สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองครั้งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรค ซึ่งลักษณะภายนอกของตังกุ้งจะมีสีเข้ม เปลือกกรอบแกรบ ตัวหลวม มีน้ำขังในบริเวณข้อต่อระหว่างส่วนหัวและลำตัวมากกว่ากุ้งปกติ นอกจากนั้นลักษณะที่สังเกตได้ภายนอกคือเปลือกและระยางค์กร่อนบางบริเวณ จากการแยกเชื้อจากกุ้ง 10 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่แยกมาคือ *V. harveyi* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและมีคุณสมบัติทางชีวเคมี คือโคโลนีสีขาว นวล ขอบเรียบ มันวาว จากการย้อมแกรมพบว่ามีรูปแท่ง ติดสีแกรมลบ ต้องการเกลือในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยเชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ตั้งแต่ 2-8 เปอร์เซนต์ เจริญดีที่อุณหภูมิ 30-35°ซ ส่วนใหญ่ไม่เจริญได้ที่ 4°ซ สามารถผลิตเอนไซม์ อะไมเลส เจลลาติเนส ออกซิเดส คะตาเลส สามารถย่อยสลายไลซีน และออร์นิทีน แต่ไม่ย่อยอาร์จินิน สร้างกรดจากการใช้น้ำตาลกลูโคส มอลโตส แมนโนส ซูโครส ฟรุคโตส และแมนนิทอล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ มณเฑียร และคณะ (2533). สาวิตรี (2541); Baumann และคณะ (1984) Jiravanichpaisan และคณะ (1995); และ Suwanto และคณะ (1998) อย่างไรก็ตาม จากการเก็บและแยกเชื้อ *V. harveyi* ในครั้งนี้พบว่าบางสายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4°C และในน้ำที่มีความเข้มของเกลือ 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งแตกต่างจากรายงานข้างต้น แสดงให้เห็นได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปรับตัวให้ทนได้ในอุณหภูมิและความเค็มช่วงกว้างขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ สุภฎาและคณะ (2543) ที่ว่าเชื้อ *V. harveyi* เจริญได้ดีในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 5-60 ส่วนในพันส่วน โดยเฉพาะในน้ำที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 25-32°ซ จะเจริญได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ Lavilla-Pitogo และคณะ (1998) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีที่ความเค็มตั้งแต่ 5-70 ส่วนในพันส่วน จึงอาจจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้มีการแพร่ระบาดได้เป็นบริเวณกว้างทั่วทุกภูมิภาคของโลก

ส่วนจากการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ ต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด พบว่า 20 40 50 60 60 และ 70 เปอร์เซนต์ ของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาคลอแรมฟินิคอล นอร์ฟล็อกซาซิน ไตรเมธโธพริม-ซัลฟาเมทอกซาโซน ออกซี่เตตร้าซัยคลิน และออกโซลินิก แอซิด และซาราฟล็อกซาซิน ตามลำดับ นอกจากนี้ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. จากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคและทำการทดสอบความไวของเชื้อในกลุ่มนี้ต่อยาปฏิชีวนะพบว่า เชื้อมีการดื้อต่อยา 5 ชนิดคือ คลอแรมฟินิคอล ออกโซลินิก แอซิด ไตรเมทโตรพริม-ซัลฟาเมทอกซาโซน ออกซี่เตตร้าซัยคลิน และซาราฟล็อกซาซิน สูง

