



การศึกษาลักษณะของยีน *hhl* ใน *Vibrio harveyi* และการศึกษาความชุกของยีน *hlyA*
ใน non-cholerae *Vibrio*
Characterization of *hhl* gene in *Vibrio harveyi* and Prevalence of *hlyA* gene
in Non-cholerae *Vibrio*

ภาชนี กิสลัย
Phachinee Kissalai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาลักษณะของยีน *hhl* ใน *Vibrio harveyi* และการศึกษาความชุกของ
 ยีน *hlyA* ใน non-*cholerae* *Vibrio*
 ผู้เขียน นางสาวภาชินี กิสสัย
 สาขาวิชา จุฬชิววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)

.....ประธานกรรมการ
 (ดร.พวงทิพย์ ภู่งษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
 (ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)

.....
 (ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์)

.....กรรมการ
 (ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์)

.....กรรมการ
 (ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาหาร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวภาชีนี กิสสัย)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวภาชีนี กิสสัย)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาลักษณะของยีน <i>hhl</i> ใน <i>Vibrio harveyi</i> และการศึกษาความชุกของยีน <i>hlyA</i> ใน non-cholerae <i>Vibrio</i>
ผู้เขียน	นางสาวภาชนิ กิสสัย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของยีน *hlyA* ของ *Vibrio cholerae* ที่ตรวจพบใน *V. harveyi* (เรียกว่า ยีน *hhl*) และศึกษาผลของความเค็ม และ pH ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl*⁺ *V. harveyi* และ *hhl*⁻ *V. harveyi* นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความชุกและการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hlyA*⁺ non-cholerae *Vibrio* ที่แยกจากอาหารทะเล ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *hhl* ที่พบใน *V. harveyi* พบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* การศึกษาการเจริญของเชื้อที่สภาวะต่าง ๆ พบว่า *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์มีอัตราการเจริญสูงสุดในสภาวะที่มี 3% NaCl, pH 8.6 อย่างไรก็ตามความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl*⁺ *V. harveyi* เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเค็ม และ pH ที่แตกต่างกันไปจากสภาวะดังกล่าว โดยพบว่าที่ pH 7.3 เชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 0.5% และ 1.5% NaCl มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่าที่เชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 3% NaCl และเชื้อที่เจริญที่ pH 5 และ pH 8.6 มีความสามารถสลายเม็ดเลือดแดงสูงที่สุดในทุกความเค็มที่ทดสอบ ส่วนผลการศึกษา non-cholerae *Vibrio* จำนวน 231 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาหารทะเลพบเชื้อเพียง 2 ไอโซเลท (*V. parahaemolyticus* VP40 และ *V. alginolyticus* VA55) ที่ให้ผลบวกกับการตรวจหายีน *hlyA* ด้วยเทคนิค colony blot hybridization แต่มีเพียง *V. alginolyticus* VA55 ที่ให้ผลการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่าเชื้อสปีชีส์เดียวกันที่นำมาทดสอบ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ยีน *hhl* ของ *V. harveyi* และยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่ง *V. harveyi* อาจได้รับการถ่ายทอดยีนมาจาก *V. cholerae* และการได้รับยีนทำให้เชื้อสายพันธุ์ที่มียีน *hhl* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มียีนดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ความเค็ม และ pH ส่งผลต่อความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl*⁺ *V. harveyi* แต่ไม่พบว่ามีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในตัวอ่อนของหนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) ส่วนการแยกเชื้อจากอาหารทะเลพบความชุกของ *hlyA*⁺ non-cholerae *Vibrio* เพียง 0.01% และต้องทำการยืนยันการปรากฏของยีน *hlyA* ที่ตรวจพบก่อนจึงจะสามารถบอกความสัมพันธ์ของการปรากฏของยีนดังกล่าวต่อความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อได้ อย่างไรก็ตามการถ่ายโอนยีน *hlyA* จาก *V. cholerae* ไปยัง non-cholerae *Vibrio* อาจส่งเสริมให้เชื้อสายพันธุ์ที่ได้รับยีนสามารถปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย และเพิ่มความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในบางสภาวะได้ การเข้าใจปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อเหล่านี้จะช่วยในการพัฒนามาตรการในการควบคุมเชื้อก่อโรสดังกล่าว

คำสำคัญ: ความรุนแรงในการก่อโรค; ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง; ยีมีไลซิน; *Galleria mellonella*; *hhl*; *hlyA*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio harveyi*; *Vibrio* spp.

Thesis Title	Characterization of <i>hhl</i> gene in <i>Vibrio harveyi</i> and Prevalence of <i>hlyA</i> gene in Non- <i>cholerae</i> <i>Vibrio</i>
Author	Miss Phachinee Kissalai
Major Program	Microbiology
Academic Year	2015

ABSTRACT

The aims of this study were to characterize *Vibrio cholerae hlyA*-like hemolysin gene in *V. harveyi* (designated as *hhl*) and investigate the effects of cultivation broth salinity and pH on their growth and hemolytic activity. In addition, the prevalence and hemolytic activity of *hlyA*⁺ non-*cholerae* *Vibrio* isolates from seafood were also determined. The phylogenetic tree of *hhl* gene showed that *hhl* gene sequence of *V. harveyi* was clustered with the *hlyA* gene sequence of *V. cholerae*. The most rapid growth rates of all *V. harveyi* were achieved at salinities of 3%, pH 8.6, whereas the hemolytic activities of *hhl*⁺ strains were enhanced by environmental parameters of salinity and pH different from those known to be stimulate their growth. At pH 7.3, the hemolytic activity of *hhl*⁺ *V. harveyi* was higher for bacteria grown at 0.5 and 1.5% NaCl than for those grown at 3% NaCl and the highest level of hemolytic activity was observed for *hhl*⁺ strains grown at pH 5 and pH 8.6 in all salinity. For the prevalence of *hlyA*⁺ non-*cholerae* *Vibrio* from seafood, only 2 (*V. parahaemolyticus* VP40 and *V. alginolyticus* VA55) out of the 231 non-*cholerae* *Vibrio* produced *hlyA* positive signals by colony blot hybridization. However, increase in level of hemolytic activity was only observed in *V. alginolyticus* VA55. This study demonstrated that *hhl* gene of *V. harveyi* closely belong to *hlyA* gene of *V. cholerae*. *V. harveyi* strains harboring *hhl* gene appeared to significantly express elevated levels of hemolytic compounds than *hhl*⁻ strains in all culture conditions tested. In addition, salinity and pH had a significant effect on the hemolytic activity of all *hhl*⁺ strains. However these factors had no significantly effect on their virulence against *Galleria mellonella* larvae. The *hlyA* gene was rarely detected (0.01%) in seafood isolates of non-*cholerae* *Vibrio* and their presents require further clarification. However, transfer of *V. cholerae hlyA* virulence gene to non-*cholerae* *Vibrio* may potentially changes their fitness in the environment and may play an important role in modulating the virulence of those bacteria under specific conditions. Understanding these factors may help to develop disease control measures against this pathogen.

Keywords: *Galleria mellonella*; hemolytic activity; hemolysin; *hhl*; *hlyA*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio harveyi*; *Vibrio* spp.; virulence

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(11)
รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ	(12)
สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน	(13)
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
ทฤษฎีและหลักการ	2
ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียสกุล <i>Vibrio</i>	2
ถิ่นที่อยู่และความสำคัญของแบคทีเรียสกุล <i>Vibrio</i>	2
การก่อโรคในสัตว์ของแบคทีเรียสกุล <i>Vibrio</i>	3
สารย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysin) ของแบคทีเรียสกุล <i>Vibrio</i>	3
การวินิจฉัยแบคทีเรียสกุล <i>Vibrio</i>	5
<i>Vibrio harveyi</i> และการก่อโรคของ <i>Vibrio harveyi</i>	5
วัตถุประสงค์	7
ผลการทดลอง	8
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	15
สรุปผลการทดลอง	18
บรรณานุกรม	19
ภาคผนวก	27
ประวัติผู้วิจัย	48

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) ของยีน <i>hhl</i> ของ <i>Vibrio harveyi</i> PSU3282, PSU3283 และ PSU3288 กับยีน <i>hlyA</i> homologues ของแบคทีเรีย <i>Vibrio</i> spp. และ <i>non-Vibrio</i>	8
ตารางที่ 2	จำนวน <i>non-cholerae Vibrio</i> ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ	12

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน <i>hhl</i> ของ <i>Vibrio harveyi</i>	9
รูปที่ 2	ผลของความเค็ม และ pH ต่อการเจริญ และความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ <i>Vibrio</i>	10
รูปที่ 3	ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในสัตว์ทดลอง	11
รูปที่ 4	ความจำเพาะของ <i>hlyA</i> probe	13
รูปที่ 5	Colony blot hybridization เพื่อตรวจหายีน <i>hlyA</i> ใน non- <i>cholerae Vibrio</i>	13
รูปที่ 6	ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (% hemolysis) ของ non- <i>cholerae Vibrio</i> ที่ตรวจพบยีน <i>hlyA</i> ซึ่งแยกจากอาหารทะเล	14

สัญลักษณ์และย่อ

%	=	Percentage
°C	=	Degree Celsius
CFU	=	Colony forming unit
ml	=	Milliliter
ppt	=	part per thousand
PCR	=	Polymerase chain reaction
bp	=	Base pair
NCBI	=	The National Center for Biotechnology Information
NaCl	=	Sodium chloride
DMST	=	Department of medical sciences
DIG	=	Digoxigenin
dUTP	=	Deoxyuridine Triphosphates
dNTPs	=	Deoxynucleotide Triphosphates
mM	=	millimolar
μM	=	micromolar
μl	=	microliter
min	=	minute
s	=	second

รายการผลงานที่ตีพิมพ์และการประชุมวิชาการ

1. **ชื่อภาษาไทย** การตรวจหา ยีน *hlyA* ของเชื้อ *Vibrio cholerae* ไบโอดีทอป El Tor ในเชื้อ non-cholera vibrios ที่แยกได้จากอาหารทะเลโดยอาศัยหลักการ hybridization
ชื่อภาษาอังกฤษ Hybridization-based detection of *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene (*hlyA*) in non-cholera vibrios isolated from seafood

2. **ชื่อภาษาไทย** การศึกษาความชุกและความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ non-cholerae *Vibrio* ที่มี ยีน *Vibrio cholerae hlyA*
ชื่อภาษาอังกฤษ Prevalence and hemolytic activity of non-cholerae *Vibrio* harboring *Vibrio cholerae hlyA*

3. **ชื่อภาษาไทย** ผลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและความรุนแรงในการก่อโรคต่อตัวอ่อนของหนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) ใน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ที่มี ยีน *hlyA* ของ *Vibrio cholerae*
ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of culture conditions on hemolytic activity and virulence toward wax moth larvae (*Galleria mellonella*) of *Vibrio harveyi* strains harboring a gene homologous to *Vibrio cholerae hlyA*

สำเนาต้นฉบับที่ได้รับการยินยอมจากผู้พิมพ์ผลงาน

Journal of Applied Microbiology

© The Society for Applied Microbiology



Edited By: A. Gilmour

Impact Factor: 2.479

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 60/163 (Biotechnology & Applied Microbiology), 63/119 (Microbiology)

Online ISSN: 1365-2672

Associated Title(s): [Letters in Applied Microbiology \(doi/10.1111/\(ISSN\)1472-765X/home\)](http://dx.doi.org/10.1111/(ISSN)1472-765X/home)

Permissions

***PLEASE NOTE: If the links highlighted here do not take you to those web sites, please copy and paste address in your browser.**

Permission to reproduce Wiley journal Content:

Requests to reproduce material from John Wiley & Sons publications are being handled through the RightsLink® automated permissions service.

Simply follow the steps below to obtain permission via the Rightslink® system:

- Locate the article you wish to reproduce on Wiley Online Library (<http://onlinelibrary.wiley.com> (<http://onlinelibrary.wiley.com>))
- Click on the 'Request Permissions' link, under the 'ARTICLE TOOLS' menu on the abstract page (also available from Table of Contents or Search Results)
- Follow the online instructions and select your requirements from the drop down options and click on 'quick price' to get a quote
- Create a RightsLink® account to complete your transaction (and pay, where applicable)
- Read and accept our Terms & Conditions and download your license
- For any technical queries please contact customercare@copyright.com (<mailto:customercare@copyright.com>)
- For further information and to view a Rightslink® demo please visit www.wiley.com (<http://www.wiley.com>) and select Rights & Permissions.

AUTHORS - If you wish to reuse your own article (or an amended version of it) in a new publication of which you are the author, editor or co-editor, prior permission is not required (with the usual acknowledgements). However, a formal grant of license can be downloaded free of charge from RightsLink by selecting "Author of this Wiley article" as your requestor type.

Individual academic authors who are wishing to reuse up to 3 figures or up to 400 words from this journal to republish in a new journal article or book chapter they are writing should select **University/Academic** as the requestor type. They will then be able to download a free permission license.

Either of the above who are publishing a new journal article or book chapter with an **STM Signatory Publisher** may also select that requestor type and the STM Signatory publisher's name from the resulting drop-down list in RightsLink. This list is regularly updated. The requestor is required to complete the republication details, including the publisher name, during the request process. They will then be able to download a free permissions license.

Photocopying

Teaching institutions with a current paid subscription to the journal may make multiple copies for teaching purposes without charge, provided such copies are not resold or copied. In all other cases, permission should be obtained from a reproduction rights organisation (see below) or directly from RightsLink®.

Copyright Licensing Agency

Institutions based in the UK with a valid photocopying and/or digital license with the Copyright Licensing Agency may copy excerpts from Wiley books and journals under the terms of their license. For further information go to [CLA \(http://www.cla.co.uk\)](http://www.cla.co.uk).

Copyright Clearance Center

Institutions based in the US with a valid photocopying and/or digital license with the Copyright Clearance Center may copy excerpts from Wiley books and journals under the terms of their license, please go to [CCC \(http://www.copyright.com\)](http://www.copyright.com).

Other Territories: Please contact your local reproduction rights organisation.

For further information please visit [www.wiley.com \(http://www.wiley.com\)](http://www.wiley.com) and select Rights & Permissions.

If you have any questions about the permitted uses of a specific article, please contact us.

