

การพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียของไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)

ปริญญานิพนธ์
ของ
รัตชนก ศิริคะรินทร์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2553

การพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียของไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)

ปริญญานิพนธ์
ของ
รัตชนก ศิริคะรินทร์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียของไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)

บทคัดย่อ

ของ

รัตชนก ศิริคะรินทร์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2553

รัตชนก ศิริคะรินทร์ . (2553). การพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียของโรคน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*). ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ . คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันธ์, ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล.

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคน้ำนางฟ้าไทย ที่มีอาการ จุดดำจากโรง เพาะเลี้ยงภาค วิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น (KKU) จังหวัดขอนแก่น 2 ครั้งในช่วงเวลาปี ค.ศ. 2008 และ 2009 และจากวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี (SPCAT) จังหวัดสุพรรณบุรี 2 ครั้ง ในปี ค.ศ. 2009 นำมาทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องได้ 4 กลุ่ม คือ *Aeromonas* spp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. โดยสามารถแยกได้ *A. hydrophila* และ *A. sobria* ในทุกตัวอย่างจากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAbs) ที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila*, *Aeromonas* spp. และแอนติซีรั่มจากการปลูกภูมิคุ้มกันโดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม มาตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่มตามธรรมชาติของโรคน้ำนางฟ้าไทยจากทั้ง 2 แหล่งที่เก็บรวบรวมในช่วงปี ค.ศ. 2008 และ 2009 ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยสามารถแบ่งการติดเชื้อออกเป็น 3 ระดับ โดยระดับที่ 1 ตรวจพบแบคทีเรียในช่องทางเดินอาหาร ระดับที่ 2 พบการติดเชื้อแทรกตัวบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร และระดับที่ 3 พบการติดเชื้อภายในร่างกาย บริเวณต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อ และ เนื้อเยื่อต่างๆ การตรวจโดยวิธีนี้พบเชื้อ *Aeromonas* spp. ในบริเวณทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ (48/70) และบางตัวพบการติดเชื้อลุกลามเข้าสู่เยื่อบุทางเดินอาหาร (14/70) และกล้ามเนื้อ (8/70) พบการติดเชื้อ *Serratia* sp. (8/70), *Flavobacterium* sp. (10/70) และ *Pseudomonas* spp. (3/70) โดยส่วนใหญ่พบในทางเดินอาหาร และเป็นส่วนน้อยที่จะแทรกตัวเข้าสู่เยื่อบุทางเดินอาหาร และเนื้อเยื่ออื่นๆ จากผลแสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่จะพบการติดเชื้อ แบคทีเรีย *Aeromonas* spp. เป็นหลัก และพบการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เป็นจำนวนน้อย โดยมักจะพบการติดเชื้อร่วมกับ *Aeromonas* spp. ผลการศึกษาชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* spp. น่าจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่ทำให้เกิดอาการจุดดำในโรคน้ำนางฟ้าไทย โดยแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เป็นการติดเชื้อเพิ่มเติมเมื่อเกิดการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. และทำให้มีการติดเชื้อที่รุนแรงมากขึ้น

IDENTIFICATION OF BACTERIAL INFECTION IN FAIRY SHRIMP
(*Branchinella thailandensis*)

AN ABSTRACT
BY
RATCHANOK SIRIKHARIN

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University
May 2010

Ratchanok Sirikharin. (2010). *Identification of bacterial infection in fairy shrimp (Branchinella thailandensis)*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Siwaporn Longyant, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

Isolation of bacterial from black spot syndrome fairy shrimp, *Branchinella thailandensis* collected from 2 sourced during 2008 and 2009. All associated bacteria were identified by biochemical test. They were classified in to four groups as follow: *Aeromonas* spp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. and *Flavobacterium* sp.. From all samples *A. hydrophila* and/or *A. sobria* were consistently isolated. Immunohistochemical method utilizing monoclonal antibodies (MAbs) AH129, AH413 and AH396 specific to *A. hydrophila* *Aeromonas* spp. and antiserum made against to *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. and *Flavobacterium* sp. isolated in this study. In black spot syndrome fairy shrimps, the severity of infection was classified into 3 levels; the first level, the immunoreactivity was found only food mass in the intestinal tract. The second level, the bacteria invaded into the intestinal epithelium and the third level, the bacteria were invaded into the muscle and other tissues. *Aeromonas* infection was found to be the major infection in all these three levels the intestinal tract (48/70), intestinal epithelium (14/70) and muscular and other tissues (8/70) while only minor infection with variable immunoreactivity were observed with the *Serratia* sp. (8/70), *Flavobacterium* sp. (10/70) and *Pseudomonas* spp. (3/70). The results suggested that *Aeromonas* spp. were the major cause of black spot syndrome in fairy shrimp and the other bacteria maybe additional infection that increased severity of the infection.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียของไร้น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)
ของ
รัตชนก ศิริคะรินทร์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

.....ประธาน
(ดร.ประวิติ อังประภาพรชัย)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ
(ดร.วรรณิภา เพี้ยนักตร์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงลงได้ด้วย ความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่ง จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งใน ด้านวิทยาการ ความรู้ และจริยธรรม ประกอบ การทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.ประวัติ อังประภาพรชัย และ ดร.วรรณภา เพียรภักดิ์ ที่กรุณาได้รับ เป็น คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความ สมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชา การมากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และคุณสมบัติ รักประทานพร ที่ได้ให้ความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็น ประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำ วิจัยศึกษา และทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธู์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุน การศึกษา และการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณพี่น้อง เพื่อนๆ ทุกคน ในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอล แอนติบอดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่า ยิ่งอีกทั้งความ ช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรง และทางอ้อม และคุณอารีรัตน์ คุณานพรัตน์ ที่ได้ คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจข้าพเจ้าให้ทำงานได้ประสบความสำเร็จ

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา และพี่น้องของข้าพเจ้า ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุน และคอยให้คำปรึกษา และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่ เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอเอาผลป ระโยชน์อันเกิดจาก ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ ไร่นางฟ้า ไทยและหนูทดลองทุกตัว ที่ได้สละชีวิต เพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