กว่า 50 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มนอร์ฟล็อกซาซิน 35.55 เปอร์เซนต์ แตกต่างจาก Ruangpan and Kitao 1992. Prapassorn 1995. Sudthongkong. 1996. Ruangpan. 1997 ที่รายงานในปี 1996 พบว่าเชื้อแบคทีเรียในสกุลวิบริโอ ดื้อต่อยาคลอแรมฟินิคอล และไตรเมทโทรพริม 20 เปอร์เซนต์ ดื้อต่อยาออกโซลินิก แอซิด 45 เปอร์เซนต์ และเชื้อดื้อยากลุ่มออกซี่เตตร้าซัยคลิน 0.4 เปอร์เซนต์ ส่วนมณแฑียร และคณะ (2533) รายงานการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จากลูกกุ้งกุลาดำทั้งหมด 93 ตัวอย่างทดสอบความไวของเชื้อดังกล่าวต่อยาปฏิชีวนะ 13 ซึ่งมียาคลอแรมฟินิคอล และไตรเมธโธพริม ด้วยพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ ไม่ดื้อยาทั้ง 2 ชนิดข้างต้น จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าแบคทีเรียมีการปรับตัวดื้อต่อยาบางกลุ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่อย่างไรก็ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายาบางตัวยังสามารถใช้ได้ดีอยู่ คือนอร์ฟล็อกซาซิน ซึ่งจากรายงานในปี 1996 พบว่าเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาชนิดนี้สูงถึง 90 เปอร์เซนต์ (Ruangpan *et al.*, 1997) แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ 10 สายพันธุ์ ดื้อต่อยาแค่ 40 เปอร์เซนต์ และแนวโน้มของเชื้อในกลุ่ม *Vibrio spp.* ดื้อต่อยาชนิดนี้ 35.55 เปอร์เซนต์

ส่วนการศึกษาถึงความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* 10 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อบางสายพันธุ์ มีความรุนแรงสูงมาก โดยปริมาณที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซนต์ ภายใน 10 วัน 1.60 - 3.79x 10^5 CFU/0.1 มล และจากข้อมูลโดยรวมพบว่าปริมาณเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซนต์ ภายใน 10 วัน มีค่าประมาณ 10^6 CFU/0.1 มล (1.11-7.27x10^6 CFU/0.1 มล) ซึ่งพบว่ามีค่าสูงขึ้นมาก (OD 0.007-0.136) จากรายงานของ สาวิตรี (2541) ที่ได้ทำการแยกเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความรุนแรงสูงๆ เพื่อผลิตวัคซีน พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีค่า LD_{50} สูงถึง 7.33x10^7 CFU/มล และจากการทดลองของ Pillai และ Jayabalan (1993) พบว่ากุ้งแชบ๊วยไม่แสดงอาการเป็นโรคเมื่อแช่ด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น 10^3 10^4 และ 10^5 CFU/มล นาน 1 ชั่วโมง ส่วน มณเฑียรและคณะ (2533) ได้ทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกได้จากลูกกุ้งกุลาดำ และทดสอบการเกิดโรคในลูกกุ้งระยะโพสต์ลาวา 7 (PL7) ความเข้มข้นของเชื้อที่วัดค่าความทึบแสงที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซนต์ มีค่าสูงมาก คือมีความทึบแสง 0.54-0.84 ซึ่งพบว่าเป็นค่าที่สูงมากเมื่อเทียบกับปัจจุบันโดยเฉพาะในลูกกุ้งซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อโรคต่ำกว่ากุ้งโตมาก ส่วน Jiravanichpaisan และคณะ (1994) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ฉีดเชื้อ 10^5-10^6 CFU/0.1 มล จะตาย 53-100 เปอร์เซนต์ หลังจากฉีดเชื้อ 1-7 วัน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า *V. harveyi* ก่อให้เกิดความเสียหาย

มากในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความรุนแรงค่อนข้างสูงมากเมื่อเทียบกับในอดีต ยิ่งไปกว่านั้น พบว่าสายพันธุ์ที่เรืองแสงมีความรุนแรงสูงกว่าและมีเปอร์เซ็นต์ในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่เรืองแสง สัมพันธ์กับข้อสังเกตของ Abraham *et al.* (1997) ที่พบว่าเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่เรืองแสงมีการดื้อต่อยาสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่เรืองแสง