Permissions Department

John Wiley & Sons Ltd.
The Atrium,
Southern Gate,
Chichester
West Sussex, PO19 8SQ
UK
Email: [Permissions@wiley.com \(mailto:Permissions@wiley.com\)](mailto:Permissions@wiley.com)
Fax: 44 (0) 1243 770620

or

Permissions Department

John Wiley & Sons Inc.
111 River Street MS 4-02
Hoboken, NJ 07030-5774
USA
Email: [Permissions@wiley.com \(mailto:Permissions@wiley.com\)](mailto:Permissions@wiley.com)
Fax: (201) 748-6008

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

Hemolysin หรือ สารทำลายเม็ดเลือดแดง เป็นสารพิษนอกเซลล์ซึ่งมีหลายชนิด มีรายงานว่า hemolysin เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* spp. และยีนควบคุมการสร้าง hemolysin มีเฉพาะในเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคนั้น (Kim *et al.*, 1997; Zhang and Austin, 2005; Mahoney *et al.*, 2010) hemolysin ของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่ออกฤทธิ์รุนแรง และพบมากที่สุด คือ hemolysin ของ *Vibrio cholerae* (El Tor hemolysin หรือ HlyA) ควบคุมการสร้างโดยยีน *hlyA* ซึ่งพบในเชื้อเกือบทุกสายพันธุ์ไม่ขึ้นกับ biotypes และ serogroups (Kurazono *et al.*, 1995) HlyA มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของ *V. cholerae* (Ichinose *et al.*, 1987) การปรากฏของยีน *hlyA* ใน *V. cholerae* ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังมีรายงานการตรวจพบยีนนี้ในแบคทีเรียกลุ่ม non-*cholerae Vibrio* อื่น ๆ และพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรค ก่อนหน้านี้ได้มีการตรวจพบยีนสร้าง hemolysin ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* (เรียกว่า ยีน *hhl*) ใน *V. harveyi* บางสายพันธุ์ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของการปรากฏของยีน *hhl* กับการก่อโรคในกุ้ง (Rattanama *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามปกติมักไม่พบการปรากฏของยีน *hhl* ใน *V. harveyi* ดังนั้นบทบาทของยีน *hhl* กับการก่อโรคของเชื้อ จึงยังเป็นที่น่าสงสัย ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ควบคุมการสลายเม็ดเลือดแดง และความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อสายพันธุ์ที่มียีนดังกล่าว นอกจากนี้การถ่ายโอนยีน *hlyA* จาก *V. cholerae* ไปยัง *Vibrio* ต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมอาจส่งผลให้เชื้อที่ได้รับยีนมีความสามารถในการปรับตัวเพื่ออยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายขึ้น หรืออาจเพิ่มความสามารถในการก่อโรคในโฮสต์

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* กับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* รวมทั้งศึกษาปัจจัยต่าง ๆ (ความเค็ม และ pH) ต่อการเจริญและการสลายเม็ดเลือดแดงของ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่มียีน *hhl* เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มียีนดังกล่าว นอกจากนี้ยังศึกษาความชุก และความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อกลุ่ม non-*cholerae Vibrio* ที่ตรวจพบยีน *hlyA* ซึ่งแยกจากอาหารทะเล

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้จะทำให้ทราบบทบาทของยีน *hhl* ใน *V. harveyi* และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมสถานะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไม่ให้เป็นการส่งเสริมความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. harveyi* และการศึกษาเชื้อจากอาหารทะเลยังทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนเชื้อกลุ่มดังกล่าว

ทฤษฎีและหลักการ

1. ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

แบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae ประกอบด้วย 8 สกุล คือ *Aliivibrio*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* และ *Vibrio* โดยเชื้อสกุล *Vibrio* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ (Sawabe *et al.*, 2013) *Vibrio* เป็นแบคทีเรียก้ำมัลบ รูปร่างแท่งตรง หรือ แท่งโค้ง ขนาดประมาณ $0.5-0.8 \times 1.4-2.4$ ไมโครเมตร (μm) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาหนึ่งเส้น หรือมากกว่า ที่ขั้วเซลล์ สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้ เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar (TCBS) สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) โซเดียมไอออนสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Vibrio* ได้ทุก สปีชีส์ (Zhang and Austin, 2005) โดยเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1-3% สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแต่ไม่ให้เกิดแก๊ส สามารถย่อยไนเตรทเป็นไนไตรท์ โดยทั่วไปสามารถสร้างเอนไซม์ protease, amylase, lipase, lectinase, DNAase และ chitinase ได้ เมื่อแยก *Vibrio* จากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันจะพบความหลากหลายของสายพันธุ์ (Nyholm and Nishiguchi, 2008) เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง, ความเค็ม, pH, อุณหภูมิ, สารอาหาร, ความดัน และการตกตะกอน เป็นปัจจัยในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอดได้ (Rozen and Belkin, 2001; Nyholm and Nishiguchi, 2008) แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae (Lee, 1990)

2. ถิ่นที่อยู่และความสำคัญของแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

Vibrio มีแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติทั้งในน้ำทะเล น้ำกร่อย น้ำจืด พบเชื้อได้ตั้งแต่บริเวณผิวน้ำจนถึงใต้ทะเลลึก มักแยกได้จากบริเวณเขตร้อน (อุณหภูมิเฉลี่ยสูงกว่า 18°C) (Thompson *et al.*, 2006) มีทั้งที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในน้ำ ในตะกอนดิน และสัตว์ทะเล โดยพบเป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณผิวนอกและลำไส้ของสัตว์ทะเล (Fouz *et al.*, 1990) *Vibrio* จำนวน 40% เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นบริเวณชายฝั่ง โดยตรวจพบประมาณ 10^2-10^5 CFU/ml (Chan *et al.*, 1986) อย่างไรก็ตามความหนาแน่นและอัตราส่วนที่พบเชื้อขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บตัวอย่าง ลักษณะภูมิศาสตร์ และฤดูกาล โดยพบว่าชนิดของ *Vibrio* spp. บริเวณทะเลและบริเวณชายฝั่งมีความคล้ายคลึงกัน (Urakawa *et al.*, 1999) แต่ความแตกต่างของสปีชีส์ในทะเลขึ้นกับความลึกของระดับน้ำทะเล (Ruby *et al.*, 1980) *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. cincinnatiensis* และ *V. fluvialis* เจริญได้ดีในน้ำกร่อย และพบบ่อยบริเวณปากแม่น้ำ (Farmer III and Hickman-Brenner, 2006) ส่วน *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. splendidus* และ *Photobacterium* spp. สามารถพบได้บริเวณใต้ทะเลลึกมากกว่า 1,000 เมตร (Ruby *et al.*, 1980; Urakawa *et al.*, 1999) *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่มีปฏิสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศทางน้ำ ได้แก่ การหมุนเวียนสารอาหาร, ปฏิสัมพันธ์กับปะการัง, โปรโตซัว, แพลงก์ตอนสัตว์, แพลงก์ตอนพืช, หอย, หมึกและ ปลา (Thompson *et al.*, 2006) พบว่า *V. alginolyticus* เป็นโปรไบโอติกในกุ้งเพาะเลี้ยง (Vandenbergh *et al.*, 2003) อีกทั้งยังมีบทบาทในการหมุนเวียนสารอาหาร

ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำโดยใช้สารอินทรีย์ที่ละลายในน้ำ ซึ่งสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ไม่สามารถใช้ได้ (Sherr and Sherr, 2000) *Vibrio* สามารถผลิตกรดไขมันจำเป็นชนิดไม่อิ่มตัวให้แก่ห่วงโซ่อาหารในทะเล ซึ่งสิ่งมีชีวิตในทะเลหลายชนิดไม่สามารถผลิตได้ (Cottrell and Kirchman, 2000) และสามารถย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเปลือกสัตว์ทะเล (ไคตินเป็นสารพหุ homopolymer ของ N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีมากที่สุดในมหาสมุทร) ทำให้เกิดการหมุนเวียนคาร์บอนและไนโตรเจนในทะเล (Cottrell and Kirchman, 2000; Riemann and Azam, 2002)

3. การก่อโรคในสัตว์ของแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

แบคทีเรียสกุล *Vibrio* มากกว่า 20 สปีชีส์ สามารถก่อโรคในสัตว์ได้ (Thompson *et al.*, 2004) โดยพบก่อโรคได้ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *P. damsela*, *V. ordalii* และ *V. vulnificus* เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคได้บ่อยในปลาและกุ้ง (Austin and Allen, 1982; Lightner, 1993) มีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* สามารถทำให้เกิดโรคต่อระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้ (Tran, 2013; Kongrueng *et al.*, 2014) *V. harveyi*, *V. fisheri* *V. splendidus* สามารถสร้างเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ aldehyde และ flavin mononucleotide (FMNH₂) ปลดปล่อยพลังงานทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลือง (Ziegler and Baldwin, 1981) แบคทีเรียเรืองแสงบางชนิดได้แก่ *V. harveyi*, *V. splendidus* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรืองแสงหรือโรคเพชรพลอย (luminous หรือ diamond disease) ในกุ้ง โดยกุ้งที่มีการติดเชื้อเรืองแสง จะมีการเคลื่อนที่ช้าลง กล้ามเนื้อบริเวณช่องท้องจะมีสีขาวขุ่น อ่อนแอ กินอาหารน้อยลง จมลงสู่ก้นบ่อ และตายภายใน 1-2 วัน ภายหลังจากพบอาการ อัตราการตายจะเพิ่มสูงขึ้นจาก 20-100% และมีแสงคล้ายหิ่งห้อยลอยตัวขึ้นลงตามการเคลื่อนไหวของกุ้ง (Ruangpan and Kitao, 1991) *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, *P. damsela* และ *V. salmonicida* พบก่อโรคส่วนใหญ่ในปลาน้ำเค็ม โดยปลาจะมีอาการคล้ายกับการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งอาการเด่นชัดที่พบ ได้แก่ การติดเชื้อในกระแสโลหิตซึ่งก่อให้เกิดจุดหรือปื้นเลือดออกที่อวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะครีบ หาง และอาจพบแผลหลุมที่ผิวหนัง ม้ามขยายใหญ่และมีสีแดงสด อาการทางพยาธิวิทยาพบจุดเนื้อตายที่ตับ ไต ม้าม และบางครั้งอาจพบที่เยื่อเมือกของทางเดินอาหารด้วย

www.micro.vet.chula.ac.th/index.php/doc/doc_download/57 (วันที่สืบค้น 7 พฤษภาคม 2557)

4. สารย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysin) ของแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

การก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* จำเป็นต้องอาศัยปัจจัยก่อโรคหลายชนิด พบว่า hemolysin เป็นปัจจัยก่อโรคสำคัญที่ทำให้เชื้อมีความสามารถในการทำลายเม็ดเลือด (hemolytic activity) hemolysin จัดเป็นสารพิษที่แบคทีเรียหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ เช่น ฮีโมโกลบิน, ทรานสเฟอร์ริน และแลคโตเฟอร์ริน ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถนำธาตุเหล็กเหล่านั้นไปใช้ได้ เป้าหมายของ hemolysin ไม่ได้จำกัดอยู่เพียงแค่เซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น แต่ยักรวมถึงเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันด้วย ในบางครั้ง

จึงมีการเรียก hemolysin ว่า cytolysin การทำลายเซลล์ดังกล่าวเป็นการเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ (Zhang and Austin, 2005) การแสดงออกของ hemolysin ของ *Vibrio* จะถูกควบคุมโดยปริมาณเหล็กของโฮสต์ (Stoebner and Payne, 1988; Zhang and Austin, 2005) สามารถแบ่งชนิดของ hemolysin หลัก ๆ ที่ผลิตโดย *Vibrio* ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

4.1 Thermostable direct hemolysin (TDH)

TDH พบใน *V. parahaemolyticus* (Vp-TDH) มีคุณสมบัติทนความร้อน (heat-stable) สามารถทนอุณหภูมิ 100°C ได้นาน 10 นาที (Takeda, 1982; Iida and Honda, 1997) ควบคุมการสร้างโดยยีน *tdh* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ (Nishibuchi *et al.*, 1990) Vp-TDH สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เกิดรูที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 นาโนเมตร กระตุ้นการผ่านเข้าออกของ cation และ กระตุ้น K⁺ channel (Lang *et al.*, 2004) มีรายงานการตรวจพบยีนที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ ยีน *tdh* ของ *V. parahaemolyticus* ใน *V. cholerae* non-O1, *V. mimicus* และ *V. hollisae* (Nishibuchi *et al.*, 1990; Baba *et al.*, 1991; Yamasaki *et al.*, 1991; Shinoda *et al.*, 2004)

4.2 El Tor hemolysin (HlyA)

HlyA หรือ *V. cholerae* cytolysin (Olson and Gouaux, 2003) ควบคุมการสร้างโดยยีน *hlyA* พบใน *V. cholerae* El Tor O1 และ non-O1 (Ichinose *et al.*, 1987) สามารถสลายเม็ดเลือดแดง และเซลล์อื่น ๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีรายงานว่า *Vibrio* ที่ก่อโรค ในคน ได้แก่ *V. fluvialis*, *V. mimicus* และ *V. vulnificus* สามารถผลิต hemolysin ชนิด HlyA ได้ โดยถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *vfh*, *vmh* และ *vvh* ตามลำดับ (Yamamoto *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002; Shinoda *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบยีนที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ ยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* ใน *Vibrio* ที่ก่อโรคในสัตว์ทะเล เช่น *V. anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. harveyi*, *V. campbellii* และ *V. coralliilyticus* (de O Santos *et al.*, 2011; Hasegawa *et al.*, 2008; Hirono *et al.*, 1996; Rattanama *et al.*, 2009; Ruwandeepika *et al.*, 2010) มีรายงานการใช้เทคนิค Southern blot hybridization ในการตรวจสอบการกระจายของยีน *hlyA* ใน *Vibrio* ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อม จำนวน 57 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลทที่ตรวจพบยีน *hlyA* ในขณะที่ตรวจพบยีน thermolabile hemolysin (*tth*) ในเชื้อ 49 ไอโซเลท (Wong *et al.*, 2007) จึงแสดงให้เห็นว่ายีน *hlyA* ไม่มีการพบทั่วไปใน *Vibrio* ที่ไม่ก่อโรค

4.3 Thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH)

TRH ควบคุมการสร้างโดยยีน *trh* (*trh1* และ *trh2*) มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อนที่ 60°C นาน 10 นาที ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดแตก และทำให้สัตว์ทดลองตาย พบว่าการปรากฏของยีน *trh* มีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ urease การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ TRH พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ TDH ถึง 67% (Zhang and Austin, 2005)

4.4 Thermolabile hemolysin (TLH)

TLH ควบคุมการสร้างโดยยีน *tlh* มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อนที่ 60°C นาน 10 นาที มีคุณสมบัติเป็น phospholipase A2/lysophospholipase แต่บทบาทในการก่อโรคยังไม่ทราบแน่ชัด (Shinoda *et al.*, 1991; Zhang and Austin, 2005) *tlh* gene พบใน *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลท และใน *Vibrio* อื่นหลายสปีชีส์ (Zhang and Austin, 2005) ยีนควบคุมการสร้าง TLH hemolysin ของ *V. harveyi* (*vhh*) พบได้ทั้งในเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคและไม่ก่อโรค (Zhang and Austin, 2000; Conejero and Hedreyda, 2004; Rattanama *et al.*, 2009) และการปรากฏของยีนดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับการก่อโรคในกุ้ง (Rattanama *et al.*, 2009)

5. การวินิจฉัยแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* โดยทั่วไป ทำโดยการนำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment) ใน alkaline peptone water (APW) ที่มีเกลือ 1-2% ก่อนเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีสารยับยั้งเชื้ออื่น (selective media) เช่น Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS) agar ซึ่งอาศัยคุณสมบัติความทนต่อเกลือน้ำดี และ เจริญได้ใน pH สูงของ อาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CHROMagar *Vibrio* (CV) ซึ่งเป็น chromogenic agar ที่มีส่วนประกอบของ substrate สำหรับเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสปีชีส์จากสีโคโลนีได้ดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (Hara-Kudo *et al.*, 2001) เมื่อแยกเชื้อบนอาหารแข็งแล้วจึงนำเชื้อไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical test) และปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองวิทยา (serological test) ต่อไป เชื้อในสกุล *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถเจริญบน nutrient agar ที่มีเกลือ 0.5-1% ที่อุณหภูมิ 37°C ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะกลมมน ขอบเรียบ สีครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 2-5 มิลลิเมตร แต่ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โคโลนีมีลักษณะแผ่

6. *Vibrio harveyi* และการก่อโรคของ *Vibrio harveyi*

V. harveyi มีชื่อเดิมว่า *Achromobacter harveyi* (Johnson and Shunk, 1936) ต่อมาเปลี่ยนเป็น *Lucibacterium harveyi*, *Beneckea harveyi* และ *V. harveyi* (Farmer *et al.*, 2005) นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *V. harveyi* และ *V. carchariae* ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายในปลาฉลาม พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน (Gauger and Gomez-Chiarri, 2002) การเจริญของ *V. harveyi* ในทะเลถูกกระตุ้นโดยความเค็ม 10-60 ppt อุณหภูมิ 25-32 °C และ pH 5-9 (Kiriratnikom *et al.*, 2000) สามารถก่อโรคได้ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Pavia *et al.*, 1989) *V. harveyi* เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรครุนแรงที่พบในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการก่อโรคในกุ้งเพาะเลี้ยง (Prayitno and Latchford, 1995; Zhou *et al.*, 2012) เชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเรืองแสง (luminous vibriosis) ในกุ้งระยะวัยรุ่นที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบภูมิภาคเอเชีย เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย และ ฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Teo

et al., 2000; Chari and Dubey, 2006) *V. harveyi* มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในสัตว์ทะเล โดยมีผลต่อการตายของปลาเก๋าเพาะเลี้ยง (Saeed, 1995; Yingxue *et al.*, 2006) ทำให้เกิดโรคตาในปลานวลจันทร์ทะเล (*Chanos chanos*) (Austin and Zhang, 2006) และสามารถก่อให้เกิด แผลเรื้อรังในปลาฉลาม (Bertone *et al.*, 1996) ในปลาลิ้นเสือ (*Paralichthys dentatus*) พบการติดเชื้อบริเวณลำไส้และลักษณะสีแดงรอบทวาร ท้องเต็มไปด้วยของเหลวสีขาวขุ่น ลำไส้เกิดการอักเสบและมีเนื้อตาย (Soffientino *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง *V. harveyi* มักทำให้เกิดโรคในตัวอ่อนของกุ้งเพาะเลี้ยง ทั้งในแถบอเมริกาใต้และทวีปเอเชีย (Prayitno and Latchford, 1995) นอกจากนี้ทำให้เกิดโรคเรืองแสง ยังทำให้เกิดโรค *Bolitas negricans* หรือ เกิดตุ่มตามเนื้อเยื่อระบบทางเดินอาหาร (Robertson and Austin, 1998) *V. harveyi* ยังเป็นสาเหตุของการตายในหอยเป่าอื้อเพาะเลี้ยง ลักษณะของโรค พบจุดสีขาวบริเวณเท้าทำให้หอยเป่าอื้อไม่สามารถเกาะติดบริเวณพื้นผิวได้ และตายจมน้ำก้นบ่อ (Nishimori *et al.*, 1998; Austin and Zhang, 2006)