รัตชนก ศิริคะรินทร์

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ไร่น้ำนางฟ้า (Fairy shrimp).....	4
อนุกรมวิธานของไร่น้ำนางฟ้า	4
ลักษณะทั่วไปของอะนาโตสตราแคน	4
ความหลากหลายของไร่น้ำนางฟ้าในประเทศไทย	6
ไร่น้ำนางฟ้าไทย.....	7
โรคจุดดำที่เกิดกับไร่น้ำนางฟ้า.....	9
สาเหตุของโรคที่เกิดในไร่น้ำนางฟ้า	9
ลักษณะของ <i>Aeromonas</i> spp.....	12
การแพร่ระบาดและการก่อโรค.....	16
ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค.....	18
การรักษาโรค.....	20
การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> spp.....	20
การศึกษาด้วยลักษณะและสมบัติทางชีวเคมี.....	20
การศึกษาด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา	21
การศึกษาด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา	22
การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	24
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
สัตว์ทดลอง.....	25
แบบที่เรีย สภาวะที่ใช้เลี้ยงและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	25
อุปกรณ์และสารเคมี.....	27
วิธีดำเนินการทดลอง.....	29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3 (ต่อ)		
	การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงไร่นางฟ้า.....	29
	การคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างไร่นางฟ้า.....	29
	การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย.....	29
	การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากตัวอย่างไร่นางฟ้า นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำเบื้องต้นโดยวิธีทางชีวเคมี.....	30
	การผลิตและตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม	30
	การเตรียมตัวอย่างไร่นางฟ้าไทยสำหรับการทดสอบแอนติซีรั่ม	31
	การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติของไร่นางฟ้าไทย.....	32
	การตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC).....	32
4 ผลการทดลอง		
	การเก็บตัวอย่าง.....	35
	การคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างไร่นางฟ้า.....	36
	การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จาก ตัวอย่างไร่นางฟ้า ไทยเบื้องต้นโดยวิธีทางชีวเคมี.....	36
	การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากตัวอย่างไร่นางฟ้า ไทยเบื้องต้นโดย dot blotting.....	37
	การผลิตและตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม.....	37
	การทดสอบความสามารถในการใช้แอนติบอดีตรวจไร่นางฟ้าไทยที่ติดเชื้อ แบคทีเรียโดยวิธี immunohistochemistry.....	45
	การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติในไร่นางฟ้าไทยโดยวิธี Immunohistochemistry.....	45

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 การสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	51
บรรณานุกรม.....	57
ภาคผนวก.....	63
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	66
ภาคผนวก ค.....	68
ภาคผนวก ง.....	70
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	72

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	คุณค่าทางสารอาหารของไร่น้ำนางฟ้าไทย (<i>Branchinella thailandensis</i>) และอาร์ทีเมีย (<i>Artemia</i>).....	8
2	สมบัติทางชีวเคมีของ <i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> และ <i>A. caviae</i>	13
3	การจัดจำแนกกลุ่มภายในจีโนส <i>Aeromonas</i> โดยวิธี Hybridization groups (genospecies) และ phenospecies.....	15
4	ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ <i>A. hydrophila</i>	23
5	แบคทีเรียอ้างอิงชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
6	อาหารสำหรับทดสอบสมบัติทางชีวเคมี.....	26
7	สถานที่เก็บตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีลักษณะอาการของโรคจุดดำ.....	29
8	สมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ.....	39
9	ความหลากหลายทางชีวเคมีของ <i>Aeromonas</i> spp. ที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำและปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	40
10	สรุปจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้จากสมบัติทางชีวเคมีและปฏิกิริยากับแอนติบอดี.....	41
11	ผลสรุป จำนวนไอโซเลตของ แบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทย ที่มีอาการจุดดำ.....	42
12	การติดเชื้อแบคทีเรียของไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำจากแหล่งธรรมชาติ.....	48

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ลักษณะทั่วไปของอะนอสตราแคน.....	5
2 ไร่น้ำนางฟ้าที่พบในประเทศไทย.....	7
3 ไช้ของไร่น้ำนางฟ้าที่พบในประเทศไทย.....	7
4 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง	34
5 ไร่น้ำนางฟ้าไทย (<i>B. thailandensis</i>).....	35
6 การคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรีย	36
7 การทดสอบแบคทีเรียที่แยกได้กับแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting.....	43
8 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวโดยวิธี Western blotting...	44
9 การตรวจการติดเชื้อ แบคทีเรียของ ไร่น้ำนางฟ้า ไทยที่ชักนำให้ติดเชื้อ แบคทีเรีย โดยการจุ่ม.....	47
10 การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติของไร่น้ำนางฟ้าไทยจาก KKU โดยวิธี immunohistochemistry.....	49
11 การตรวจการติดเชื้อ แบคทีเรีย ตามธรรมชาติ ของไร่น้ำนางฟ้าไทยจาก SPCAT โดยวิธี immunohistochemistry.....	50

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ไร่น้ำนางฟ้า เป็นสัตว์น้ำจืดชนิดหนึ่งคล้ายกุ้ง คนพื้นบ้านเรียก แมงอ่อนช้อย แมงแวง แมงหางแดง และแมงน้ำฝน จัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรโปดา (Arthropoda) ไฟลัมยอยครัสเตเชีย (Crustacea) คลาสแบรคิโอโปดา (Branchiopoda) อันดับอะนอสตราคา (Anostraca) แต่ไม่มีเปลือกแข็งหุ้ม จัดอยู่ในประเภทสัตว์โบราณ เนื่องจากมีขาค่ายน้ำจำนวน 11 คู่ และมีพฤติกรรมว่ายน้ำแบบหงายท้อง ในประเทศไทยพบไร่น้ำนางฟ้าชนิดใหม่ของโลก และจัดเป็นสัตว์ประจำถิ่นที่พบในประเทศไทยเท่านั้น 3 ชนิด คือ 1. ไร่น้ำนางฟ้าสิรินธร (*Streptocephalus sirindhornae*), 2. ไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) และ 3. ไร่น้ำนางฟ้าสยาม (*Streptocephalus siamensis*) (นุกูลแสงพันธ์; โฆษิตศรีภูธร; และละออศรี เสนาะเมือง. 2549: 1-10)

