimicus</i> KKU 46010	1.0×10^6
<i>V. cholerae</i> KKU 46001	1.0×10^6

4.5.2 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในลูกกุ้งก้ามกราม

จากการหาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์ ในลูกกุ้งก้ามกราม ที่แช่ด้วยเชื้อ *Vibrio* ในเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อที่นำมาใช้ทดสอบ 4 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง คือ *V. cholerae* KKU 46001, *V. mimicus* KKU 46010, *V. parahaemolyticus* KKU 47015 *V. harveyi* ATCC 14126 เปรียบเทียบกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มควบคุม ทุกกลุ่มการทดลองใช้ระดับความเข้มข้นเท่ากัน คือ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองใส่เชื้อลงในโหลบรรจุลูกกุ้งก้ามกราม อายุ 21 วัน ระยะเวลา 96 ชั่วโมง บันทึกอัตราการตายในช่วงเวลาที่ทดลองพบว่าเชื้อ *V. cholerae* KKU 46001 และ *V. mimicus* KKU 46010 ทำให้มีการตายสะสม 97.78 ± 1.92 และ 96.67 ± 3.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* KKU 47015 และ *V. harveyi* ATCC 14126 ที่พบการตายสะสมของลูกกุ้งก้ามกราม 84.44 ± 5.09 และ 85.56 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมพบว่าอัตราการตายสะสมของลูกกุ้งก้ามกราม 31.11 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ใส่เชื้อแบคทีเรียในการทดสอบพบว่า กลุ่มที่ใส่เชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งก้ามกรามสูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของลูกกุ้งก้ามกรามที่แช่ด้วยเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงจากโรงเพาะฟัก ที่ความเข้มข้น 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

กลุ่มการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม Mean $\pm$ SD
กลุ่มควบคุม	31.11 ± 1.92^c
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	85.56 ± 1.92^b
<i>V. parahaemolyticus</i> KKU 47015	84.44 ± 5.09^b
<i>V. mimicus</i> KKU 46010	96.67 ± 3.33^a
<i>V. cholerae</i> KKU 46001	97.78 ± 1.92^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม

จากการหาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์ ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม ที่ฉีดโดยเชื้อไวรัสในเวลา 96 ชั่วโมง เชื้อที่นำมาใช้ทดสอบ 4 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง คือ *V. cholerae* KKU 46001, *V. mimicus* KKU 46010, *V. parahaemolyticus* KKU 47015 *V. harveyi* ATCC 14126 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยทุกกลุ่มการทดลอง ใช้ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียแต่ละชนิดเท่ากันคือ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองฉีดเชื้อที่ทดสอบเข้าบริเวณกล้ามเนื้อข้างลำตัวพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามขนาด 50-60 กรัม ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรต่อตัว เท่ากันทุกกลุ่มการทดลอง ระยะเวลา 96 ชั่วโมง บันทึกอัตราการตาย พบว่าเชื้อ *V. cholerae* KKU 46001 และ *V. parahaemolyticus* KKU 47015 ทำให้เกิดการตายสะสมของกุ้ง 51.11 ± 5.09 และ 48.89 ± 8.39 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *V. mimicus* KKU 46010 และ *V. harveyi* ATCC 14126 ที่ทำให้เกิดการตายสะสมของพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม 33.33 ± 3.33 และ 34.44 ± 5.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมของกุ้ง 15.56 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ฉีดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด พบว่ากลุ่มที่ฉีดเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการตายของกุ้งก้ามกรามสูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม ที่แช่ด้วยเชื้อแบคทีเรียสกุล

Vibrio ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงจากโรงเพาะฟัก ที่ความเข้มข้น 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

กลุ่มการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม Mean $\pm$ SD
กลุ่มควบคุม	15.56 ± 1.92^c
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	34.44 ± 5.09^b
<i>V. parahaemolyticus</i> KKU 47015	48.89 ± 8.39^a
<i>V. mimicus</i> KKU 46010	33.33 ± 3.33^b
<i>V. cholerea</i> KKU 46001	51.11 ± 5.09^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติของ ($p < 0.05$)