กลไกการก่อโรคของ *V. harveyi* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เคยมีรายงานว่า extracellular products (ECP) เป็นปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของ *V. harveyi* (Saeed, 1995) สามารถก่อให้เกิดความรุนแรงซึ่งเป็นสาเหตุของการตายทั้งในกุ้งกุลาดำและหนูทดลอง (Montero and Austin, 1999) ECP ของ *V. harveyi* เป็นพิษต่อปลาเก๋า การศึกษากลไกความรุนแรงของ ECP ของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคพบว่า protease, phospholipase, hemolysins และสารพิษนอกเซลล์อื่น ๆ อาจจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ (Liuxy *et al.*, 1996) การศึกษาในอาร์ทีเมีย (*Artemia franciscana* nauplii) พบความสัมพันธ์ระหว่างการตายของอาร์ทีเมียกับการผลิต protease, phospholipase หรือ siderophores แต่ไม่พบว่าเกี่ยวข้องกับการผลิต lipase, gelatinase หรือ hemolytic activity (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003) *V. harveyi* ที่แยกได้จากกุ้งเป็นโรคสามารถผลิต extracellular cysteine protease ซึ่งอาจเป็นปัจจัยก่อโรคอย่างหนึ่งของเชื้อ (Fukasawa *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1997)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* กับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae*
2. เพื่อศึกษาผลของความเค็ม และ pH ต่อการเจริญ, การสลายเม็ดเลือดแดง และความรุนแรงในการก่อโรคของ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่มียีน *hhl* เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มียีนดังกล่าว
3. เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อกลุ่ม non-*cholerae* *Vibrio* ที่มียีน *hlyA* ในอาหารทะเล และศึกษาความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง และความสามารถในการก่อโรคของ non-*cholerae* *Vibrio* ที่มียีน *hlyA*

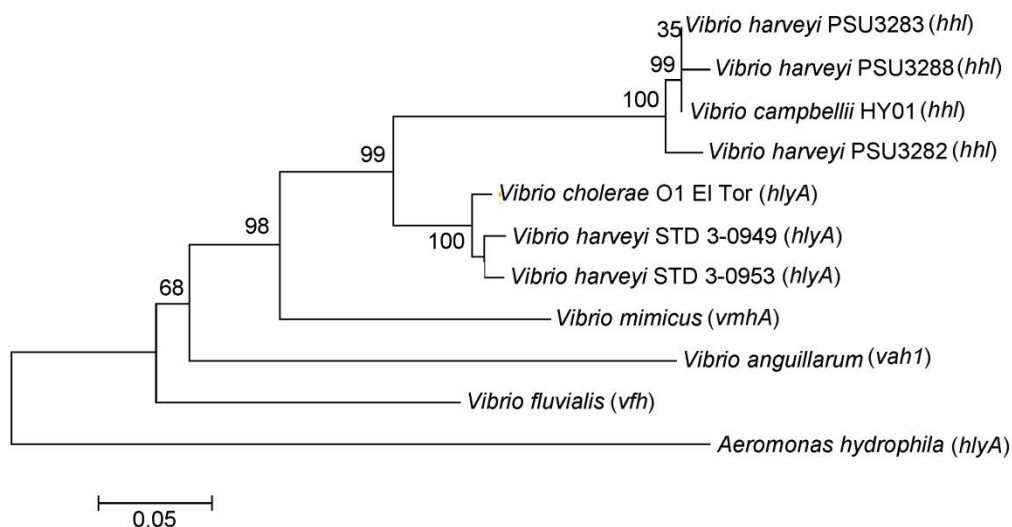
ผลการทดลอง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *hhl*

การเพิ่มปริมาณยีน *hhl* ของ *V. harveyi* โดยวิธี PCR ได้ชิ้นส่วนยีนที่มีขนาด 1,090 bp เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันในฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (blastn) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hhl* ของ *V. campbelli* HY01 มากกว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* และ *V. harveyi* STD3-0949 และ STD3-0953 นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *hhl* มีความคล้ายคลึงกับยีน *vmh* ของ *V. mimicus*, *vfh* ของ *V. fluvialis* และ *vah1* ของ *V. anguillarum* ค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 1) การศึกษาความสัมพันธ์ ทางวิวัฒนาการพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* และ *V. campbellii* HY01 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรอ์เซ็นต์ความเหมือน (identity) ของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* PSU3282, PSU3283 และ PSU3288 กับยีน *hlyA* homologues ของแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และ non-*Vibrio*

Bacterial species	Hemolysin gene	Accession number	% identity (<i>E</i> value) to		
			PSU3282	PSU3283	PSU3288
<i>V. harveyi</i>					
PSU3282	<i>hhl</i>		100 (0.0)	98 (0.0)	96 (0.0)
PSU3283	<i>hhl</i>		98 (0.0)	100 (0.0)	99 (0.0)
PSU3288	<i>hhl</i>		96 (0.0)	99 (0.0)	100 (0.0)
STD3-0949	<i>hlyA</i>	GU230681	85 (0.0)	85 (0.0)	84 (0.0)
STD3-0953	<i>hlyA</i>	GU230682	84 (0.0)	85 (0.0)	84 (0.0)
<i>V. campbellii</i> HY01	<i>hhl</i>		98 (0.0)	100 (0.0)	99 (0.0)
<i>V. cholerae</i> N16961	<i>hlyA</i>	AE003853	84 (0.0)	85 (0.0)	84 (0.0)
<i>V. mimicus</i>	<i>vmh</i>	GU137289	75 (4e-92)	74 (6e-133)	73 (1e-122)
<i>V. fluvialis</i>	<i>vfh</i>	AF348455	70 (2e-89)	71 (1e-93)	70 (3e-83)
<i>V. anguillarum</i>	<i>vah1</i>	LK021129	68 (3e-57)	63 (4e-10)	63 (4e-10)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>hlyA</i>	U81555	65 (1e-04)	63 (3e-05)	63 (3e-05)



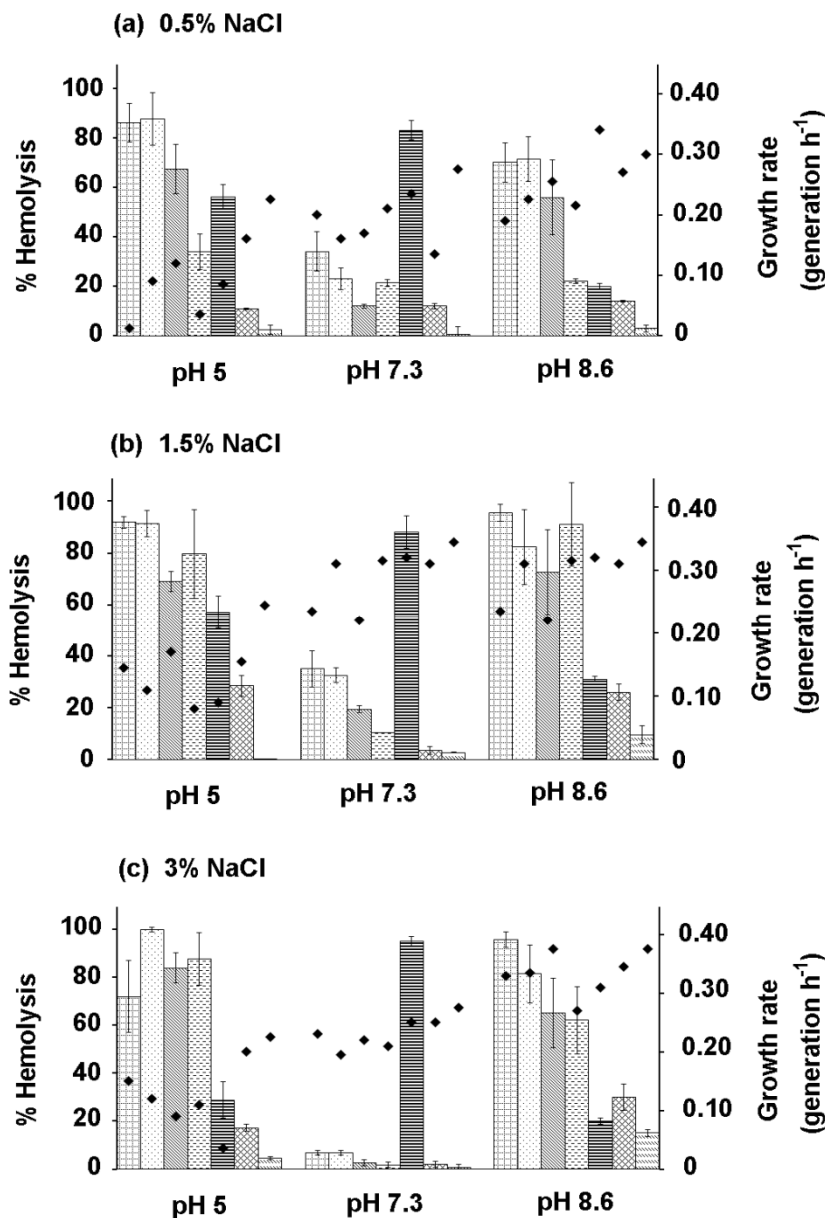
รูปที่ 1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากฐานข้อมูล NCBI แผนภาพแสดงความสัมพันธ์สร้างโดยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA ตัวเลขแสดงบนกิ่ง (% bootstrap) มาจากการคำนวณ 1,000 ซ้ำ

2. ปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของ *V. harveyi*

การศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ความเค็มและ pH ต่างๆ พบว่า *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มี 3% NaCl, pH 8.6 และอัตราการเจริญจะลดลงเมื่อลดความเข้มข้นของ NaCl และ pH (**รูปที่ 2**)

3. ปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่อการสลายเม็ดเลือดแดงของ *V. haerveyi*

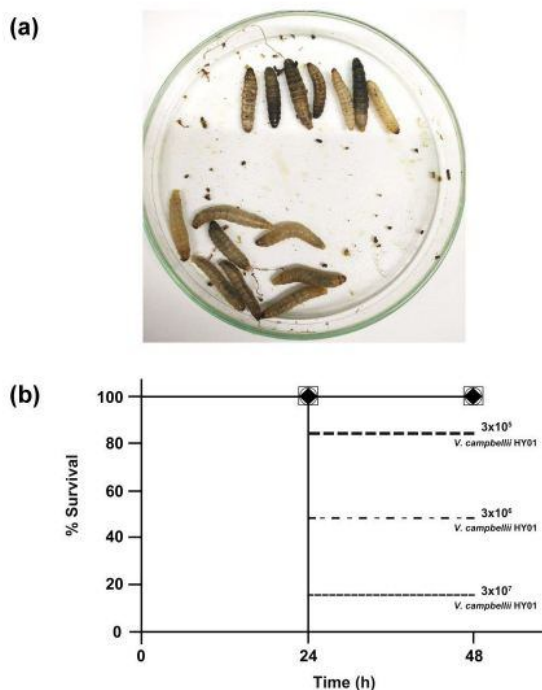
hhl⁺ *V. harveyi* และ *V. campbellii* HY01 ที่เจริญที่ pH 7.3 สภาวะที่มี 3% NaCl สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้น้อยกว่าเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 0.5 และ 1.5% NaCl ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ NaCl ที่ทดสอบไม่มีผลต่อความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *V. cholerae* เมื่อศึกษาผลของ pH พบว่า *hhl*⁺ *V. harveyi* ที่เจริญที่ pH 5 และ pH 8.6 สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้สูงที่สุด ตรงข้ามกับ *V. cholerae* พบว่าเชื้อที่เจริญที่ pH 7.3 สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้สูงกว่าเชื้อที่เจริญที่ pH 5 และ pH 8.6 ($p < 0.05$) ทั้งนี้ *hhl*⁺ *V. harveyi* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่า *hhl*⁻ *V. harveyi* ($p < 0.05$) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl*⁺ *V. harveyi* กับ *V. campbellii* HY01 ในเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 0.5% NaCl (**รูปที่ 2**)



รูปที่ 2 ผลของความเค็ม และ pH ต่อการเจริญ และความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *Vibrio* รูป \blacklozenge แสดงค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญ และแท่งแสดง % hemolysis ของ *V. harveyi* PSU3282 (▣), PSU3283 (▤), PSU3288 (▥); *V. campbellii* HY01 (▦) มียีน *hhl*; *V. cholerae* (▧); *V. harveyi* PSU3303 (▨), PSU3280 (▩) ไม่มียีน *hhl* เชื้อทดสอบเจริญที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ (a) TSB-0.5% NaCl ที่ pH 5, 7.3 และ 8.6 (b) TSB-1.5% NaCl ที่ pH 5, 7.3 และ 8.6 (c) TSB-3% NaCl ที่ pH 5, 7.3 และ 8.6 ทดสอบทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS โดยวิธี One way ANOVA

4. ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในสัตว์ทดลอง

การศึกษาความสามารถในการก่อโรคในกุ้งของ *V. campbellii* HY01 (*hhl*⁺) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรคและ *V. harveyi* PSU3283 (*hhl*⁺) และ *V. harveyi* PSU3280 (*hhl*⁻) ที่มีความสามารถในการก่อโรคต่ำ โดยใช้หนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) เป็นโมเดล พบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อสูง (3×10^7 CFU/larval) สามารถสังเกตเห็นการสร้างเม็ดสี (melanization) ของหนอนผีเสื้อทั้งหมดที่ทำการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามมีหนอนผีเสื้อบางตัวมีการสร้างเม็ดสีและยังคงรอดชีวิตอยู่ (รูปที่ 3a) โดยพบอัตราการตายของหนอนผีเสื้อที่ติดเชื้อ *V. campbellii* HY01 (*hhl*⁺) สูงกว่าหนอนผีเสื้อที่ติดเชื้อ *V. harveyi* PSU3283 (*hhl*⁺) และ *V. harveyi* PSU3280 (*hhl*⁻) อย่างมีนัยสำคัญส่วนชุดควบคุม (PBS) ไม่พบการตายของหนอนผีเสื้อ (รูปที่ 3b) และจากการประเมินผลของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ (TSB+3% NaCl, pH 5) ต่อความสามารถในการก่อโรคในสัตว์ทดลอง พบว่า *V. campbellii* HY01 (*hhl*⁺) ที่เลี้ยงใน TSB+3% NaCl, pH 5 หรือ TSB+1.5% NaCl, pH 7.3 ทำให้เกิดการตายของหนอนผีเสื้อ 50% (LD₅₀) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามหนอนผีเสื้อที่ฉีดด้วย *V. harveyi* PSU3283 (*hhl*⁺) และ *V. harveyi* PSU3280 (*hhl*⁻) ไม่มีมีความแตกต่างของการรอดชีวิตใน 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3 (a) การสร้างเม็ดสีของตัวอ่อนหนอนผีเสื้อ *Galleria mellonella* ทั้งที่มีชีวิตรอดและไม่มีชีวิตรอด ภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ *Vibrio campbellii* HY01 ความเข้มข้น 3×10^7 CFU ซึ่งเลี้ยงในอาหาร TSB+1.5% NaCl, pH 7.3 (b) กราฟ Kaplan-Meier แสดงการรอดชีวิตภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากการฉีดเชื้อ *V. campbellii* HY01 ความเข้มข้น 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 CFU และ *V. harveyi* PSU3283 (O) หรือ PSU3280 (□); PBS (◆) เป็นชุดควบคุม