ปัจจุบันไร่น้ำนางฟ้าเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดใหม่ ที่มีศักยภาพทดแทนการนำเข้าอาร์ทีเมีย (*artemia*) หรือไร่น้ำเค็ม ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก โดยมีการนำเข้าอาร์ทีเมียมากถึงปีละ 200-600 ตัน คิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่าปีละ 500 ล้านบาท ไร่น้ำนางฟ้ามีศักยภาพในการนำมาเป็นอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะกลุ่มของสัตว์น้ำเศรษฐกิจเช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม กุ้งขาว แวนนาไม ปลานิล ปลาสวาย ปลาดุกด้าน ปลาน้ำ เป็นต้น (พุทธพรณี บุญมาก; นุกูลแสงพันธ์; และละออศรี เสนาะเมือง. 2550: 125-131) จากการศึกษาพบว่า ไร่น้ำนางฟ้าไทย (*B. thailandensis*) เป็นชนิดที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเป็นชนิดที่โตเร็วกว่าไร่น้ำนางฟ้าชนิดอื่น สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ และเร่งสีสันทำให้ปลามีความสวยงามมากยิ่งขึ้น (นุกูล แสงพันธ์; และราเมศ ชูสิงห์. 2549: 32-37) อย่างไรก็ตามในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้เกิดปัญหาอาการจุดดำ (black spot syndrome) โดยอาการของโรค มีลักษณะเป็นปมสีดำเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนต่างๆ ของร่างกายเช่น ขาค่ายน้ำ หนวด และหาง ทำให้ไร่น้ำนางฟ้าตายเป็นจำนวนมากหลังจากแสดงอาการของโรค ภายใน 1-5 วัน ส่งผลต่อปริมาณการผลิต และลดมูลค่าทางเศรษฐกิจของไร่น้ำนางฟ้า (หนูเดือน เมืองแสน; สุวรรณนา เนียมสนิท; และสุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์. 2549: 39-45)

จากการศึกษาการเกิดอาการจุดดำที่พบในไร่น้ำจืดชนิดอื่น ได้แก่ *Branchipus schaefferi*, *Chirocephalus diaphanous* และ *Streptocephalus torvicornis* ที่เก็บจากบ่อธรรมชาติและจากโรงเพาะเลี้ยงในประเทศเบลเยียม โดยพบลักษณะอาการของโรค คือ มีปมสีดำตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย และเมื่อทำการแยก เชื้อแบคทีเรียจากไร่น้ำ จืดที่เป็นโรค และทดสอบการก่อโรค พบแบคทีเรีย 5 กลุ่ม คือ *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Comamonas testosteroni*, *Aeromonas* sp. และ *Flavobacterium* sp. โดยพบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ANOS 2 เป็นชนิดที่ทำให้ไร่น้ำจืดตายมากกว่า 58% ภายในเวลา 5 วัน (Diercken; et al.1998: 113-119)

และจากข้อมูลเบื้องต้น ในการแยกเชื้อ แบคทีเรียจาก ไร่น้ำนางฟ้า ไทยที่มีลักษณะของโรคจุดดำ ในประเทศไทย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ *Aeromonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. และ *Chryseobacterium* spp. (หนูเดือน เมืองแสน ; สุวรรณนา เนียมสนิท ; และ สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์ . 2549: 39-45) ซึ่งผลดังกล่าวชี้ให้เห็น ถึงความหลากหลาย ของเชื้อแบคทีเรีย ที่อาจจะเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคจุดดำในไร่น้ำจืด และอาจเปลี่ยนไป ตามสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ยังมีรายงาน การศึกษาพบว่า เชื้อ *Aeromonas* sp., *Klebsiella pneumoniae* และ *Enterobacter* sp. ที่พบได้ในบ่อน้ำและทะเลสาบน้ำจืดก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในสัตว์น้ำอื่นได้เช่นกัน (Campbell; et al. 1976: 1762-1767)

จากรายงานการศึกษาเชื้อที่ก่อโรคในไร่น้ำนางฟ้าไทยดังกล่าว แม้วานักวิชาการได้ทำการตรวจและจำแนก แบคทีเรียจาก ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่เป็นโรคจุดดำเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคจุดดำยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่ผลการศึกษาในไร่น้ำจืดที่เป็นโรคจุดดำ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องได้หลายกลุ่ม แต่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบได้แก่ *Aeromonas* spp. ที่สามารถแยกได้ในไร่น้ำจืดทุกกลุ่มที่ใช้ในการศึกษา นอกจากนี้จากรายงานของเดอร์เกน (Diercken; et al. 1998: 113-119) พบว่า *Aeromonas hydrophila* ANOS 2 เป็นไอโซเลตที่ทำให้เกิดอัตราการตายของไร่น้ำจืด 58% ดังนั้นจากสาเหตุดังกล่าว จึงคาดว่าแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* spp. น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรคจุดดำในไร่น้ำจืด

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่ง เกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งเป็นปฏิกิริยา ที่มีความจำเพาะสูง รวดเร็ว และมีความไวในการตรวจสอบการก่อโรค โดยนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody; MAbs) ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในการวิจัย (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 95-97) และศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการก่อโรคจุดดำ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียในแหล่งน้ำออกจากกันได้ จากความสำเร็จในการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ AH396 และ AH413 ที่มีความจำเพาะ ต่อ *Aeromonas* spp. ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบ และโมโนโคลนแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อ *A. hydrophila* คือ AH129 สามารถนำมาใช้ตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. 2552: ถ่ายเอกสาร) โดยสามารถนำเอา MAbs เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในไร่น้ำที่เป็นโรคจุดดำได้ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกัน และจัดการระบบการเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อทำการ แยก และคัดเลือกแบคทีเรียก่อโรคในไร่น้ำนางฟ้าที่ทำให้เกิดอาการจุดดำ (black spot syndrome) และพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติของไร่น้ำนางฟ้าไทย โดยวิธี immunohistochemistry

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่ อาจเป็นสาเหตุของการ เกิดอาการจุดดำในไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)
2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนแนวทางการป้องกัน และการแพร่ระบาดของอาการจุดดำต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการก่ออาการจุดดำในไร่น้ำนางฟ้าไทย
2. ระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี และการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี
3. ผลิตแอนติซีรัมต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ และตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ผลิตได้
4. ตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย ตามธรรมชาติของ ไร่น้ำนางฟ้า ไทย โดยวิธี immunohistochemistry

สมมติฐานการวิจัย

แบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทยเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการจุดดำ และสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติ เช่นเดียวกับการติดเชื้อจากธรรมชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ไรน้ำนางฟ้า (Fairy shrimp)

1.1 ออนุกรมวิธานของไรน้ำนางฟ้า

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea
Class	Branchiopoda
Order	Anostracan