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในของตัวกุ้งโดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดพบว่า กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่ากุ้งปกติมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเป็นสิ่งแปลกปลอม เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งจะมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอมเพื่อกำจัดออกนอกตัว จึงทำให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง สอดคล้องกับรายงานของ *Martin* และคณะ (1993) ที่ว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้ง *Sicyonia ingentis* ลดลง 20 เปอร์เซนต์ หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง กิจการและคณะ (2543) ได้ทดลองฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกุ้งพบว่าปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงทันทีในชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 2 และ 3 และเมื่อตรวจผลทางเนื้อเยื่อวิทยาพบเม็ดเลือดจำนวนมากเข้ามาล้อมจับเซลล์ยีสต์ และปริมาณเม็ดเลือดเริ่มไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากชั่วโมงที่ 4 แล้วจะเพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง และเข้าสู่ระดับปกติภายใน 48 ชั่วโมง แต่จากการทดลองครั้งนี้แม้ว่าเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงยังพบว่าปริมาณเม็ดเลือดยังคงมีระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งคือแบคทีเรียซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณในตัวกุ้งได้ จึงทำให้เม็ดเลือดยังคงต้องทำหน้าที่ในการกำจัดอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้จากผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดบนอาหารทดสอบ Blood Agar พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถย่อยเม็ดเลือดได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนรายงานการศึกษาของ Lee และคณะ (1995) ที่ว่าแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอบางสายพันธุ์สามารถผลิตสาร hemolysin ที่ย่อยเม็ดเลือดทำให้เม็ดเลือดตายแล้วถูกกำจัดออกนอกร่างกาย นอกจากนั้น Montero และคณะ (1999) ตรวจพบสาร hemolysin ที่มีความเข้มข้นสูงมากจากเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์โปรดักซ์ ของเชื้อ *V. harveyi* เมื่อทดสอบการย่อยเม็ดเลือดพบว่าสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงของ ลา ม้า และแกะ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นไปได้สูงว่าเม็ดเลือดบางถูกย่อยด้วยสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรียแล้วถูกกำจัดออกนอกร่างกาย จึงทำให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง

ส่วนองค์ประกอบเลือดอื่นๆที่ได้ทำการศึกษาพบความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อสูงกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งจากรายงานการศึกษาของ กิจการและคณะ

(2543) ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำปกติในสภาพบ่อเลี้ยงมีค่าเฉลี่ย 7.4 และในกรณีที่นำกุ้งปกติมาเลี้ยงไว้ในสภาพของบ่อทดลองความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดจะเพิ่มขึ้นโดยมีค่าเฉลี่ย 7.7 แต่การศึกษานี้พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดสูงถึง 7.89 สอดคล้องกับรายงานของ ยอดยิ่ง (2541) ที่ว่าเมื่อแบคทีเรียเข้าไปในกระแสเลือดจะมีการใช้เลือดซึ่งมีโปรตีนสูงเป็นอาหาร แล้วปล่อยแอมโมเนียอิสระ รวมทั้งสารประกอบพวก phenate ที่เกิดในกระบวนการเมแทโบไลท์ของแบคทีเรียซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่าง ซึ่งส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียสูงขึ้น ดังนั้นความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดที่เพิ่มกว่าค่าปกติสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความผิดปกติจากการติดเชื้อได้ โดยเฉพาะความผิดปกติจากเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งที่เกิดการติดเชื้อในกลุ่มอื่นๆ มาก่อน แต่มีรายงานว่าการผันแปรของค่าความเป็น-ด่างของน้ำเลือดกุ้งอาจมีผลมาจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่นในกุ้งขาว *Penaeus paulensis* พบว่าพีเอชของน้ำเลือดเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแอมโมเนียมากกว่า 20 ส่วนในล้านส่วน (Schmitt and Santos. 1999) ซึ่งในสภาพการเลี้ยงจริงๆ นั้นผู้ประกอบการสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียไม่ให้มีค่าเกิน 0.05 ส่วนในล้านส่วน อยู่แล้ว ปัจจัยดังกล่าวจึงไม่น่าจะมีผลมากนัก

ส่วนปริมาณโปรตีนในซีรัมพบว่า ในช่วง 24 ชั่วโมงที่ฉีดเชื้อปริมาณโปรตีนในซีรัมต่ำมากแต่เมื่อผ่านไปจนถึง 48 ชั่วโมงไม่พบความแตกต่าง เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลในเลือด และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ก็ไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลในเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งเป็นเพราะว่าการติดเชื้อแบคทีเรีย ทำให้กุ้งอยู่ในสภาวะที่มีความเครียด จากรายงานของ Hall และ Van-Ham (1998) พบว่าในภาวะที่กุ้งเกิดความเครียด เช่นจากการลดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจาก 6.6 มก/ลิตร เหลือ 5.9 มก ลิตร มีผลให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นจาก 1.1 มิลลิโมล/ลิตร เป็น 2.3 มิลลิโมล/ลิตร และจากรายงานของ Luo (1996) ที่ได้ทำการศึกษาในกุ้งแชบ๊วย *P. chinensis* กุ้งที่ถูกฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอมีปริมาณกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น และปริมาณของโปรตีนในซีรัมลดลงเล็กน้อยเช่นกัน ส่วนความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่พบว่าในช่วงแรกมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม อาจเป็นเพราะกุ้งได้รับเชื้อแบคทีเรียที่ผนังเซลล์มีส่วนประกอบของไลโพพอลิแซคคาร์ไรด์และเพปทิโดกลัยแคน ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Unestem and Soderhall.1977) จึงทำ