5. การแยกและจำแนก non-*cholerae* *Vibrio* จากตัวอย่างอาหารทะเล

จำนวนอาหารทะเลที่ใช้ในการแยกเชื้อโดยใช้อาหารแข็ง TCBS รวมทั้งหมด 75 ตัวอย่าง ได้จากตลาดสดในจังหวัดสงขลา แบ่งเป็น กุ้ง 45 ตัวอย่าง, หมึก 18 ตัวอย่าง, หอย 8 ตัวอย่าง, ปู 2 ตัวอย่าง และปลา 2 ตัวอย่าง

การเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันที่คาดว่าจะ เป็นเชื้อกลุ่ม *Vibrio* คือเชื้อที่ให้ผล oxidase เป็นบวก ทั้งกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ (โคโลนีสีเหลือง) และไม่หมักน้ำตาลซูโครส (โคโลนีสีเขียว) เบื้องต้นสามารถคัดเลือกเชื้อได้จำนวน 335 ไอโซเลท แบ่งเป็น ไอโซเลทที่แยกได้จากกุ้ง 219 ไอโซเลท, หมึก 64 ไอโซเลท, หอย 36 ไอโซเลท, ปู 9 ไอโซเลท และปลา 7 ไอโซเลท (ตารางที่ 2)

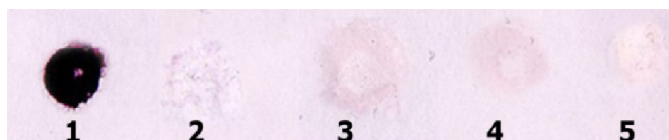
เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรีย non-*Vibrio* บางชนิดสามารถเจริญได้บน TCBS agar เช่น *Aeromonas* spp. และ *Photobacterium* spp. เป็นต้น จึงได้ยืนยันเชื้อทั้ง 335 ไอโซเลท ว่าเป็นเชื้อกลุ่ม *Vibrio* โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีน 16S rRNA ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย *Vibrio* เป็นยีนเป้าหมาย โดยพบว่ามี 268 ไอโซเลทที่ให้ผลบวก (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ ไอโซเลทที่ให้ผลลบอาจเป็นไปได้ว่าไม่ใช่ *Vibrio* หรืออาจเป็น *Vibrio* ที่มีความผันแปรของลำดับเบสของยีน 16S rRNA บริเวณที่ primers เกาะ และเนื่องจากการศึกษานี้ต้องการตรวจหายีน *hlyA* ของ *V. cholerae* ใน non-*cholerae* *Vibrio* จึงทำการคัดเลือกเฉพาะ non-*cholerae* *Vibrio* ไปศึกษาต่อ ซึ่งหมายถึงไอโซเลทที่ให้โคโลนีสีเขียวทั้งหมด และไอโซเลทที่ให้โคโลนีสีเหลืองแต่ให้ผลลบกับการตรวจยีน *ompW* ซึ่งเป็นยีนจำเพาะของ *V. cholerae* จากผลการจำแนกเชื้อพบแบคทีเรียกลุ่ม non-*cholerae* *Vibrio* ทั้งหมด 231 ไอโซเลท (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวน non-*cholerae* *Vibrio* ที่แยกได้จากอาหารทะเลประเภทต่าง ๆ

ชนิดอาหารทะเล	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทที่แยกจาก TCBS	<i>Vibrio</i> spp. (16S rDNA PCR)	non- <i>cholerae</i> <i>Vibrio</i>	
				Sucrose fermenter (<i>ompW</i> ⁻)	Non-sucrose fermenter
กุ้ง	45	219	188	121	34
หมึก	18	64	43	34	7
หอย	8	36	26	23	3
ปู	2	9	9	4	3
ปลา	2	7	2	2	0
รวม	75	335	268	184	47

6. การศึกษาความจำเพาะของ *hlyA* hybridization probe และการตรวจหายีน *hlyA* ใน non-cholerae *Vibrio* โดยวิธี colony blot hybridization

การศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของ *hlyA* probe ที่เตรียมได้ ผู้วิจัยได้ทดสอบความจำเพาะของ *hlyA* probe โดยวิธี colony blot hybridization กับแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. cholerae* O1 DMST 16261 (*hlyA*⁺) จำนวน 1 สายพันธุ์, *V. cholerae* nonO1/nonO139 (*hlyA*⁻) จำนวน 1 สายพันธุ์, *V. parahaemolyticus* ที่มีเฉพาะยีน *tlh* (*tdh*⁻*trh*⁻), *V. parahaemolyticus* ที่มีเฉพาะยีน *tdh* (*tdh*⁺*trh*⁻) และ *V. parahaemolyticus* ที่มีเฉพาะยีน *trh* (*tdh*⁻*trh*⁺) จำนวนอย่างละ 1 สายพันธุ์ จากผลการศึกษาพบว่า *hlyA* probe ที่เตรียมมีความจำเพาะสูง โดยมีเพียง *V. cholerae* O1 DMST 16261 (*hlyA*⁺) เท่านั้นที่ให้ผลบวก (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ความจำเพาะของ *hlyA* probe

- 1: *hlyA*⁺ *Vibrio cholerae* O1 El Tor
- 2: *hlyA*⁻ *V. cholerae* nonO1/nonO139
- 3: *tdh*⁻*trh*⁻ *V. parahaemolyticus*
- 4: *tdh*⁺*trh*⁻ *V. parahaemolyticus*
- 5: *tdh*⁻*trh*⁺ *V. parahaemolyticus*

การตรวจหายีน *hlyA* ในแบคทีเรียกลุ่ม non-cholerae *Vibrio* ที่คัดแยกได้จากอาหารทะเล จำนวน 231 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค colony blot hybridization โดยใช้ probe ที่เตรียมข้างต้น พบว่า non-cholerae *Vibrio* จำนวน 2 ไอโซเลทให้ผลบวก เมื่อนำไปจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA และยืนยัน โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ species-specific primers พบว่า คือ *V. parahaemolyticus* (VP40) และ *V. alginolyticus* (VA55) (รูปที่ 5)



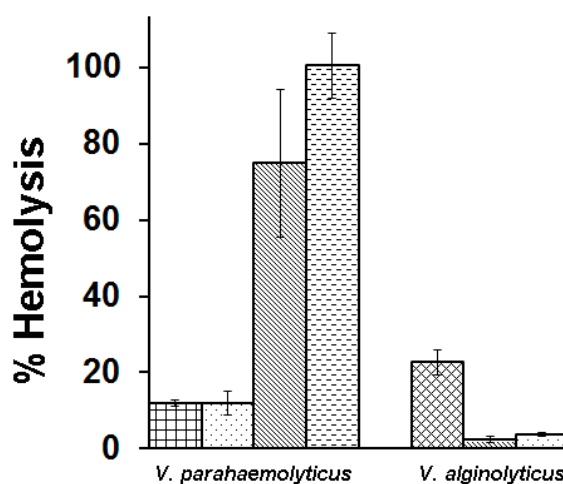
รูปที่ 5 Colony blot hybridization เพื่อตรวจหายีน *hlyA* ใน non-cholerae *Vibrio*

- 1: *hlyA*⁺ *Vibrio cholerae* O1 El Tor
- 2: *hlyA*⁻ *V. cholerae* nonO1/nonO139
- 3: *V. parahaemolyticus* VP40
- 4: *V. alginolyticus* VA55

7. การสลายเม็ดเลือดแดงของ *V. parahaemolyticus* VP40 และ *V. alginolyticus* VA55

V. parahaemolyticus VP40 และ tdh^-trh^- *V. parahaemolyticus* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงไม่แตกต่างกัน คือ 12 และ 11.9% ตามลำดับ ส่วน tdh^+trh^- *V. parahaemolyticus* และ tdh^-trh^+ *V. parahaemolyticus* สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ 74.8 และ 100% ตามลำดับ (รูปที่ 5)

V. alginolyticus VA55 สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ 22.7% ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจน กับ *V. alginolyticus* Val.36 (แยกจากปลาเป็นโรค) และ *V. alginolyticus* W6.2 (แยกจากสิ่งแวดล้อม) ที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เพียง 2.4 และ 3.7% ตามลำดับ (รูปที่ 5)



รูปที่ 6 ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง (% hemolysis) ของ non-cholerae *Vibrio* ที่ตรวจพบยื่น *hlyA* ซึ่งแยกจากอาหารทะเล *V. parahaemolyticus* VP40 (▣), tdh^-trh^- *V. parahaemolyticus* (▤), tdh^+trh^- *V. parahaemolyticus* (▥); tdh^-trh^+ *V. parahaemolyticus* (▦); *V. alginolyticus* VA55 (▧), *V. alginolyticus* Val.36 (▨), *V. alginolyticus* W6.2 (▩) เจริญที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS โดยวิธี One way ANOVA

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

Hemolysin เป็นสารพิษที่เกี่ยวข้องกับการสลายเม็ดเลือดแดงและเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรคสำคัญของเชื้อในสกุล *Vibrio* ซึ่งเชื้อแต่ละสปีชีส์ก็จะมียีนที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน เช่น ยีน *tdh* และ *trh* ของ *V. parahaemolyticus*, ยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* และ ยีน *vhh* ของ *V. harveyi* เป็นต้น (Zhang and Austin, 2005; Rattanama *et al.*, 2009) การศึกษาก่อนหน้าได้ตรวจพบยีนใน *V. campbellii* HY01 (เดิมคือ *V. harveyi* HY01) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* มากถึง 86% และได้ตั้งชื่อยีนนั้นว่ายีน *hhl* การศึกษาในครั้งนั้นได้มีการตรวจหายีน *hhl* ใน *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นๆ ที่แยกจากสัตว์ทะเล (Rattanama *et al.*, 2009) และพบว่า *V. harveyi* จำนวน 3 สายพันธุ์ (PSU3282, PSU3283, PSU3288) มียีน *hhl* การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *hhl* ของ *V. harveyi* กับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* และพบความเหมือนกันมากกว่า 84% ดังแสดงให้เห็นในรูปสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hhl* และ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายเม็ดเลือดแดงอื่นๆ ในกลุ่ม *hlyA* homologues ของเชื้อในสกุล *Vibrio* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *hhl* ที่ตรวจพบใน *V. harveyi* นี้ อาจจะได้รับถ่ายทอดมาจาก *V. cholerae* โดยตรง แบคทีเรียสกุล *Vibrio* อาศัยอยู่ทั่วไปในน้ำทะเล และน้ำกร่อยทั่วโลก ดังนั้นการแลกเปลี่ยนยีนระหว่าง *V. cholerae* และ non-*cholerae* *Vibrio* จึงเป็นไปได้ง่าย ดังที่มีรายงานการปรากฏของยีนที่คล้ายคลึงกับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* ใน non-*cholerae* *Vibrio* หลายสปีชีส์ ได้แก่ *V. anguillarum* (*vah1*), *V. tubiashii* (*vthA* และ *vthB*), *V. campbellii*, *V. coralliilyticus* และ *V. harveyi* (*hhl*) (Hirono *et al.*, 1996; Hasegawa *et al.*, 2008; Rattanama *et al.*, 2009; Ruwandepika *et al.*, 2010; De O Santos *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Vibrio* สปีชีส์ที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *V. fluvialis*, *V. mimicus* และ *V. vulnificus* สามารถผลิตฮีโมไลซินที่คล้ายคลึงกับ *hlyA* ของ *V. cholerae* ได้ (Yamamoto *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1997; Kothary *et al.*, 2003) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของ *V. fluvialis* hemolysin (VFH) และ *V. mimicus* hemolysin (VMH) มีความคล้ายคลึงกับ *HlyA* hemolysin ของ *V. cholerae* ถึง 71% และ 81.6% ตามลำดับ (Yamamoto *et al.*, 1990; Han *et al.*, 2002)

การศึกษานี้พบว่า *hhl*⁺ *V. harveyi* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่า *hhl*⁻ *V. harveyi* มีรายงานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏของยีน *hlyA* ใน non-*cholerae* *Vibrio* กับคุณสมบัติในการก่อโรคของเชื้อ เช่น *V. fluvialis* VFH สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของแกะ, หนู, หมู, กระต่าย, ลูกวัว, แพะ, ม้า และ ห่าน ได้ และ มีความเป็นพิษต่อรังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (Kothary *et al.*, 2003) *V. anguillarum* *Vah1* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโลหิตเป็นพิษในปลา (Austin and Austin, 2007) และพบว่าเมื่อทำให้ยีน *vah1* เกิดการกลายพันธุ์จะทำให้ความรุนแรงในการก่อโรคต่อปลาแซลมอนลดลง (Rock and Nelson, 2006) อย่างไรก็ตามการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า หลังจากฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง แม้ว่า *hhl*⁺ *V. harveyi* PSU3288 จะทำให้กุ้งตาย 100% แต่ *hhl*⁺ *V. harveyi* PSU3282 และ PSU3283 กลับทำให้กุ้งตายเพียง 29% ส่วน *hhl*⁻ *V. harveyi* PSU3280 ทำให้กุ้งตายถึง 58% ที่น่าสนใจคือ *hhl*⁻ *V. harveyi*

PSU3303 กลับทำให้กุ้งตาย 100% ภายใน 12 ชั่วโมง (Rattanama *et al.*, 2009) ดังนั้นอาจมีปัจจัยอื่นๆที่ควบคุมความสามารถในการก่อโรคของเชื้อกลุ่มดังกล่าว งานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยง *V. harveyi* ที่ความเค็มต่ำ ๆ (1-1.5% NaCl) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบความรุนแรงในกุ้งจะเพิ่มความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ อย่างไรก็ตาม รายงานดังกล่าวได้ระบุว่า การเลี้ยงเชื้อที่ pH 5 จะลดความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ (Prayitno and Latchford, 1995) การศึกษาผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อการก่อโรคของ *V. alginolyticus* และ *V. anguillarum* พบว่าอุณหภูมิและความเค็มมีผลต่อการเกาะติดและเพิ่มความสามารถในการก่อโรคในปลาของเชื้อทั้งสอง (Bordas *et al.*, 1996; Ben-Haim *et al.*, 2003; Krishnan *et al.*, 2004)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเค็ม และ pH มีผลต่อการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl⁺ V. harveyi* โดยพบว่าเชื้อที่เจริญที่ pH 7.3 สภาวะที่มี 3% NaCl สลายเม็ดเลือดแดงได้น้อยกว่าเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 0.5 และ 1.5% NaCl และเชื้อที่เจริญ ที่ pH 5 และ pH 8.6 สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้สูงที่สุด มีรายงานว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมส่งผลต่อการเจริญของเชื้อและความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงในเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Geoffroy *et al.*, 1987; Forti and Menestrina, 1989; Schmidt *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามไม่ค่อยพบรายงานในเชื้อกลุ่ม *Vibrio* นอกจาก *V. cholerae* ที่พบว่า pH 7.1-7.4 เหมาะสมต่อการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ (Feeley and Pittman, 1963) จากการศึกษาผลของ pH (pH5-8) ต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงเป็นรู ของ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) HlyA hemolysin พบว่าที่ pH 5 เชื้อทำให้เกิดรูที่เม็ดเลือดแดงได้ต่ำสุด แต่ที่ pH 8 เชื้อทำให้เกิดรูที่เม็ดเลือดแดงได้สูงสุดและ เกลือสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อทำให้เม็ดเลือดแดงเป็นรูที่ pH เป็นกลางได้ โดยพบว่า cation เหนี่ยวนำได้ดีกว่า anion (Schmidt *et al.*, 1996) ซึ่งแตกต่างจาก *L. monocytogenes* listeriolysin O (sulfhydryl-activated toxins) ที่ทำงานได้ดีที่สภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด กล่าวคือ สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ดีที่ pH 5.5 แต่ที่ pH 7 จะไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งแตกต่างจาก sulfhydryl-activated toxins อื่น ๆ (Geoffroy *et al.*, 1987; Schuerch *et al.*, 2005; Bavdek *et al.*, 2012) การศึกษาผลของความเค็ม และ pH ต่อการสลายเม็ดเลือดแดงและการสร้าง cytotoxin ของ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากหอยนางรม พบว่าเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 1-5% NaCl, pH 7.2 สามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าเชื้อที่เจริญ pH อื่น ๆ (Tsai *et al.*, 1997; Baratela *et al.*, 2001) ดังนั้นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ด้านความเค็ม และ pH อาจมีบทบาทและ เพิ่มความรุนแรงต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl⁺ V. harveyi* การแสดงของยีน *hhl* ทำให้เชื้อสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้มากขึ้น ในสภาวะที่แตกต่างออกไปจากสภาวะปกติ ดังนั้นเชื้อกลุ่มนี้อาจกลายเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ทะเลได้ หากสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะดังกล่าว

ผลของสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในสัตว์ทดลอง ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่าหนอนผีเสื้อ (*G. mellonella*) เป็นโมเดลที่เหมาะสมในการศึกษา การก่อโรคของเชื้อ *V. anguillarum* ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (McMillan *et al.*, 2015) ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงใช้หนอนผีเสื้อในการศึกษาการก่อโรคของเชื้อ *V. campbellii* HY01 (*hhl⁺*),

V. harveyi PSU3283 (*hhl*⁺) และ *V. harveyi* PSU3280 (*hhl*⁻) ที่เลี้ยงในสภาวะ TSB+3% NaCl, pH 5 หรือ TSB+1.5% NaCl, pH 7.3 อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏของยีน *hhl* กับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในตัวอ่อนของหนอนผีเสื้อและ ยังไม่พบความแตกต่างของการทำให้เกิดโรคใน *V. harveyi* ที่มียีน *hhl* และไม่มียีน *hhl* ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อใช้ปัจจัยก่อโรคอื่นในการทำให้เกิดโรค หรือ อาจมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ภายในตัวอ่อนของสัตว์ทดลองที่ใช้ศึกษาส่งผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ

การศึกษานี้ได้คัดแยก non-*cholerae* *Vibrio* ได้จำนวน 231 ไอโซเลท จากตัวอย่างอาหารทะเลจำนวน 75 ตัวอย่าง และใช้เทคนิค colony blot hybridization ในการตรวจหาความชุกของเชื้อที่มียีน *hlyA* โดยเตรียม probe จากการเพิ่มจำนวนยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* O1 DMST 16261 ด้วยวิธี PCR แล้วนำมาติดฉลากโดยวิธี random-primed DNA labeling ด้วย DIG-dUTP จากนั้นนำไปทดสอบความจำเพาะและหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา hybridization เพื่อยืนยันว่า probe ไม่สามารถจับกับยีนสร้าง hemolysin ในกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจาก *hlyA* ได้ โดยยีนสร้าง hemolysin ที่สำคัญอื่น ๆ ที่มีรายงานในปัจจุบัน ได้แก่ *tlh*, *tdh* และ *trh* ซึ่งควบคุมการสร้าง TLH, TDH และ TRH ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า มีเชื้อเพียง 2 ไอโซเลทที่ให้ผลบวก (*V. parahaemolyticus* VP40 และ *V. alginolyticus* VA55) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ non-*cholerae* *Vibrio* กลุ่มที่พบมากในอาหารทะเลเป็น *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* (Chan *et al.*, 1986) จึงอาจไม่มีความหลากหลายทางสปีชีส์ของเชื้อที่แยกได้จากอาหารทะเลในครั้งนี้ อีกทั้งเชื้อทั้งสองสปีชีส์ก็ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบ ยีน *hlyA* homologues มาก่อน การทดสอบความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *V. parahaemolyticus* VP40 พบว่าเชื้อมีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงและได้น้อยมากไม่แตกต่างกับ *tdh*⁻*trh*⁻ *V. parahaemolyticus* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้ออาจได้รับยีนที่มีการกลายพันธุ์หรือการแสดงออกตรงบริเวณ promoter อย่างไรก็ตามพบว่า *V. alginolyticus* VA55 กลับสลายเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่า *V. alginolyticus* สายพันธุ์อื่น ๆ จากผลข้างต้นยังไม่สามารถระบุได้ถึงความสัมพันธ์ของการปรากฏของยีน *hlyA* ในเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท กับความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง เนื่องจากเมื่อทำการยืนยันการปรากฏของยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้ *V. cholerae* *hlyA* primers แล้วพบว่าให้ผลลบ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ primers เกาะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าไม่สามารถตรวจหายีน *hlyA* ของ *V. cholerae* non-O1/non-O139 จำนวน 2 ไอโซเลทได้ด้วยวิธี PCR แต่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี colony blot hybridization (Grim *et al.*, 2009) ในทางกลับกันเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท อาจไม่มียีน *hlyA* homologues แต่เทคนิค colony blot hybridization แสดงผลบวกปลอมเนื่องจากเทคนิคนี้มีความจำเพาะน้อยกว่าวิธี PCR (Noordhoek *et al.*, 1994; Grim *et al.*, 2009)

สรุปผลการทดลอง

1. ยีน *hhl* ของ *V. harveyi* PSU3282, PSU3283 และ PSU3288 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงมากกับยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันมากกว่า 84% บ่งชี้ว่า *V. harveyi* อาจจะได้รับถ่ายทอดยีนนี้มาจาก *V. cholerae*
2. ความเค็ม และ pH ส่งผลต่อการเจริญและการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl*⁺ *V. harveyi* โดย *V. harveyi* ทุกสายพันธุ์มีอัตราการเจริญสูงสุดในสภาวะที่มี 3% NaCl, pH 8.6 แต่ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของ *hhl*⁺ *V. harveyi* เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเค็ม และ pH ที่แตกต่างไปจากสภาวะดังกล่าว โดยพบว่าที่ pH 7.3 เชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 0.5% และ 1.5% NaCl มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่าที่เชื้อที่เจริญในสภาวะที่มี 3% NaCl และเชื้อที่เจริญที่ pH 5 และ pH 8.6 มีความสามารถสลายเม็ดเลือดแดงสูงที่สุดในทุกความเค็มที่ทดสอบ และ *hhl*⁺ *V. harveyi* มีความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงสูงกว่า *hhl*⁻ *V. harveyi* ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ของการปรากฏของยีน *hhl* กับความสามารถในการทำให้เกิดโรคในตัวอย่างของหนองฝีเสื่อ (*G. mellonella*) อย่างไรก็ตามการถ่ายโอนยีน *hlyA* จาก *V. cholerae* ไปยัง *V. harveyi* อาจส่งเสริมให้เชื้อสายพันธุ์ที่ได้รับยีนสามารถปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย และเพิ่มความสามารถในการก่อโรคของเชื้อในบางสภาวะได้
3. ในอาหารทะเลมีความชุกของเชื้อกลุ่ม non-*cholerae* *Vibrio* ที่มียีน *hlyA* น้อยมาก (0.01%) และการยืนยันการปรากฏของยีน *hlyA* ที่ตรวจพบในเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท โดยใช้วิธี PCR ได้ผลลบและไม่พบความสัมพันธ์ของการปรากฏของยีนดังกล่าวต่อความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* แต่พบใน *V. alginolyticus*

บรรณานุกรม

- ชาญณรงค์ รอดคำ. โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา. เข้าถึงได้จาก: www.micro.vet.chula.ac.th/index.php/doc/doc_download/57. วันที่สืบค้น 7 พฤษภาคม 2557.
- Austin, B. and Allen, D. A. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture*. 26(3): 369-383.
- Austin, B. and Austin, D. A. 2007. Bacterial Fish Pathogens. In *Environmental Sciences*. editors. Springer Netherlands, pp 552.
- Austin, B. and Zhang, X. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*. 43(2): 119-124.
- Baba, K., Shirai, H., Terai, A., Kumagai, K., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. 1991. Similarity of the tdh gene-bearing plasmids of *Vibrio cholerae* non-01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*. 10(1): 61-70.
- Baratela, K., Saridakis, H., Gaziri, L. and Pelayo, J. 2001. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. *Journal of Applied Microbiology*. 90(3): 482-487.
- Bavdek, A., Kostanjsek, R., Antonini, V., Lakey, J. H., Dalla Serra, M., Gilbert, R. J. and Anderluh, G. 2012. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 279(1): 126-141.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M. and Rosenberg, E. 2003. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Applied and environmental microbiology*. 69(7): 4236-4242.
- Bertone, S., Gili, C., Moizo, A. and Calegari, L. 1996. *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases*. 19(6): 429-434.
- Bordas, M. A., Balebona, M. C., Zorrilla, I., Borrego, J. J. and Morinigo, M. A. 1996. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 62(10): 3650-3654.
- Chan, K., Woo, M., Lo, K. and French, G. 1986. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(6): 1407-1411.

- Chari, P. B. and Dubey, S. K. 2006. Rapid and specific detection of luminous and non-luminous *Vibrio harveyi* isolates by PCR amplification. *Current Science*. 90(8): 1105-1108.
- Choi, H. K., Park, N. Y., Kim, D.-i., Chung, H. J., Ryu, S. and Choi, S. H. 2002. Promoter analysis and regulatory characteristics of *vhBA* encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Biological Chemistry*. 277(49): 47292-47299.
- Conejero, M. J. U. and Hedreyda, C. T. 2004. PCR detection of hemolysin (*vhh*) gene in *Vibrio harveyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 50(3): 137-142.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by *16S rRNA* gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12): 5116-5122.
- De O Santos, E., Alves, N., Dias, G. M., Mazotto, A. M., Vermelho, A., Vora, G. J., Wilson, B., Beltran, V. H., Bourne, D. G. and Le Roux, F. 2011. Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. *The International Society for Microbial Ecology journal*. 5(9): 1471-1483.
- Farmer III, J. and Hickman-Brenner, F. 2006. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In *The Prokaryotes*. editors. Springer, pp 508-563.
- Farmer, J. J. I., Janda, J. M., Brenner, F. W., Cameron, D. N. and Birkhead, K. M. 2005. Genus 1. *Vibrio* Pacini 1854. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Brenner, editors. Springer, New York, pp 494-546.
- Feeley, J. C. and Pittman, M. 1963. Studies on the haemolytic activity of El Tor vibrios. *Bulletin of the World Health Organization*. 28(3): 347.
- Forti, S. and Menestrina, G. 1989. Staphylococcal alpha- toxin increases the permeability of lipid vesicles by cholesterol and pH- dependent assembly of oligomeric channels. *European Journal of Biochemistry*. 181(3): 767-773.
- Fouz, B., Conchas, R. F., Bolinches, J., Romalde, J. L., Barja, J. L. and Toranzo, A. E. 1990. Relationship among pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio tubiashii* with environmental vibrios. *Pathology in marine science*. Academic Press, Inc., New York. 77-89.
- Fukasawa, S., Nakamura, K., Kamii, A., OHYAMA, Y. and OSUMI, M. 1988. Purification and properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11 (*Microbiology & Fermentation Industry*). *Agricultural and biological chemistry*. 52(2): 435-441.

- Gauger, E. J. and Gomez-Chiarri, M. 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Diseases of aquatic organisms*. 52: 39-46.
- Geoffroy, C., Gaillard, J., Alouf, J. E. and Berche, P. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 55(7): 1641-1646.
- Grim, C. J., Zo, Y., Hasan, N. A., Ali, A., Chowdhury, W. B., Islam, A., Rashid, M. H., Alam, M., Morris, J. G. and Huq, A. 2009. RNA colony blot hybridization method for enumeration of culturable *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(17): 5439-5444.
- Han, J., Lee, J., Choi, Y., Park, J., Choi, T. and Kong, I. 2002. Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1599(1): 106-114.
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. and Kumagai, S. 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12): 5819-5823.
- Hasegawa, H., Lind, E. J., Boin, M. A. and Hase, C. C. 2008. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(13): 4101-4110.
- Hirono, I., Masuda, T. and Aoki, T. 1996. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*. 21(3): 173-182.
- Ichinose, Y., Yamamoto, K., Nakasone, N., Tanabe, M., Takeda, T., Miwatani, T. and Iwanaga, M. 1987. Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity*. 55(5): 1090-1093.
- Iida, T. and Honda, T. 1997. Hemolysins produced by vibrios. *Toxin Reviews*. 16(4): 215-227.
- Johnson, F. H. and Shunk, I. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *Journal of Bacteriology*. 31(6): 585.
- Kim, G., Lee, J., Huh, S., Yu, J. and Kong, I. 1997. Nucleotide sequence of the *vmhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1360(2): 102-104.
- Kiriratnikom, S., Ruangsri, J., Wanadet, M., Songpradit, A., Suanyuk, N., Thapuksorn, W. and Supamattaya, K. 2000. Abiotic factors influencing the growth of luminescent bacteria, *Vibrio harveyi* in seawater. *Songklanakarin Journal of Science and Technology (Thailand)*. 22: 697-705.

- Kongrueng, J., Yingkajorn, M., Bunpa, S., Sermwittayawong, N., Singkhamanan, K. and Uddhakul, V. 2014. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *Journal of Fish Diseases* doi:10.1111/jfd.12308.
- Kothary, M. H., Lowman, H., McCardell, B. A. and Tall, B. D. 2003. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. *Infection and Immunity*. 71(6): 3213-3220.
- Krishnan, H., Ghosh, A., Paul, K. and Chowdhury, R. 2004. Effect of anaerobiosis on expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 72(7): 3961-3967.
- Kurazono, H., Pal, A., Bag, P. K., Balakrish Nair, G., Karasawa, T., Mihara, T. and Takeda, Y. 1995. Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin, accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin *Vibrio cholerae* of diverse origins. *Microbial Pathogenesis*. 18(3): 231-235.
- Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Birka, C., Weinstock, C., Northoff, H., Wieder, T., Lang, F. and Huber, S. M. 2004. Effect of *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin on human erythrocytes. *Cellular microbiology*. 6(4): 391-400.
- Lavilla-Pitogo, C., Leano, E. and Paner, M. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*. 164(1): 337-349.
- Lee, J. 1990. *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *Principle of Bacteriology, Virology and Immunity*. Parker, editors. B.C. Decker, Philadelphia, pp 514-527.
- Lee, K., Liu, P. and Chuang, W. 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology*. 4(3): 267-277.
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC handbook of mariculture*. 1: 393-486.
- Liu, P., Lee, K., Tu, C. and Chen, S. 1997. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Current microbiology*. 35(1): 32-39.
- Liuxy, P., Lee, K. and Chen, S. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in applied microbiology*. 22(6): 413-416.
- Mahoney, J. C., Gerding, M. J., Jones, S. H. and Whistler, C. A. 2010. Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(22): 7459-7465.

- McMillan, S., Verner-Jeffreys, D., Weeks, J., Austin, B. and Desbois, A. P. 2015. Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*. *BMC microbiology*. 15(1): 127.
- Montero, A. and Austin, B. 1999. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *Journal of Fish Diseases*. 22(5): 377-386.
- Nishibuchi, M., Khaemonee-iam, V., Honda, T., Kaper, J. B. and Miwatani, T. 1990. Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-01, *V. mimicus*, and *V. hollisae* that are similar to the tdh gene of *V. parahaemolyticus*. *Federation of European Biochemical Societies Microbiology Letters*. 67(3): 251-256.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T. and Wakabayashi, H. 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor* supratexta. *Fish Pathology (Japan)*. 33: 495-502.
- Noordhoek, G. T., Kolk, A., Bjune, G., Catty, D., Dale, J. W., Fine, P., Godfrey-Faussett, P., Cho, S., Shinnick, T. and Svenson, S. 1994. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 32(2): 277-284.
- Nyholm, S. and Nishiguchi, M. 2008. The evolutionary ecology of a sepiolid squid-*Vibrio* association: from cell to environment. *Vie et milieu (Paris, France: 1980)*. 58(2): 175.
- Olson, R. and Gouaux, E. 2003. *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an β -hemolysin-like core. *Protein science*. 12(2): 379-383.
- Pavia, A. T., Bryan, J. A., Maher, K. L., Hester, T. R. and Farmer, J. 1989. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Annals of Internal Medicine*. 111(1): 85-86.
- Prayitno, S. B. and Latchford, J. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*. 132(1): 105-112.
- Rattanama, P., Srinitiwarawong, K., Thompson, J. R., Pomwised, R., Supamattaya, K. and Vuddhakul, V. 2009. Shrimp pathogenicity, hemolysis, and the presence of hemolysin and TTSS genes in *Vibrio harveyi* isolated from Thailand. *Diseases of aquatic organisms*. 86(2): 113-122.
- Riemann, L. and Azam, F. 2002. Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(11): 5554-5562.