1.2 ลักษณะทั่วไปของอะนอสตราแคน (Anostracan)

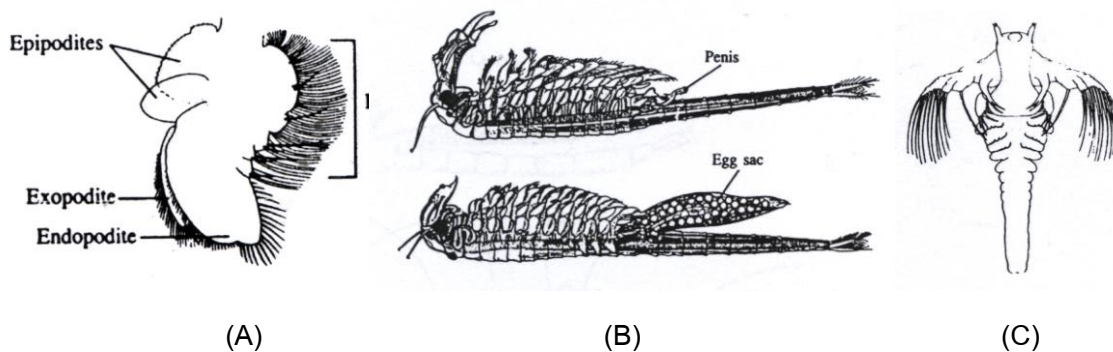
อะนอสตราแคนเป็นสัตว์น้ำจืดจำพวกครัสตาเซียน (crustacean) แต่ไม่มีคาราเพส (carapace) ตัวเรียวยาวมีประมาณ 20 ปล้องหรือมากกว่า ตามีก้านจัดเป็นสัตว์โบราณเนื่องจากมีปล้องและระยางค์ลำตัวที่เหมือนๆ กันมีระยางค์แบบฟิลโลพอดีย (phyllopodia) (ภาพประกอบ 1A) ซึ่งมีลักษณะพู่แบนคล้ายใบไม้ ทั้งเอ็กโซพอดิต์ (exopodite) และเอนโดพอดิต์ (endopodite) เป็นพู่เดี่ยวมีซีตัส (setae) เรียงอยู่ตามขอบ คอกซา (coxa) มีอีพิพอดิต์ (epipodite) ที่ทำหน้าที่เป็นเหงือก นอกจากหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแก๊สแล้ว ระยางค์ลำตัวยังมีการปรับตัวไปใช้ในการกินสารแขวนลอยจากการกรองน้ำ (filter feeder) และยังใช้ในการเคลื่อนที่โดยจะว่ายน้ำในลักษณะหงายท้องขึ้น แอนเทนนา (antennae) ที่ 1 สั้น และเรียวยาวไม่มีลักษณะเป็นข้อที่เด่นชัด แอนเทนนาที่ 2 ของตัวเมียเสื่อมไป แต่ในตัวผู้จะมีขนาดใหญ่ใช้จับตัวเมียในเวลาผสมพันธุ์ (ภาพประกอบ 1B) ปลายระยางค์ของแอนเทนนาที่ 2 ในตัวผู้บางชนิดเชื่อมติดกัน หรือบางชนิดมีแอนเทนนาที่แตกแขนงคล้ายเขากวาง (บพิธ จารุพันธุ์; และนันทพร จารุพันธุ์. 2546: 382)

การดำรงชีวิตของอะนอสตราแคนส่วนใหญ่อาศัยอยู่ตามบึง บ่อน้ำจืดชั่วคราวที่มีน้ำขังในช่วงฤดูฝนซึ่งจะแห้งลงในฤดูร้อน ก่อนที่น้ำแห้งจะผลิตไข่ที่มีเปลือกหนา (cysts) ทนต่อความแห้งและจะฟักออกเมื่อบ่อได้รับน้ำเข้ามาใหม่ (บพิธ จารุพันธุ์; และนันทพร จารุพันธุ์. 2546: 382)

อะนอสตราแคนเป็นสัตว์จำพวกกินสารแขวนลอย โดยระยางค์ในปล้องแต่ละปล้องทำงานประสานต่อเนื่องกัน จังหวะที่ระยางค์ตีถอยหลังกลับ (backward stroke) ระยางค์จะแผ่กว้างเพื่อเพิ่มแรงเสียดทานทำให้เกิดแรงขับสูง เมื่อระยางค์ตีกลับ (recover stroke) จะลู่เพื่อให้เกิดแรงเสียดทานน้อยที่สุด การตีระยางค์จนครบวงจรจะเกิดขึ้นประมาณ 100 ครั้งต่อนาที ระยางค์บางคู่อยู่ในระยะตีถอยหลังบางคู่อยู่ในระยะตีกลับ ขณะที่ระยางค์หนึ่งตีถอยหลังจะทำให้ช่องระหว่างระยางค์ที่ตีกลับหลังกับระยางค์ที่อยู่ในช่องถัดมาห่างมากขึ้นชั่วคราว เมื่อระยางค์ถัดไปตีเข้าใกล้ระยางค์แรกแล้วช่องห่างจะหายไปช่องว่างระหว่างระยางค์ (interlimb space) ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดแรงดูดและดูดน้ำออกจากช่องกลางท้อง (midventral food groove) ซึ่งเป็นน้ำที่มาจากด้านหน้าของลำตัว

เอนโดต์ที่ด้านในของระยางค์จะดันอาหารไว้ เมื่อระยางค์ในปล้องถัดไปเข้ามาใกล้ ระยางค์แรกจะบีบ น้ำให้ออกไปจากด้านข้างลำตัว สำหรับอาหารที่ตกไว้จะอยู่ในร่องกลางตัวที่ลึกลงไป (บพิท จารุพันธ์; และนันทพร จารุพันธ์. 2546: 384)