ให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ในร่างกายได้ สัมพันธ์กับรายงานของ Sung และคณะ (1996) ที่ว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ที่ฆ่าด้วยความร้อน β-1.3 glucan และ Zymosan ด้วยวิธีการแช่ จะมีความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 3 ชั่วโมงแรกหลังจากการแช่ และมีค่าลดลงอยู่ในระดับปกติที่ 72 ชั่วโมง จากรายงานของ Devaraja และคณะ (1998) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งที่ให้กินอาหารผสมแบคทีรินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *V. harveyi* และกลูแคนมีค่าเพิ่มขึ้นกว่าชุดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน แสดงว่าองค์ประกอบของผนังเซลล์ หรือสารประกอบอื่นที่ผลิตจากแบคทีเรีย และยีสต์ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งได้ ซึ่งแนวทางดังกล่าวสามารถพัฒนาการผลิตวัคซีนหรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าเมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวกุ้ง ถ้ากุ้งไม่สามารถกำจัดเชื้อดังกล่าวได้ภายใน 48 ชั่วโมง เชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้น เข้าทำลายเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย ทั้งในเหงือก ตับ ต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอื่นๆ จนทำให้เกิดการเสียสภาพของเซลล์ ซึ่งมีผลให้กระบวนการต่างๆ ของร่างกายไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้กุ้งที่ติดเชื้อตายได้ในปริมาณมาก

สรุป

จากการศึกษาทำให้ทราบว่าสาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสมเกลือ มีขอบเรียบ มันวาว การเจริญบนอาหาร TCBS มีทั้งโคโลนีสีเหลืองและสีเขียว มีทั้งชนิดที่เรืองแสงและไม่เรืองแสงในที่มืด และสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้จากการทดสอบบน BA จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่าเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมีแนวโน้มดื้อยามากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้ศึกษาดังกล่าวมีความรุนแรงค่อนข้างสูง โดยเฉพาะในกลุ่มที่เรืองแสงมีความรุนแรงสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เรืองแสง รวมทั้งกลุ่มที่เรืองแสงมีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาสูงกว่าด้วย การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาโดยการศึกษาองค์ประกอบเลือดพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อมีปริมาณเม็ดเลือดลดลงมากกว่า 30 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดมีค่าสูงกว่ากุ้งปกติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้น ส่งผลให้กระบวนการต่างๆ ในร่างกายเปลี่ยนแปลงได้ ไม่ว่าเป็นการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของเหงือก ความสามารถในการจับออกซิเจนของน้ำเลือดลดลง มีผลให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอในการเลี้ยงเซลล์ หรือในกระบวนการหายใจของเซลล์ นอกจากนั้นการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีผลให้เนื้อเยื่อและเซลล์ส่วนต่างๆ อักเสบและตาย ความบกพร่องดังกล่าวจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของตัวกุ้งลดลง กินอาหารลดลง อ่อนแอ มีการแทรกซ้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย จนทำให้เกิดการตายสร้างความสูญเสียในที่สุด ดังนั้นแนวทางในการจัดการเพื่อหลีกเลี่ยง หรือลดความสูญเสียจากเชื้อดังกล่าวสามารถทำได้ โดยการตรวจสอบสุขภาพของกุ้งอย่างสม่ำเสมอ ในกรณีที่กุ้งเริ่มติดเชื้อควรมีการทดสอบและเลือกใช้ยาที่เหมาะสมในการรักษาโรค รวมทั้งควบคุมสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเพื่อลดความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นได้