- Robertson, P. and Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of aquatic organisms*. 32: 151-155.
- Rock, J. L. and Nelson, D. R. 2006. Identification and characterization of a hemolysin gene cluster in *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*. 74(5): 2777-2786.
- Rozen, Y. and Belkin, S. 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(5): 513-529.
- Ruangpan, L. and Kitao, T. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of fish diseases*. 14(3): 383-388.
- Ruby, E., Greenberg, E. and Hastings, J. 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(2): 302-306.
- Ruwandeeepika, H., Defoirdt, T., Bhowmick, P., Shekar, M., Bossier, P. and Karunasagar, I. 2010. Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the *Harveyi* clade. *Journal of Applied Microbiology*. 109(3): 888-899.
- Saeed, M. 1995. Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture*. 136(1): 21-29.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R. and Fukui, Y. 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in microbiology*. 4.
- Schmidt, H., Maier, E., Karch, H. and Benz, R. 1996. Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia Coli* 0157: H7. *European Journal of Biochemistry*. 241(2): 594-601.
- Schuerch, D. W., Wilson-Kubalek, E. M. and Tweten, R. K. 2005. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 102(35): 12537-12542.
- Sherr, E. and Sherr, B. 2000. Marine microbes: an overview. *Microbial ecology of the oceans*. 13-46.
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S.-I., Yamamoto, S., Taniguchi, H. and Mizuguchi, Y. 1991. Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *Journal of General Microbiology*. 137(12): 2705-2711.
- Shinoda, S., Nakagawa, T., Shi, L., Bi, K., Kanoh, Y., Tomochika, K. i., Miyoshi, S. i. and Shimada, T. 2004. Distribution of virulence-associated genes in *Vibrio mimicus* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiology and immunology*. 48(7): 547-551.

- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Specker, J. L., Mael, M. and Gomez-Chiarri, M. 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carachariae* in summer flounder *paralichthys dentatus* during Intensive culture. *Diseases of aquatic organisms*. 38: 201-210.
- Soto-Rodriguez, S., Roque, A., Lizarraga-Partida, M., Guerra-Flores, A. and Gomez-Gil, B. 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana nauplii*. *Diseases of aquatic organisms*. 53(3): 231-240.
- Stoebner, J. A. and Payne, S. M. 1988. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 56(11): 2891-2895.
- Takeda, Y. 1982. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacology & Therapeutics*. 19(1): 123-146.
- Teo, J. W., Suwanto, A. and Poh, C. L. 2000. Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44(5): 1309-1314.
- Thompson, F. L., Austin, B. and Swings, J. 2006. The biology of vibrios. In., editors. American Society for Microbiology Press, pp 423.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. and Polz, M. F. 2004. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(7): 4103-4110.
- Tran, L. H. 2013. Determination, Characterization, and Control Measures of the Agent Causing Early Mortality Syndrome (EMS) also known as Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) in Farmed Penaeid Shrimp.
- Tsai, G., Tsai, F. and Kong, Z. 1997. Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. *International journal of food microbiology*. 38(2): 111-116.
- Urakawa, H., Kita Tsukamoto, K. and Ohwada, K. 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*. 145(11): 3305-3315.
- Vandenbergh, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. and Swings, J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*. 219(1): 9-20.
- Yamamoto, K., Wright, A., Kaper, J. and Morris, J. 1990. The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* E1 Tor hemolysin gene. *Infection and Immunity*. 58(8): 2706-2709.

- Yamasaki, S., Shirai, H., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. 1991. Analysis of the gene of *Vibrio hollisae* encoding the hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Federation of European Biochemical Societies Microbiology Letters 80(2-3): 259-263.
- Yingxue, Q., Jun, W., Yongquan, S., Dexiang, W. and Xinzhong, C. 2006. Studies on the pathogenic bacterium of ulcer disease in *Epinephelus awoara*. Acta Oceanol Sinica. 25(1).
- Zhang, X. H. and Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. Journal of Fish Diseases. 23(2): 93-102.
- Zhang, X. H. and Austin, B. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. Journal of Applied Microbiology. 98(5): 1011-1019.
- Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Qi, X., Su, H. and Xie, L. 2012. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "oebacterial white tail disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp. PloS one. 7(2): e29961.
- Ziegler, M. and Baldwin, T. O. 1981. Biochemistry of bacterial bioluminescence. Current topics in bioenergetics. 12: 65-113.

ภาคผนวก

รายงานการประชุมวิชาการ

ต้นฉบับที่ส่งไปยังวารสารวิชาการ

Applied Microbiology

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Applied Microbiology

Manuscript ID

JAM-2015-2403

Title

Effect of Culture Conditions on Hemolytic Activity and Virulence toward Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella*) of *Vibrio harveyi* Strains Harboring a Gene Homologous to *Vibrio cholerae* *hlyA*

Authors

Kissalai, Phachinee
Preeprem, Sutima
Mittraparp-arthorn, Pimonsri
Vuddhakul, Varaporn

Date Submitted

20-Nov-2015

[Author Dashboard](#)

วิธีการทดลองเพิ่มเติม

1. การตรวจหายีน *hhl* ด้วยวิธี PCR (Rattanama *et al.*, 2009)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.0
2.5 mM dNTPs	0.2 mM	1.6
2 μM <i>hhl</i> -F Primer	0.2 μM	1.0
2 μM <i>hhl</i> -R Primer	0.2 μM	1.0
5 U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.025 U/ μl	0.1
Template DNA	-	1.5
Water	-	12.8
Total volume	-	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ
Hot start	94	5 min	1
Denature	94	45 s	30
Annealing	50	1 min	
Extention	72	1 min	
Final Extention	72	10 min	1

2. การตรวจหา ยีน *16s rRNA* ด้วยวิธี PCR (Thompson *et al.*, 2004)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.0
2.5 mM dNTPs	0.2 mM	1.6
2 μM 567F Primer	0.2 μM	2.0
2 μM 680R Primer	0.2 μM	2.0
5 U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.025 U/ μl	0.1
Template DNA	-	2.0
Water	-	10.3
Total volume	-	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (min)	จำนวนรอบ
Hot start	95	8	1
Denature	95	1	35
Annealing	58	1	
Extention	68	1	
Final Extention	68	5	1

3. การตรวจหา ยีน *ompW* ด้วยวิธี PCR (Nandi *et al.*, 2000)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.0
2.5 mM dNTPs	0.25 mM	2.0
10 μM OmpW-F Primer	1 μM	2.0
10 μM OmpW-R Primer	1 μM	2.0
5 U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.05 U/ μl	0.2
Template DNA	-	2.0
Water	-	9.8
Total volume	-	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ
Hot start	95	5 min	1
Denature	95	30 s	30
Annealing	64	30 s	
Extention	68	30 s	
Final Extention	68	5 min	1

4. การตรวจหายีน *hlyA* ด้วยวิธี PCR ตัดแปลงจากวิธีของ (Rivera *et al.*, 2001)

ส่วนผสมของปฏิกิริยามีดังนี้

ส่วนผสม	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10X Buffer	1X	2.5
2.5 mM dNTPs	0.2 mM	2.0
20 μM <i>hlyA</i> -F/class Primer	0.8 μM	1.0
20 μM <i>hhl</i> -F/El Primer	0.8 μM	1.0
20 μM <i>hhl</i> -R Primer	0.8 μM	1.0
5 U/ μl <i>Taq</i> polymerase	0.025 U/ μl	0.125
Template DNA	-	2.0
Water	-	16.375
Total volume	-	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา (min)	จำนวนรอบ
Hot start	94	2	1
Denature	94	2	30
Annealing	60	1	
Extention	72	1	
Final Extention	72	10	1

5. การแยก non-*cholerae* *Vibrio* จากอาหารทะเล ดัดแปลงวิธีจาก (DePaola *et al.*, 1987)

5.1 เตรียมตัวอย่างโดย กุ้งใช้ทั้งตัว, หอยแคะเอาเปลือกออก, ปูจะใช้ส่วนของนมปู และหมึก ใช้บริเวณหนวด ปั่นตัวอย่างอาหารทะเลประมาณ 1 นาที จากนั้นแบ่งตัวอย่างมา 25 กรัมแล้วเติม alkaline peptone water (APW) pH 8.6 จำนวน 225 มิลลิลิตร กรองเอาส่วนน้ำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง นำมาแยกเชื้อโดยใช้อาหาร TCBS agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนีเดี่ยว ประมาณ 5 โคโลนี ที่แตกต่างกันทั้งโคโลนี สีเหลืองและสีเขียวและคาดว่าไม่ใช่ *V. cholerae*

5.2 นำโคโลนีที่ได้จาก TCBS agar มาเลี้ยงใน TSA+1% NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทดสอบ oxidase test โดยโคโลนีที่ให้ผล oxidase test เป็นบวก จะนำไปสกัด DNA เพื่อจำแนกเชื้อโดยวิธี PCR ต่อไป

6. การสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีต้มเดือด (boiling) (Thaithongnum *et al.*, 2006)

6.1 ถ่ายโคโลนีเดี่ยวจาก TSA+1% NaCl ลงในหลอดพีซีอาร์ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 µl และถ่ายเชื้อโคโลนีเดียวกัน spot ลงบน TSA+1% NaCl เพื่อเก็บ

6.2 ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยการ boiling ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที

6.3 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หรือ ใช้เป็น template DNA ได้ทันที

7. การจำแนก non-*cholerae* *Vibrio* โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ยีน *Vibrio 16S rRNA* และ *ompW* เป็นยีนเป้าหมาย

ใช้ primers 2 คู่ คือ 567F และ 680R เป็น genus-specific primers ส่วน *ompW*-F และ *ompW*-R เป็น species-specific primers สำหรับ *V. cholerae* แบคทีเรียในกลุ่ม non-*cholerae* *Vibrio* จะให้ผลบวกกับยีน 16s rRNA และให้ผลลบกับยีน *ompW* สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาระบุไว้ในข้อ 2 และ 3

Target genes	PCR primer and sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>Vibrio 16S rRNA</i>	567F: GCGTAAAGCGCATGCAGGT 680R: GAAATTCTACCCCCTCTACAG	110	(Thompson <i>et al.</i> , 2004)
<i>ompW</i>	OmpW-F: CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG OmpW-R: GAACTTATAACCCACCCGCG	588	(Nandi <i>et al.</i> , 2000)

8. การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับสังเคราะห์ *hlyA* hybridization probe

ดีเอ็นเอแม่แบบใช้ผลผลิต PCR ที่ได้จากยีน *hlyA* ของ *V. cholerae* O1, El Tor DMST16961 โดยใช้ *hlyA* primers สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาระบุไว้ในข้อ 4 จากนั้นสกัด PCR product ที่ได้จาก agarose gel ด้วย Gel/PCR fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan) และเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปติดฉลาก

Target genes	PCR primer and sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>hlyA</i>	<i>hlyA</i> -F/el tor:		
	GGCAAACAGCGAAACAATACC	481/738	Rivera <i>et al.</i> , 2001
	<i>hlyA</i> -F/class: GAGCCGGCATTTCATCTGAAT		
	<i>hlyA</i> -R: CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA		

9. การติดฉลาก *hlyA* hybridization probe

9.1 ติดฉลากดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้ตามวิธีที่ระบุไว้ใน DIG High Prime DNA labeling and detection starter kits I (Roche, Germany) โดยเติมดีเอ็นเอแม่แบบ 1 μg ลงในหลอดพีซีอาร์ และเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 16 μl

9.2 แยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยการให้ความร้อนเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในถังน้ำแข็ง

9.3 ผสมดีเอ็นเอสายเดี่ยวกับสารละลาย DIG-High prime หมุนเหวี่ยงอย่างรวดเร็วและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

9.4 หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที

9.5 วัดประสิทธิภาพการติดฉลาก probe เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอควบคุม ตามวิธีที่ระบุไว้ใน DIG High Prime DNA labeling and detection starter kits I (Roche, Germany)

10. การตรวจหาการกระจายของยีนกลุ่ม *hlyA* family โดยวิธี colony blot hybridization ดัดแปลงวิธีจาก (Litwin *et al.*, 1992)

10.1 เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10.2 เตรียมตัวอย่างลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยถ่ายโคโลนีของแบคทีเรียลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากนั้นวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญ

10.3 ทำให้เซลล์แตกบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีเชื้อเจริญแล้วลงบนกระดาษกรอง 3M ที่ชุ่มด้วยสารละลาย lysis solution (0.5 N NaOH) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะแพร่ผ่านแผ่นกรองไปย่อยเซลล์ ทำซ้ำ 2 ครั้ง ระงับย่ำให้สารละลายสัมผัสผิวหน้าที่มีเชื้อเจริญ

10.4 คีบแผ่นไนโตรเซลลูโลสวางลงบนกระดาษกรอง 3M ที่ชุ่มด้วยสารละลาย neutralization solution (1M Tris, pH 5.4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

- 10.5 เมื่อแผ่นไนโตรเซลลูโลสแห้ง ตรึงดีเอ็นเอของเชื้อบนแผ่นกรองโดย UV-cross linking
 10.6 ตรวจหาการกระจายของยีนกลุ่ม *hlyA* family ตามวิธีที่ระบุไว้ใน DIG High Prime DNA labeling และ detection starter kits I (Roche Applied Science, Germany)

11. การจำแนก non-*cholerae* *Vibrio* ที่มียีนกลุ่ม *hlyA* โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA*

- 11.1 สกัดดีเอ็นเอของ non-*cholerae* *Vibrio* ที่ให้ผล *hlyA* colony blot hybridization เป็นบวก ด้วย Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *16S rRNA* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ 27F และ 1492R primers แล้วสกัด PCR product ที่ได้จาก agarose gel ด้วย Gel/PCR fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan) จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

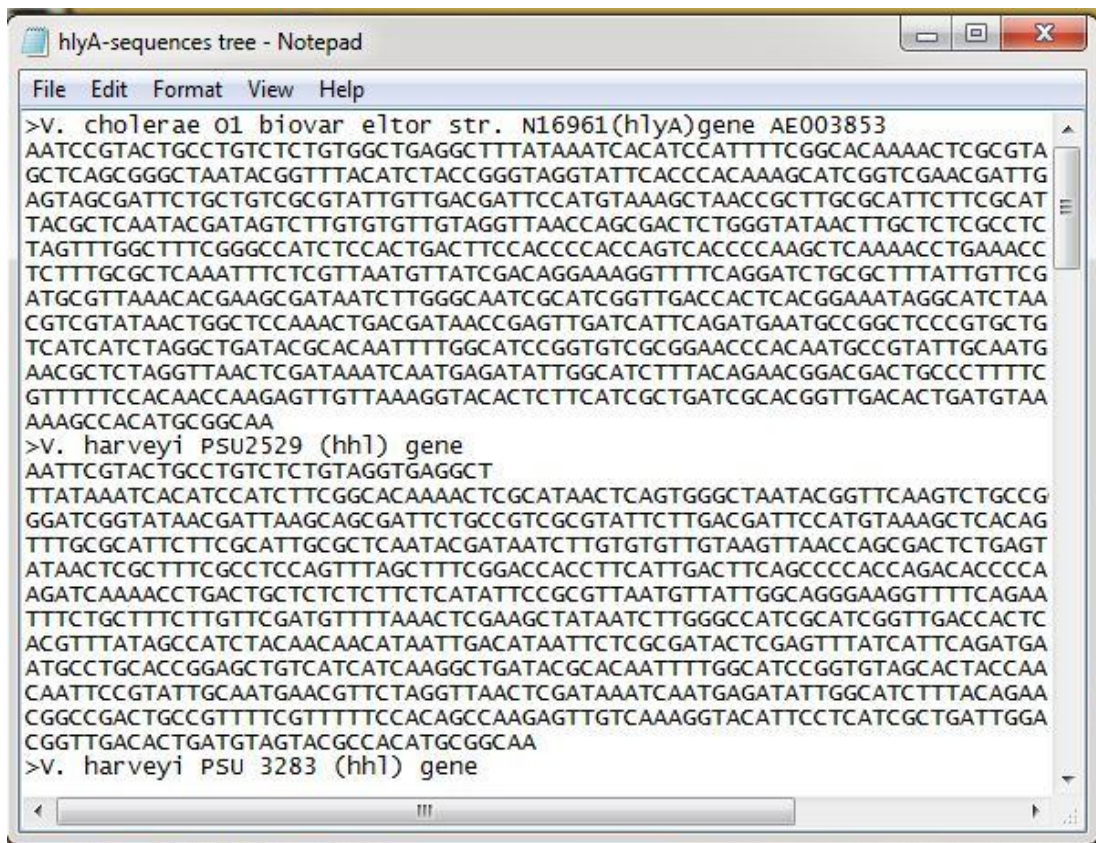
Target genes	PCR primer and sequence (5'-3')*	Product size (bp)	Reference
Bacterial 16S rRNA	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1,500	(Thompson <i>et al.</i> , 2004)