การสืบพันธุ์ของ อะนอสตราแคน ประกอบด้วย ระบบสืบพันธุ์เป็นคู่ แต่ท่อนำไข่ของตัวเมียจะรวมกันเป็น วาไจนา (vagina) จึงมีรูสืบพันธุ์เพียงรูเดียวบนปล้องที่ไม่มี ระยางค์ 2 ปล้องแรกซึ่งจะพองออก ส่วนที่พองออกรวมทั้งวาไจนาจะขยายใหญ่รวมเป็นถุงพัก (brood sac) รูสืบพันธุ์เพศผู้มี 2 รูอยู่บนพินิส (penis) เวลาจับคู่ตัวผู้ว่ายเข้าใต้ตัวเมียใช้แอนเทนนาที่ 2 จับตัวเมียแล้วบิดตัวให้พินิสอยู่ใกล้กับรูสืบพันธุ์ของเพศเมีย ไข่ที่ปฏิสนธิแล้วจะอยู่ในถุงพักไข่ นอกจากนี้ยังมี การสืบพันธุ์แบบพาร์ธีโนเจเนซิส (parthenogenesis) ไข่ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไข่จากพาร์ธีโนเจเนซิสจะมี พัฒนาการอยู่ในถุงพักไข่มี 2 แบบ คือ ไข่ผนังบางและไข่ผนังหนา ไข่ผนังบางจะฟักออกเป็นนอ เฟลีส (nauplius) ในทันทีที่ไข่ออกจากถุงพัก (ภาพประกอบ 1C) แต่ถ้าเป็นไข่ผนังหนากการฟักออกจากไข่จะยืดไปจนถึงฤดูฝนใหม่ นอเฟลีสจะมีตากลาง (median eye) ตัวอ่อนระยะแรกจะมีการลอกคราบ และพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะเป็นระยะอินสตาตาร์ต่อ ๆ ไป ซึ่งจะเริ่มกินอาหาร เจริญเติบโต และลอกคราบประมาณ 15 ครั้ง จนกลายเป็นตัวเต็มวัย (adult) เมื่อมีอายุ 8-9 วัน จะเจริญเติบโตมีไข่ และพัฒนาขยายพันธุ์ได้อีกทุก ๆ วัน การเจริญเติบโตจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงฤดูร้อน น แต่จะเจริญเติบโตได้ช้าเมื่อมีอุณหภูมิต่ำ (บพิท จารุพันธ์; และนันทพร จารุพันธ์. 2546: 374-378)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะทั่วไปของอะนอสตราแคน (A); แสดง ระยางค์แบบฟีลโล โฟเดีย (phyllopodia), (B); ลักษณะของไรน้ำนางฟ้า *Brachinecta paludosa* ตัวผู้ (บน) และตัวเมีย (ล่าง), (C); นอเฟลีสของ *Artemia*

ที่มา: บพิท จารุพันธ์; และนันทพร จารุพันธ์. 2546: หน้า 383

2. ความหลากหลายของไรน้ำนางฟ้าในประเทศไทย

ศาสตราจารย์ ดร.ละออศรี เสนาะเมือง และคณะนักวิจัย จากศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้พบไรน้ำนางฟ้าในประเทศไทย 3 ชนิด ซึ่งทั้งสามชนิดเป็นสปีชีส์ชนิดใหม่ของโลก และจัดเป็นสปีชีส์น้ำประจำถิ่นที่พบในประเทศไทยเท่านั้น ดังนี้

1. ไรน้ำนางฟ้าสิรินธร (*Streptocephalus sirindhornae*) มีลักษณะตัวใส หางแดง ตัวยาว 1.3-3.0 เซนติเมตร ตัวผู้มีหนวดยาว ตัวเมียมีถุงไข่ 1 ถุง อยู่บริเวณกลางตัวด้านท้อง (ภาพประกอบ 2A) ไข่กลมมีลวดลายคล้ายลูกเต๋าก้อน (ภาพประกอบ 3B) เป็นชนิดที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย ที่สำรวจพบแล้วในแหล่งน้ำจาก 39 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น อุดรธานี หนองบัวลำภู มหาสารคาม ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ ยโสธร อำนาจเจริญ อุบลราชธานี สุรินทร์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ชัยภูมิ นครราชสีมา มุกดาหาร นครพนม สกลนคร หนองคาย เลย เพชรบูรณ์ พิษณุโลก กำแพงเพชร พิจิตร สุโขทัย ตาก ลำปาง อุดรดิตถ์แพร่ เชียงราย น่าน สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เพชรบุรี ชัยนาท อุทัยธานี และประจวบคีรีขันธ์ (นุกุล แสงพันธ์ุ; โฆษิต ศรีภูธร; และละออศรี เสนาะเมือง. 2549: 3-4)

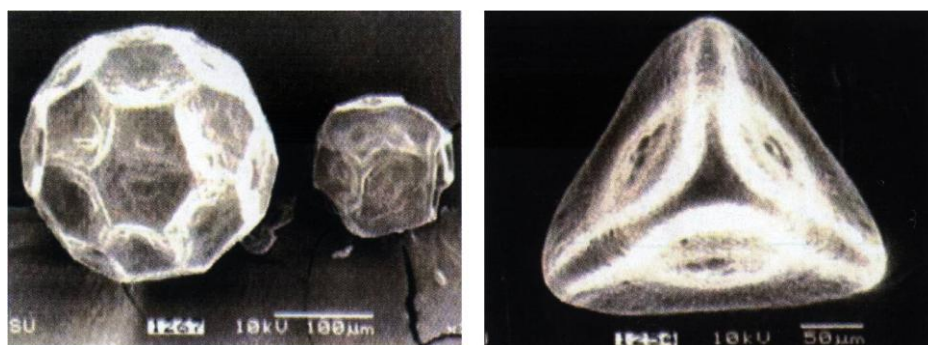
2. ไรน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) มีลักษณะตัวสีส้มแดงตลอดทั้งตัว (ภาพประกอบ 2B) ไข่เป็นรูปวงกลมคล้ายลูกเต๋าก้อน แต่มีขนาดใหญ่กว่าไรน้ำนางฟ้าสิรินธร (ภาพประกอบ 3A) ที่สำรวจพบแล้วอยู่ในเขต 14 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ นครราชสีมา ชัยภูมิ ลพบุรี ชัยนาท กาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี อุทัยธานี และอ่างทอง (นุกุล แสงพันธ์ุ; โฆษิต ศรีภูธร; และละออศรี เสนาะเมือง. 2549: 6-7)

3. ไรน้ำนางฟ้าสยาม (*Streptocephalus siamensis*) มีลักษณะตัวใส สีตัวบางครั้งเป็นสีฟ้าอ่อน หางสีแดง ตัวยาว 1.1-2.0 เซนติเมตร (ภาพประกอบ 2C) ตัวเมียมีไข่เป็นรูปสามเหลี่ยมคล้ายปิรามิด (tetrahedral eggs) (ภาพประกอบ 3C) เป็นชนิดที่หายากมาก ปัจจุบันพบที่จังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรีเท่านั้น (นุกุล แสงพันธ์ุ; โฆษิต ศรีภูธร; และละออศรี เสนาะเมือง. 2549: 8-9)



ภาพประกอบ 2 ไรน้ำนางฟ้าที่พบในประเทศไทย (A); ไรน้ำนางฟ้าสิรินธรเพศผู้ (บน) และเพศเมีย (ล่าง), (B); ไรน้ำนางฟ้าไทยเพศผู้ (บน) และเพศเมีย (ล่าง) และ (C); ไรน้ำนางฟ้าสยามเพศผู้ (บน) และเพศเมียสองตัว (ล่าง)

ที่มา: นุกุล แสงพันธุ์; โฆษิต ศรีภูธร; และละออศรี เสนาะเมือง. (2549). ไรน้ำนางฟ้า: จี๊วแต่แจ้ว. หน้า 4-8.



