บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียเรืองแสงที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงและทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล โดยจะทำให้กุ้งตายได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ในระยะนอเพลียสจนถึงระยะโพสลาวาร์ ซึ่งเป็นตัวเต็มวัยที่เลี้ยงในบ่อดิน กุ้งที่ติดเชื้อในช่วงแรกจะมีอาการเคลื่อนที่ช้าลง อ่อนแอ ลำตัวสีขาวขุ่น ตับอ่อนซีด ถ้ากรณีที่ติดเชื้อจำนวนมากจะสังเกตเห็นการเรืองแสงในช่วงกลางคืน และจะนำไปสู่การตายของกุ้งในเวลาอันสั้น โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *V. harveyi* ในตัวกุ้งหรือในสิ่งแวดล้อมที่กุ้งอยู่อาศัย ทำโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมเกลือ 1-2 เปอร์เซ็นต์ แล้วดูการเรืองแสงของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อในที่มืด ซึ่งมีความผิดพลาดได้ เนื่องจากเชื้อ *V. fisheri*, *V. splendidus* I, *V. orientalis*, *V. cholerae* biotype albensis, *V. logei*, และเชื้อจีนัส Photobacterium ได้แก่ *P. leiognathi* และ *P. phosphoreum* ซึ่งไม่มีรายงานว่าก่อโรคในกุ้งก็สามารถเรืองแสงได้ เช่นกัน (Oliver *et al.*, 1986) ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *V. harveyi* ที่ปนเปื้อนในตัวอ่อนอาหารทะเล โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว (Rojlorsakul *et al.*, 1998; Steffan and Atlas, 1996) สำหรับการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ส่วนของ *gyrB* เป็นจีนเป้าหมายในการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากเป็นจีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจำลองดีเอนเอในเชื้อจุลินทรีย์ เป็นจีนที่เหมาะสมมากกว่าการใช้ 16S rRNA สามารถพบได้ทั่วไปในแบคทีเรีย มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมทำให้ไม่มีโอกาสจะส่งผ่านไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้และยังไม่พบการกลายพันธุ์ ในช่วงการเจริญของเชื้อ (Yamamoto and Harayama, 1995) กล่าวคือ จีน *gyrB* มี evolution rate ที่สูงกว่า 16S rRNA Ochman and Wilson (1987) รายงานว่าค่าเฉลี่ยของการวิวัฒนาการ (average substitution rate) ของ 16S rRNA เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 50 ล้านปี ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของ protein-coding DNA

เท่ากับ 0.7-0.8 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 1 ล้านปี นอกจากนี้ 16S rRNA ยังมีการแปรผันในเชื้อต่างสายพันธุ์ เนื่องจากมี multiple gene copies ภายในแบคทีเรียหนึ่งๆ (Cilia *et al.*, 1996) อาจจะนำไปสู่ความผิดพลาดขึ้นได้เมื่อใช้ส่วนของ 16S rRNA มาออกแบบไพรเมอร์ไปใช้ในการบ่งชี้เชื้อกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากคุณสมบัติดังกล่าวของจีน *gyrB* ทำให้ถูกนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการบ่งชี้เชื้อโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ได้แก่ *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran *et al.*, 1997) , *V. hollisae* (Vuddhakul *et al.*, 2000) และ *B. cereus* (Yamada *et al.*, 1999)

ในการเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* ครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ UP-1 และ UP-2r ซึ่งเป็น universal primer ของจีน *gyrB* ที่ใช้ในแบคทีเรียหลายชนิดโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ (Kasai *et al.*, 2000) โดยจะให้ผลผลิตของจีน *gyrB* ในแบคทีเรียต่างๆ ขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (Yamamoto and Harayama, 1995) ในเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วยไพรเมอร์ UP-1 และ UP-2r พบว่าผลผลิตของจีน *gyrB* มีขนาดเท่ากับ 1.174 กิโลเบส เมื่อทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* พบว่าบาง ไพรเมอร์ให้ผลบวกกับเชื้อ Vibrio สปีชีส์อื่น โดยไพรเมอร์ 1 คู่ คือ F_1F_2 ให้ผลบวกกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ตาราง 3.4) ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ F_1F_2 และ A_3F_2 ให้ผลบวกกับ *V. damsela* และ *V. mimicus* ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ F_1F_2, A_1B_3 และ F_1B_5 ให้ผลบวกกับ *V. hollisae* และไพรเมอร์ 8 คู่ ได้แก่ F_1F_2 , A_3F_2 , A_2F_2 , F_1B_5 , A_1B_3 , A_2B_5 , A_3B_5 และ A_4F_2 ให้ผลบวกกับ *V. carchariae* ไพรเมอร์จำนวนมากให้ผลบวกกับ *V. carchariae* เนื่องจาก *V. harveyi* และ *V. carchariae* มีคุณลักษณะทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกันมาก กล่าวคือ เชื้อ *V. carchariae* ให้ผล TSI เป็น K/A ไม่สามารถย่อยอาร์จินิน สามารถย่อย ไลซีน และออร์นิทินได้ เจริญได้ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถหมักน้ำตาลอะราบิโนสได้ ให้ผลบวกกับการทดสอบ อินโดล และสามารถสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส เจลลาติเนส ออกซิเดส ได้ แตกต่างจาก *V. harveyi* โดยการหมักน้ำตาลทรีฮาโลส (trehalose) *V. carchariae* ไม่สามารถหมักน้ำตาลทรีฮาโลสได้ แต่ *V. harveyi* สามารถหมักได้ เมื่อทำการบ่งชี้โดยใช้วิธี amplification fragment length polymorphism และ ribotyping พบว่าให้รูปแบบของชิ้นส่วนของดีเอนเอที่คล้าย

กันมาก และ DNA-DNA hybridization เหมือนกันถึง 88 เปอร์เซ็นต์ (Redersen *et al.*, 1998) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ลำดับเบสตรงส่วนจีน *gyrB* คล้ายกันมาก แม้ว่าเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่ของไพรเมอร์กับดีเอนเอเป็นเป้าหมายแล้วก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไพรเมอร์ A_2B_3 มีความจำเพาะกับเชื้อ*V. harveyi* มากที่สุด แต่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการจับคู่เบสของไพรเมอร์กับดีเอนเอเป้าหมาย (annealing) สูงถึง 63 องศาเซลเซียส เพราะที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียสจะเกิดผลบวกกับเชื้อ *V. carchariae* ด้วย Innis และคณะ (1992) รายงานว่า อุณหภูมิ annealing ที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดี อยู่ในช่วง 55-72 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจะช่วยให้ความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไพรเมอร์เพิ่มสูงตามไปด้วย ในทางตรงกันข้ามถ้าอุณหภูมิต่ำอาจเกิดการจับคู่ผิดพลาด ในการแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารทะเลใช้ LA agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่เรืองแสง แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อแยกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. harveyi* จากผลการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีผลการทดสอบเบี่ยงเบน (variation) ไม่เป็นไปตาม key มาตรฐานของ Baumann and Schubert (1984) และ Reichelt and Baumann (1973) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ในอาหารทะเลชนิดต่างๆ ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยที่มีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณสารอาหาร ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น อย่างไรก็ตามในการทดสอบนี้ได้ใช้ L-tyrosine เป็นตัวแยกเชื้อ *V. harveyi* ออกจากแบคทีเรียเรืองแสงอื่นๆ เพราะพบว่า L-tyrosine จะเป็นตัวกำหนด ความแตกต่างของเชื้อ *V. harveyi* จากเชื้ออื่นๆดีที่สุด (Baumann and Schubert (1984) และ Reichelt and Baumann (1973) โดยเชื้อ *V. harveyi* จะสามารถใช้ L-tyrosine ได้ แต่เชื้อ *V. fisheri* *V. orientalis* *V. cholerae* biotype albensis *V. logei* *V. vulnificus* และเชื้อจีนัส Photobacterium ได้แก่ *P. leiognathi* และ *P. phosphoreum* ไม่สามารถใช้ได้ ในการศึกษานี้พบว่า เชื้อที่ให้ผล A L O เป็น - + + ให้ผล L-tyrosine เป็นบวก 24 สายพันธุ์ ให้ผลสัมพันธ์กับผลการบ่งชี้ *V. harveyi* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ตาราง3.6 และ3.7) มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ให้ผลลบต่อ L-tyrosine แต่ให้ผลบวกกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ทดสอบ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* ที่กลายพันธุ์หรือเป็นเชื้อชนิดอื่น

นอกจากนี้ยังพบเชื้อ 2 สายพันธุ์ ที่ให้ผล L-tyrosine เป็นบวก แต่ให้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นลบ ซึ่งน่าจะเป็น *V. splendidus* I ที่มีรายงานว่าให้ผล L-tyrosine เป็นบวกหรือลบก็ได้ (Reichelt and Baumann, 1973)