* M = A or C

12. การสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6

12.1 นำสาย sequence ที่ตัดได้ไป blast ในฐานข้อมูล ncbi

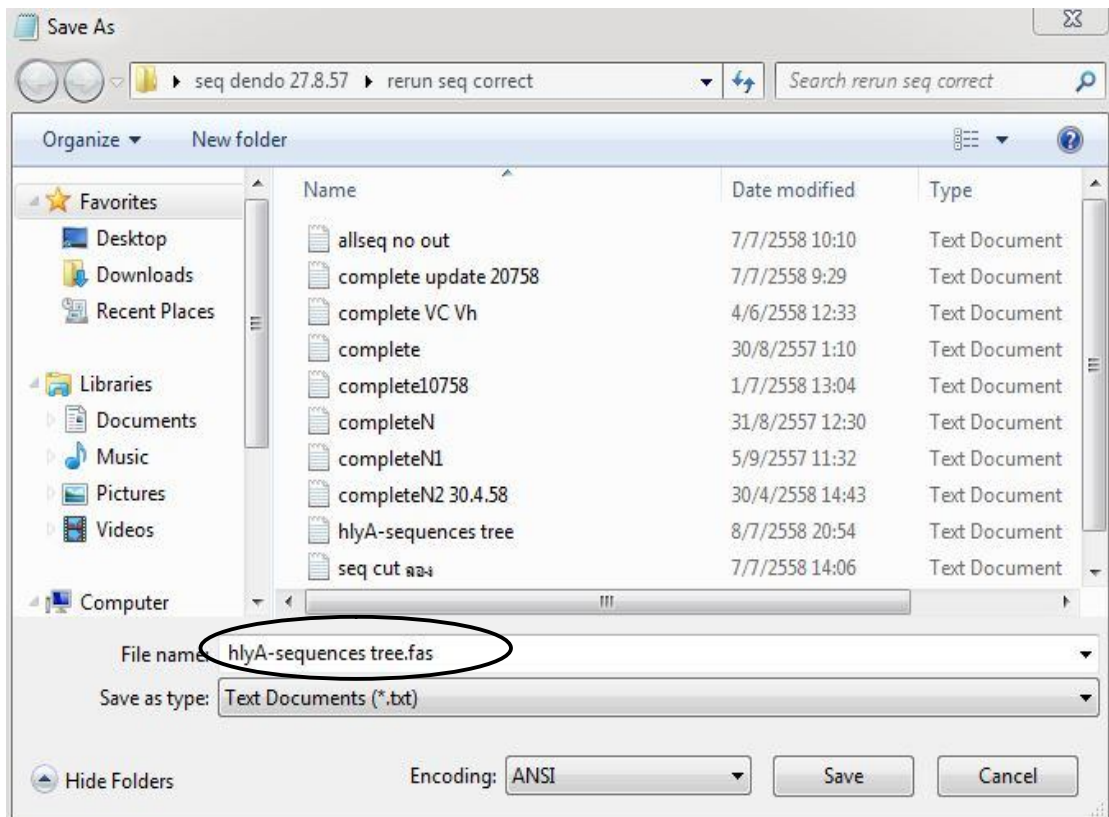
12.2 Copy sequence ที่จะใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ใส่ใน notepad และคลิก file > save as เป็นนามสกุล .fas ดังรูป



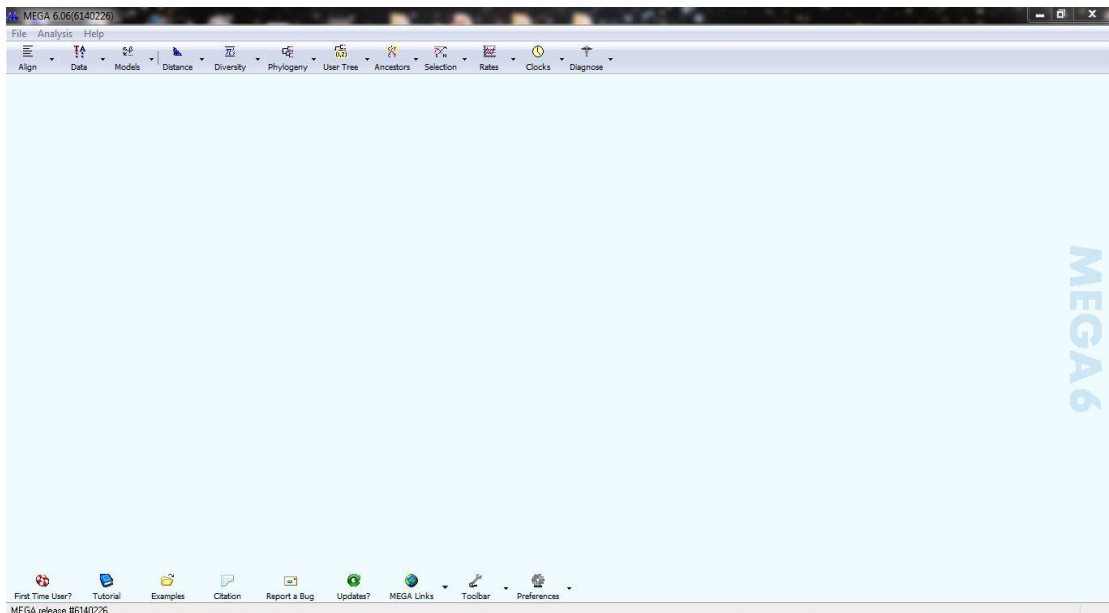
```

hlyA-sequences tree - Notepad
File Edit Format View Help
>v. cholerae 01 biovar eltor str. N16961(hlyA)gene AE003853
AATCCGCTACTGCCTGTCTCTGTGGCTGAGGCTTTATAAATCACATCCATTTTCGGCACAAAACTCGCGTA
GCTCAGCGGGCTAATACGGTTTACATCTACC GGGTAGGTATTCACCCACAAAGCATCGGTCGAACGATTG
AGTAGCGATTCTGCTGTCGCGTATTGTTGACGATTCCATGTAAGCTAACC GCTTGC GATTCTTCGCAT
TACGCTCAATACGATAGTCTTGTGTGTTGTAGGTTAACAGCGACTCTGGGTATAACTTGC TCTCGCCTC
TAGTTTGGCTTTTCGGGCCATCTCCACTGACTTCCACCCCACCAGTCACCCCAAGCTCAAAAACCTGAAACC
TCTTTGCGCTCAAATTTCTCGTTAATGTTATCGACAGGAAAGGTTTT CAGGATCTGCGCTTTATTGTTG
ATGCGTTAAACACGAAGCGATAATCTTGGGCAATCGCATCGGTTGACCACTCACGGAAATAGGCATCTAA
CGTCGTATAACTGGCTCCAAACTGACGATAACC GAGTTGATCATT CAGATGAATGCCGGCTCCCGTGCTG
TCATCATCTAGGCTGATACGCACAATTTTGGCATCCGGTGTCGCGGAACCCACAATGCCGATTGCAATG
AACGCTCTAGGTTAACTCGATAAATCAATGAGATATTGGCATCTTTACAGAACGGACGACTGCCCTTTTC
GTTTTTCCACAACCAAGAGTTGTTAAAGGTACACTCTTCATCGCTGATCGCACGGTTGACACTGATGTAA
AAAGCCACATGCGGCAA
>v. harveyi PSU2529 (hh1) gene
AATTCGCTACTGCCTGTCTCTGTAGGTGAGGCT
TTATAAATCACATCCATCTTCGGCACAAAACTCGCATAACTCAGTGGGCTAATACGGTTCAAGTCTGCCG
GGATCGGTATAACGATTAAGCAGCGATTCTGCCGTGCGGTATTCTTGACGATTCCATGTAAGCTCACAG
TTTGCGCATTCTTCGATTGCGCTCAATACGATAATCTTGTGTGTTGTAAGTTAACAGCGACTCTGAGT
ATAACTCGCTTTTCGCTCCAGTTTAGCTTTTCGGACCACCTTCATTGACTTCAGCCCCACCAGACACCCCA
AGATCAAAAACCTGACTGCTCTCTCTTCATATTCCGCGTTAATGTTATTGGCAGGGAAGGTTTT CAGAA
TTTCTGCTTTCTTGTTCGATGTTTTAAACTCGAAGCTATAATCTTGGGCCATCGCATCGGTTGACCACTC
ACGTTTATAGCCATCTACAACAACATAATTGACATAATTCGCGGATACCTGAGTTTATCATT CAGATGA
ATGCCCTGCACCGGAGCTGTCATCATCAAGGCTGATACGCACAATTTTGGCATCCGGTG TAGCTACCAA
CAATTCGCTATTGCAATGAACGTTCTAGGTTAACTCGATAAATCAATGAGATATTGGCATCTTTACAGAA
CGCCGACTGCCGTTTTCTGTTTTTCCACAGCCAAGAGTTGTCAAAGGTACATTCCTCATCGCTGATTGGA
CGGTTGACACTGATGTAGTACGCCACATGCGGCAA
>v. harveyi PSU 3283 (hh1) gene

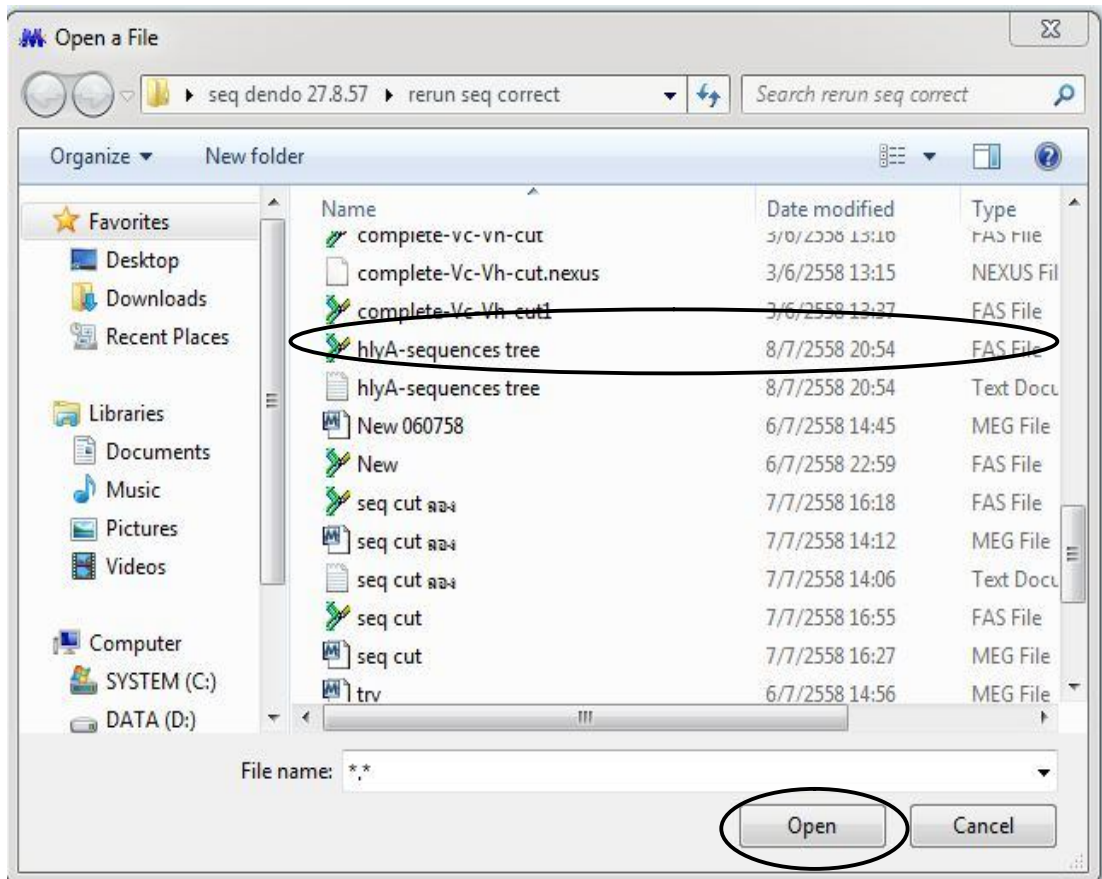
```



12.3 เปิดโปรแกรม MEGA6



12.4 คลิก File > open A file/session > เลือก file sequence ทั้งหมดนามสกุล .fas > open



12.6 คลิกชื่อ sequence ให้เป็นสีดำทั้งหมด > คลิก alignment > align by clustal W > OK

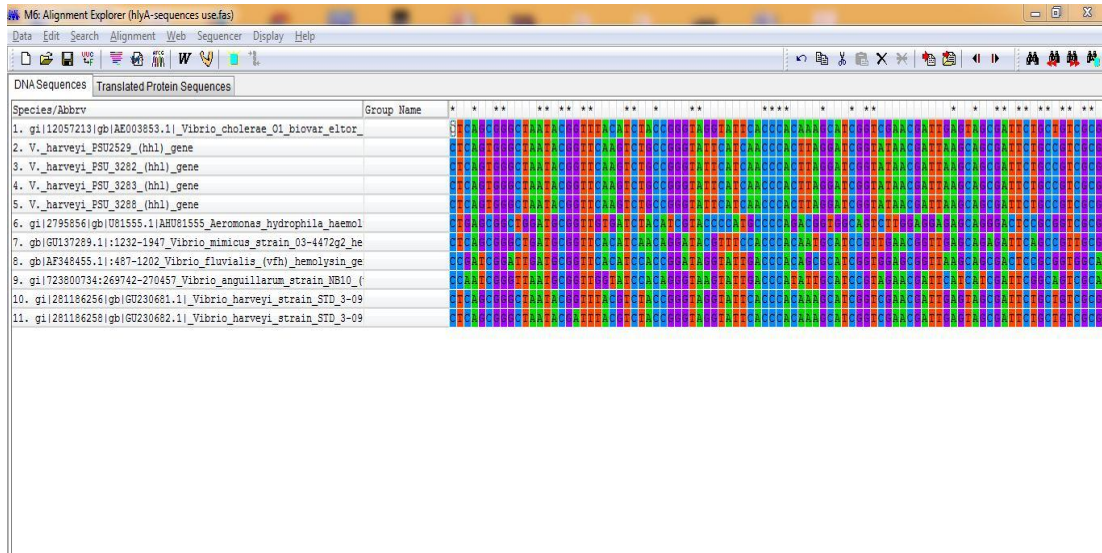
The image shows two screenshots of the ClustalW software interface. The top screenshot displays the 'M6: ClustalW Parameters' dialog box, which is used to configure alignment settings. The dialog box has several sections:

- DNA**: Includes 'Pairwise Alignment' with 'Gap Opening Penalty' set to 15 and 'Gap Extension Penalty' set to 6.66. It also has 'Multiple Alignment' with 'Gap Opening Penalty' set to 15 and 'Gap Extension Penalty' set to 6.66.
- DNA Weight Matrix**: Shows 'IUB' selected for the matrix and '0.5' for the transition weight.
- Use Negative Matrix**: Set to 'OFF'.
- Delay Divergent Cutoff (%)**: Set to 30.
- Keep Predefined Gaps**: An unchecked checkbox.
- Specify Guide Tree**: A button with an ellipsis.

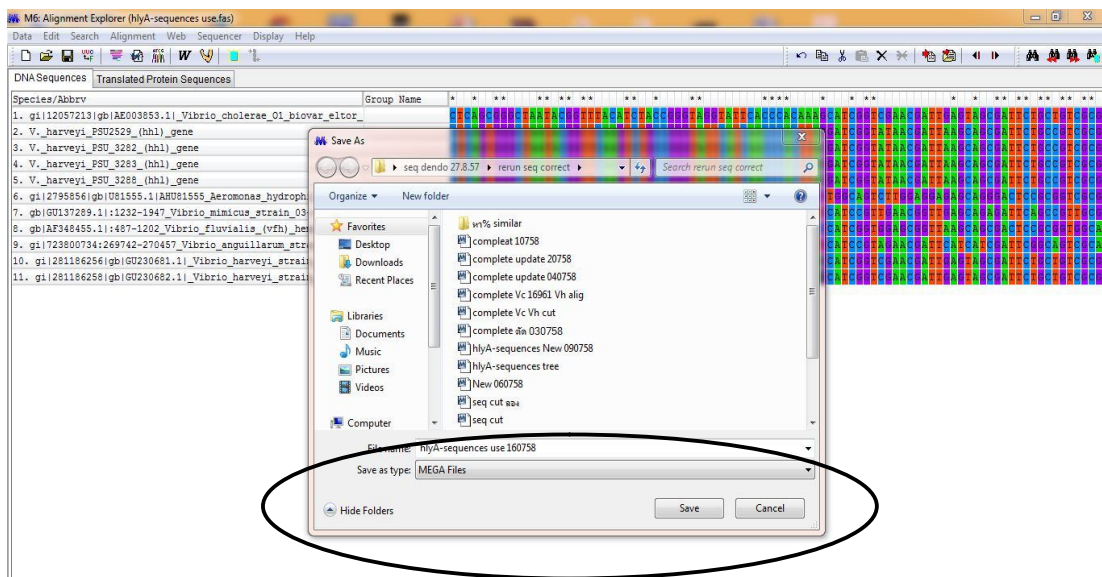
The 'OK' button is circled in red. The background shows a list of DNA sequences and a preview of the alignment results.