ภาพประกอบ 3 ไข่ของไรน้ำนางฟ้าที่พบในประเทศไทย (A); ไข่ไรน้ำนางฟ้าไทย, (B); ไข่ไรน้ำนางฟ้าสิรินธร และ (C); ไข่ไรน้ำนางฟ้าสยาม

ที่มา: นุกุล แสงพันธุ์; โฆษิต ศรีภูธร; และละออศรี เสนาะเมือง. (2549). ไรน้ำนางฟ้า: จี๊วแต่แจ้ว. หน้า 4-8.

3. ไรน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*)

เสนาะเมือง (Sanoamuang; et al. 2002: 63-69) ได้ทำการสำรวจพบไรน้ำนางฟ้าไทย (*B. thailandensis*) เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 โดยเป็นไรน้ำนางฟ้าชนิดใหม่ของประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับ ไรน้ำนางฟ้าที่เคยรายงานไว้ซึ่ง จัดอยู่ในจีนัส *Branchinella* แพมิลลี

Thamnocephalidae (Timms; & Geddes. 2003: 53-68) โดยสามารถสำรวจพบไรน้ำนางฟ้าไทยได้จากบริเวณหนองน้ำขังใน 11 จังหวัด ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย โดยพบร่วมกับไรน้ำนางฟ้าสิรินธร (*Streptocephalus sirindhornae*) (Sanoamuang; et al. 2000: abstract) จากการศึกษาพบว่าไรน้ำนางฟ้าไทยเป็นชนิดที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเป็นชนิดที่โตเร็วกว่าไรน้ำนางฟ้าชนิดอื่น โดยไรน้ำนางฟ้าไทยเพศเมียเริ่มมีไข่ในถุงไข่หน้าท้องเมื่ออายุ 9 วัน ไข่มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมสั้น ความถี่ในการวางไข่ คือ 1.08-1.25 วัน (เฉลี่ย 1.14 ± 0.04 วัน) ผลิตไข่ 11-16 ครอก (เฉลี่ย 14.20 ± 4.60 ครอก) จำนวนไข่ทั้งหมดเท่ากับ 3,681-8,981 ฟอง (เฉลี่ย $6,699 \pm 2,094$ ฟอง) มีช่วงชีวิต 21-29 วัน (เฉลี่ย 25.40 ± 9.03 วัน) สำหรับอาหารของไรน้ำนางฟ้าไทยเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว อินทรีย์วัตถุขนาดเล็ก รวมถึงแบคทีเรีย และเชื้อราที่อาศัยในน้ำจึงเป็นสัตว์เลี้ยงง่าย โตเร็ว ไม่ยุ่งยากในการดูแล ต้นทุนการเตรียมบ่อเพาะเลี้ยงไม่สูงมาก และสามารถเลี้ยงจนเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว สะดวกที่จะนำตัวเต็มวัยมาแช่แข็งส่งขายเป็นอาหารเลี้ยงปลาสวยงาม หรือปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม นอกจากนี้ไข่ไรน้ำนางฟ้าไทย ยังสามารถเก็บได้ในสภาพแห้งเป็นระยะเวลานานเหมาะที่จะนำไปเพาะ ฟักได้เอง หรือนำไปใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการเรียนการสอนได้อีกด้วย ส่วนตัวเต็มวัยของไรน้ำนางฟ้าไทยก็สามารถใช้เป็นสัตว์ทดลองในการทดสอบคุณสมบัติของสารพิษต่างๆ ได้ (นุกูล แสงพันธุ์; และราเมศ ชูสิงห์. 2549: 32-37)

ไรน้ำนาง ฟ้าไทยจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ทดแทนไรน้ำเค็มหรืออาร์ทีเมีย ในการอนุบาลสัตว์น้ำ วัยอ่อนจำพวกกุ้งปูปลา จากการศึกษาคุณค่าทางสารอาหารของไรน้ำนางฟ้า ไทย พบว่ามีคุณค่าทางอาหารสูงโดยไรน้ำนางฟ้า ไทยตัวเต็มวัยน้ำหนักแห้งมีโปรตีนเท่ากับ 64.94% (นุกูล แสงพันธุ์; และละออศรี เสนาะเมือง. 2547: 1-3) ซึ่งมากกว่าโปรตีนของ อาร์ทีเมียตัวเต็มวัยน้ำหนักแห้งซึ่งมีอยู่ 56.40% (อนันต์ ดันสุตะพานิช; และคนอื่น ๆ. 2536) ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 คุณค่าทางสารอาหารของไรน้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) และอาร์ทีเมีย (*Artemia*) (พุทธพรณี บุญมาก; นุกูล แสงพันธุ์; และละออศรี เสนาะเมือง. 2550: 125-131)

คุณค่าทางโภชนาการ (% / น้ำหนักแห้ง)	ไรน้ำนางฟ้าไทย	อาร์ทีเมีย
โปรตีน	64.94	56.40
ไขมัน	5.07	11.80
คาร์โบไฮเดรต	17.96	12.10
เถ้า	8.40	17.40

4. โรคจุดดำที่เกิดกับไร่น้ำนางฟ้า

โรคจุดดำ (Black disease) เป็นโรคที่เรียกตามลักษณะอาการที่พบเห็น คือ มีจุดหรือปมสีดำตามบริเวณลำตัว และส่วนต่างๆ ของร่างกาย เนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียแล้วทำให้เกิดการตอบสนองผ่านระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ (innate immunoresponse) โดยจะสร้างถุงหุ้ม (capsule) หรือปมปม (nodule) ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียไว้แล้วเกิดการสร้างสารสี (melanization) ผ่านกระบวนการ prophenoloxidase activating system (proPO system) ซึ่งจะพบได้ในกระบวนการตอบสนองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายกลุ่ม เช่น ascidians, mollusks, echinoderms, millipedes, bivalves, branchiopod และ insects (Jiravanichpaisal; et al. 2006: 225) และมีรายงานการพบโรคจุดดำในไร่น้ำเค็ม (*Artemia*) ครั้งแรกโดย Hernandorena ในปี ค.ศ.1987 ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการสำรวจพบปมปมสีดำในไร่น้ำนางฟ้าหลายๆ สปีชีส์ที่แตกต่างกันไปเป็นครั้งคราว ในบริเวณ แหล่งน้ำขัง ตามธรรมชาติ ในประเทศ สเปน อั ลจีเรีย และ เยอรมัน นี้ (Diercken; et al. 1998: 113) ในปัจจุบันมีการนำไร่น้ำนางฟ้าไทยมาเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ และเริ่มมีผู้ให้ความสนใจธุรกิจการเพาะเลี้ยง ไร่น้ำนางฟ้า ไทยเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าไทยยังมีปัญหาเกี่ยวกับโรคจุดดำ (Black disease) ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ลักษณะอาการที่พบ คือ มีลักษณะเป็นแผ่นหรือแถบสีดำเกิดขึ้นบริเวณขาว่ายน้ำ หวด และอาจลามไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกาย ไร่น้ำนางฟ้าไทยจะทยอยตาย ภายหลังจากแสดงอาการของโรคภายใน 1-5 วัน (หนูเดือน เมืองแสน; สุวรรณนา เนียมสนิท; และสุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์. 2549: 39-45) ปัญหาด้านสุขภาพของไร่น้ำนางฟ้าไทยย่อมส่งผลกระทบต่อปริมาณการผลิต และลดมูลค่าทางเศรษฐกิจของไร่น้ำนางฟ้าไทย จึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งในการหา สาเหตุ และแนวทางการป้องกันการเกิดโรคเพื่อนำไปสู่การปรับวิธีการเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

5. สาเหตุของโรคที่เกิดในไร่น้ำนางฟ้า

เดอริกเคน (Diercken; et al. 1998: 113-119) ได้ทำการศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 51 ไอโซเลตจากไร่น้ำนางฟ้าจำนวน 3 สปีชีส์ คือ *Branchipus schaefferi*, *Chirocephalus diaphanous* และ *Streptocephalus torvicornis* ที่เป็นโรคจุดดำจำนวน 116 ตัวอย่าง ซึ่งมีลักษณะอาการเป็นจุดดำบริเวณขาว่ายน้ำหวด และทางด้านหลังของส่วนหัว จากการศึกษาลักษณะของโรคจุดดำจาก *S. Torvicornis* เพศเมีย พบว่าบริเวณหลักที่มีการติดเชื้อ ได้แก่ บริเวณขาว่ายน้ำด้านหลังหัว และแอนเทนนาที่ 2 จากการศึกษาด้วยวิธี histological sections พบลักษณะของการเกิด melanization ทั่วไปในบริเวณที่มีการติดเชื้อ และพบแบคทีเรียลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ สีม่วงภายในแกรนูลอมา เมื่อนำบริเวณขาว่ายน้ำที่มีการติดเชื้อมาตรวจดูด้วย phase contrast microscope พบแบคทีเรียรูปร่างท่อน โดยเฉพาะในส่วนหางดำ หน้าของ endopodite, exopodite และ endite I ในขณะที่ไม่พบแบคทีเรียบริเวณขาว่ายน้ำของไร่น้ำนางฟ้าปกติ ในการศึกษาตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าที่เป็นโรคซึ่งเก็บจากแต่ละพื้นที่ พบว่าส่วนใหญ่แล้วปมปมสีดำจะพบที่บริเวณขาว่ายน้ำโดยไม่มีความ

แตกต่างกันอย่างสำคัญทั้งในขนาด และกลุ่มของไร่น้ำนางฟ้า ที่มีการติดเชื้อในแต่ละพื้นที่ โดยสามารถแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 *Acinetobacter* sp., กลุ่มที่ 3 *Comamonas testosteroni* และกลุ่มที่ 4 *Aeromonas* sp. ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย สมาชิกของแบคทีเรียภายในจีส *Psychrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Ralstonia* sp. และสามารถระบุชนิดของ *Aeromonas* sp. ได้ด้วย Biolog และ genotypic fingerprinting technique AFLP พบว่าเป็น *Aeromonas hydrophila* จากการศึกษาศักยภาพในการก่อโรคของแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี Koch's Postulates พบว่า *Aeromonas hydrophila* strain ANOS 2 ทำให้เกิดการตาย 58±1% ภายในระยะเวลา 5 วัน ในขณะที่ *Comamonas testosteroni* ANOS 1 มีอัตราการตาย 32±9%, *Acinetobacter* strains ANOS 9 และ ANOS 10 ไม่มีผลชัดเจน (อัตราการตาย 0–5%) ส่วน *Flavobacterium* strain ANOS 13 และ *Pseudomonas* strain ANOS 15 ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตาย

หนูเดือน เมืองแสน , สุวรรณ เนียมสนธิ และสุศักดิ์ ศิริพร รุดลิลปี (2549: 39-45) ได้แยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากไร่น้ำนางฟ้าไทย (*B. thailandensis*) ที่เป็นโรคจุดดำ ซึ่งมีลักษณะเป็นปมสีดำตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ขาว่ายน้ำ หวด หาง โดยเก็บตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยที่เป็นโรคจากโรงเพาะเลี้ยงภาควิชา ชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่นจำนวน 10 ตัว ตัดเอาส่วนที่เป็นจุดดำมาแยกเชื้อ แล้วย้อมสีแกรมศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ ความสามารถในการใช้แลคโตส การทดสอบออกซิเดส (oxidase test) การทดสอบคะตะเลส (catalase) การทดสอบการเคลื่อนที่ (motility) การทดสอบการเจริญบน triplesugar iron (TSI) agar และการทดสอบ oxidation-fermentation glucose (O/F) ร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ API20E Kit และ API20NE Kit จากการทดลองพบแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันหลายแบบ อย่างไรก็ตามพบแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนกันที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 25 ไอโซเลตสามารถแยกแบคทีเรียออกเป็น 4 กลุ่มหลัก คือ *Aeromonas* spp. (10 ไอโซเลต), *Klebsiella pneumoniae* (6 ไอโซเลต), *Enterobacter* spp. (7 ไอโซเลต) และ *Chryseobacterium* spp. (2 ไอโซเลต) ที่อาจเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคจุดดำ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Diercken และคนอื่นๆ ในปี ค.ศ.1998 ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความหลากหลายที่อาจเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคจุดดำในไร่น้ำจืดจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