The bottom screenshot shows the 'M6: Alignment Explorer (hlyA-sequences use.fas)' window. It displays a table with columns for 'Species/Abbrv', 'Group Name', and the aligned DNA sequences. The sequences are aligned using ClustalW, showing gaps (indicated by dashes) and matches. A 'ClustalW Progress' dialog box is overlaid on the bottom right, showing progress bars for 'Pairwise alignment' and 'Multiple alignment', both of which are nearly complete. The 'Cancel' button is visible at the bottom of the progress dialog.

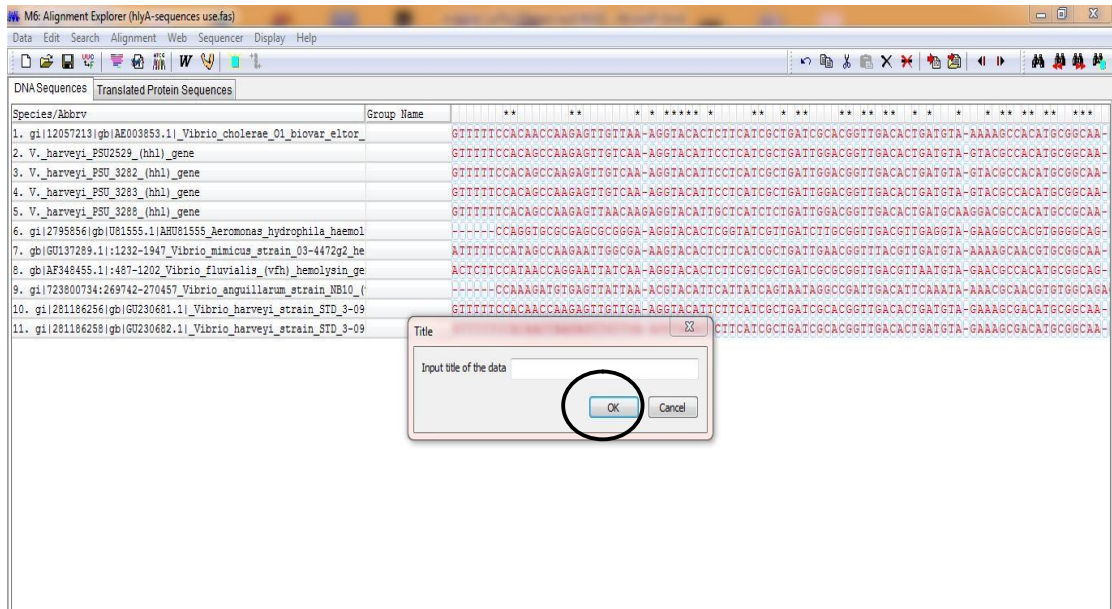
12.7 ปราบกฏ sequence ทั้งหมดที่ผ่านการ alignment



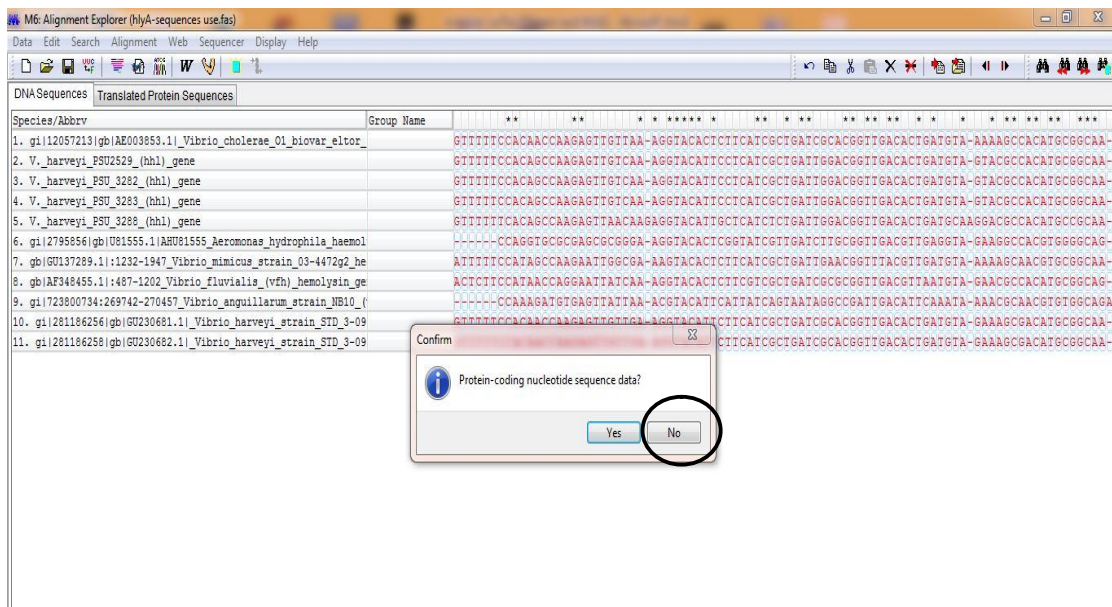
12.8 คลิก data > export alignment > MEGA format > พิมพ์ชื่อไฟล์ > save



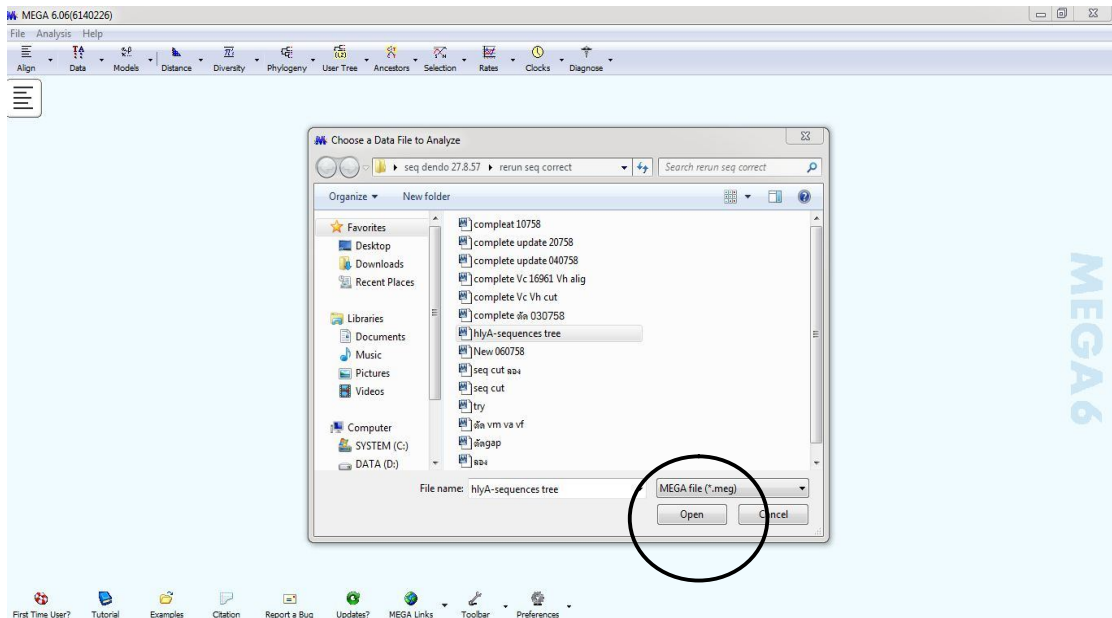
12. 9 ใส่ชื่อ Title > กด OK



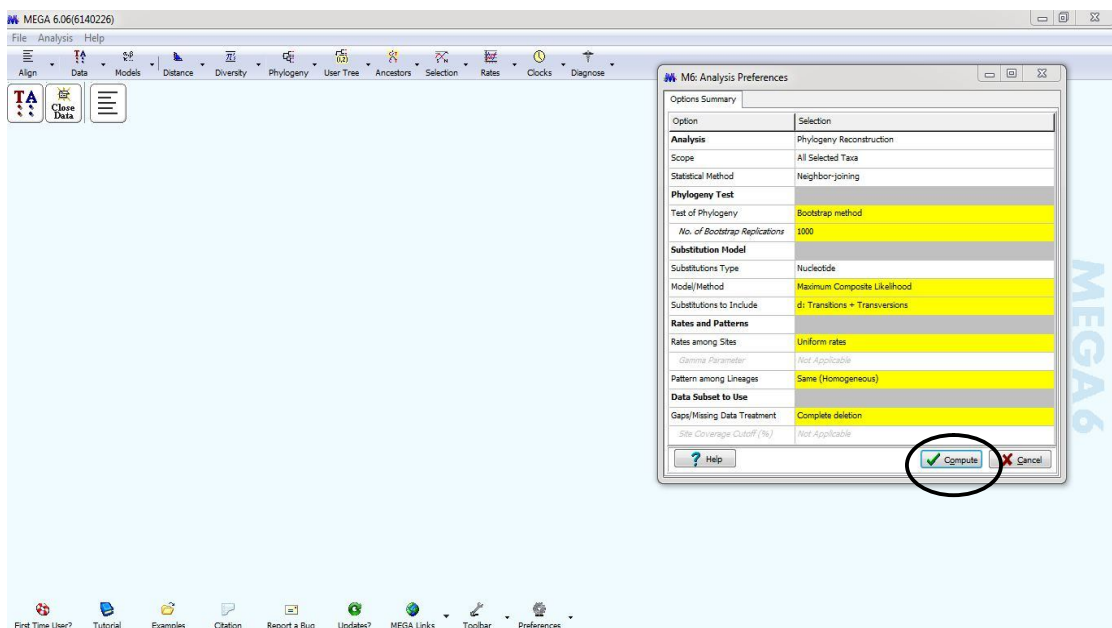
12.10 โปรแกรมถามว่า ต้องการ Protein-coding nucleotide sequence data หรือไม่ > กด No



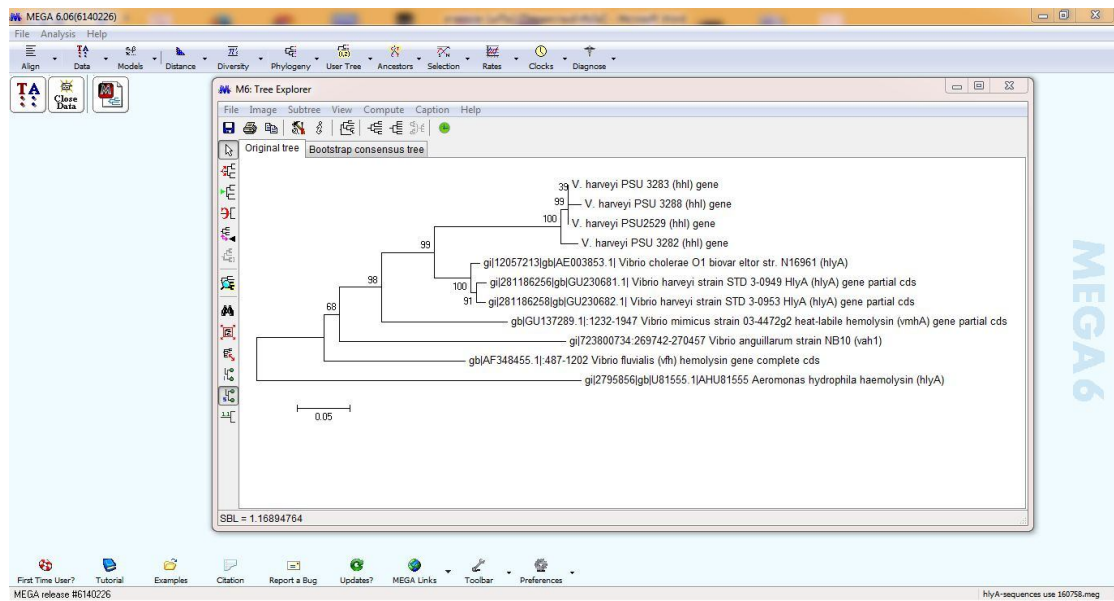
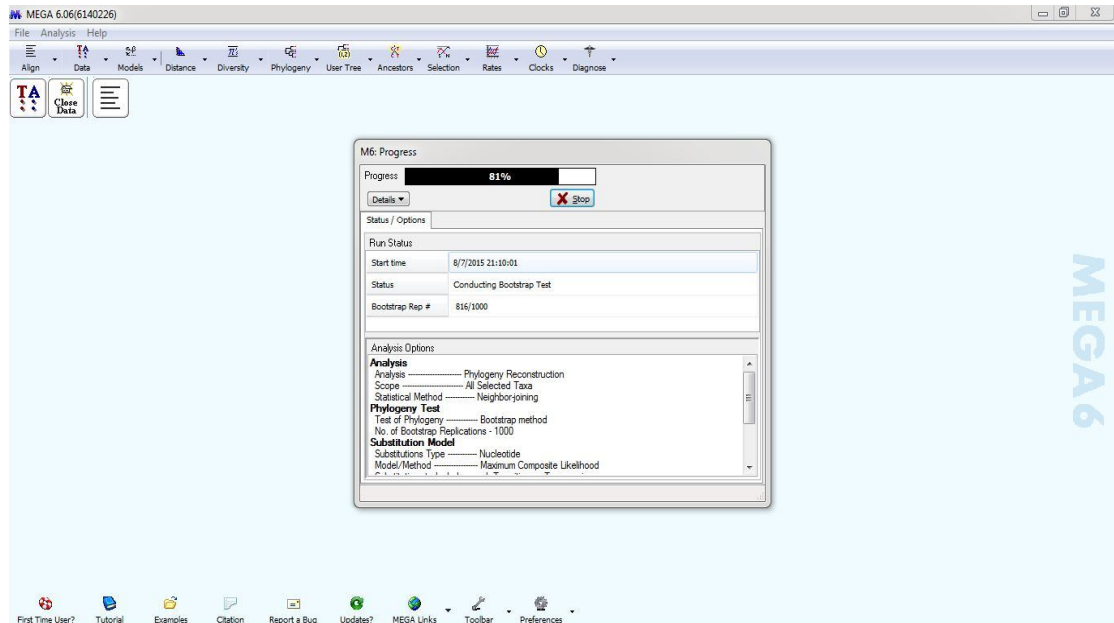
12.11 ปิดหน้าต่าง alignment > คลิก Phylogeny > เลือกประเภท tree ที่ต้องการวิเคราะห์ > เลือก file.meg > open



12.12 ช่อง Test of Phylogeny > เลือก Bootstrap method > compute



12.13 เมื่อโปรแกรมวิเคราะห์เสร็จ จะปรากฏ tree ขึ้นดังรูป



บรรณานุกรม

- DePaola, A., Motes, M. and McPhearson, R. 1987. Comparison of APHA and elevated temperature enrichment methods for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters: collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 71(3): 584-589.
- Litwin, C., Boyko, S. and Calderwood, S. 1992. Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae* fur gene. *Journal of Bacteriology*. 174(6): 1897-1903.
- Nandi, B., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, S., Nair, G. B., Shimada, T. and Ghose, A. C. 2000. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *ompW*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(11): 4145-4151.
- Rattanama, P., Sritiwarawong, K., Thompson, J. R., Pomwised, R., Supamattaya, K. and Vuddhakul, V. 2009. Shrimp pathogenicity, hemolysis, and the presence of hemolysin and TTSS genes in *Vibrio harveyi* isolated from Thailand. *Diseases of aquatic organisms* 86(2): 113-122.
- Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B. and Colwell, R. R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6): 2421-2429.
- Thaithongnum, S., Ratanama, P., Weeradechapol, K., Sukhoom, A. and Vuddhakul, V. 2006. Detection of *Vibrio harveyi* in shrimp post larvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture*. 261(1): 1-9.
- Thompson, C., Thompson, F., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P. and Swings, J. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 54(3): 919-924.