หนูเดือน เมืองแสน และจิตติพร สุวรรณาลัย (2551: 59-66) ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rRNA ในการระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทย และทำการวิเคราะห์ร่วมกับฐานข้อมูลทางชีวภาพ BIBI (BioInformatic Bacteria Identification) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor joining method ทำให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต คิดเป็น 100% โดยทั้ง 9 ไอโซเลต เป็นสมาชิกภายในสปีชีส์ของ *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Empedobacter*

brevis ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ (หนูเดือน เมืองแสน; สุวรรณ เนียมสนิท; และสุรศักดิ์ ศิริพรตุลศิลป์. 2549: 39-45) ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ที่พบว่าเป็น *E. brevis* ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้จากการทดสอบทางชีวเคมีที่เคยพบว่าอยู่ในกลุ่ม *Chryseobacterium* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีความใกล้เคียงกันมาก และเคยถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันมาก่อน และยังพบว่าผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัย ของ Diercken ในปี ค.ศ. 1998 นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิ และค่า pH ของการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส และที่ pH 6.0-9.0 ยกเว้นเชื้อ *E. brevis* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และที่ pH 6.0-7.0 จะเห็นได้ว่าเชื้อที่แยกได้จากไร่นางฟ้าไทยส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ และค่า pH ที่ค่อนข้างกว้าง โดยสมาชิกในกลุ่มของ *A. hydrophila*, *E. cloacae* และ *K. pneumoniae* มีรูปแบบการเจริญคล้ายกันสามารถเจริญได้ตลอดทั้งปี และทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะ ความเป็นกรดต่างได้ดีซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการก่อโรคจุดดำได้

ภูริวิโรจน์กุล (Purivirojkul; & Khidprasert. 2009: 185-190) ได้ศึกษาลักษณะของโรคที่มีสาเหตุจาก *microsporidia* ในกล้ามเนื้อของไร่นางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) โดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) พบว่าลักษณะอาการของโรค microsporidiosis ในไร่นางฟ้าไทย แสดงลักษณะขุนขาวจำนวนมากภายใน tubular ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ โดยไม่แสดงการเกิด encapsulation หรือ xenoma formation ภายในเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) การสร้างสปอร์ของ พาราไซต์เป็นแบบ uninucleate มีความยาวประมาณ 2.829-3.269 (3.086) ไมโครเมตร กว้างประมาณ 1.686-2.857 (1.850) ไมโครเมตร ประกอบด้วย polar filament จำนวน 12-13 วง มีการจัดเรียงเป็นแถวเดียวอยู่ทางปลายด้านหลังของสปอร์ จากการวิเคราะห์ลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏ (gross sign), สัณฐานวิทยา (morphology), ลักษณะการเกิดโรคในเนื้อเยื่อ (histopathology) และลักษณะด้วยกล้อง TEM พบว่าเป็นพาราไซต์ชนิด *Pleistophora* sp. แม้ว่าโรคนี้จะไม่ก่อโรคแบบเฉียบพลันแต่ไร่นางฟ้า ไทยจะมีการทยอยตายอย่างต่อเนื่อง บ่อยครั้งพบว่าจะมีการติดเชื้อแบคทีเรียในภายหลัง (secondary bacterial infection) ทำให้ไร่นางฟ้าไทยเป็นโรคและตายภายใน 1-5 วัน หลังจากติดเชื้อแบคทีเรีย การเกิดโรค microsporidiosis มีผลกระทบต่อความสามารถในเพาะเลี้ยงไร่นางฟ้าไทยในปริมาณสูง ดังนั้นการจัดการกับน้ำโดยใช้ยาฆ่าเชื้อจึงเป็นวิธีการป้องกันน้ำที่อาจจะมีการปนเปื้อน microspore ได้ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการ เกิดอาการ จุดดำเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำ ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันของแต่ละแหล่ง ที่เก็บตัวอย่างน้ำจืด แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มของ *Aeromonas* spp. น่าจะเป็นสาเหตุหลักที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคจุดดำ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะ *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่สามารถแยกได้ทุกครั้งที่มีการศึกษาและมีความเกี่ยวข้อง

กับการก่อโรคในปลา สัตว์เลี้ยงคละน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย รวมทั้งในมนุษย์ เป็นต้น

6. ลักษณะของ *Aeromonas* spp.

Aeromonas เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้น (ขนาด 0.5x1.0 ไมครอน) ไม่สร้างสปอร์ อยู่ได้ในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟล็กเจลลา (polar flagella) ทนต่อ vibriostatic agent 0/129 และไม่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต เดิมจัดในสกุล *Vibrio* อยู่ในแฟมิลี Vibrionaceae ร่วมกับสกุล *Vibrio*, *Photobacterium* และ *Plesiomonas* (Abbott; Cheung; & Janda. 2003: 2348) ต่อมาได้มีการแยกออกเป็นแฟมิลี Aeromonadaceae (Colwell; MacDonell; & De Ley. 1986: 473-477) เนื่องจากมีคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีหลายอย่างคล้ายกับกลุ่มของ Enterobacteriaceae ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ โดย *Aeromonas* จะให้ผล oxidase เป็นบวก (Baron; & Finegold. 1990: 437) มีแหล่งอาศัยอยู่อย่างอิสระในน้ำจืด หรือน้ำกร่อย บางครั้งพบในสัตว์เลี้ยงคละน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลา และพบได้ในดินและอาหาร (Janda; & Abbott. 1998: 332)

ภายในสกุล *Aeromonas* สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะ phenotype ที่แตกต่างกันโดยกลุ่มที่ 1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic) ตั้งแต่ 22-28 องศาเซลเซียส ไม่เคลื่อนที่ได้แก่ *A. salmonicida* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในปลา แต่ยังไม่พบว่ามีความเกี่ยวข้องต่อการก่อโรคในคน กลุ่มที่ 2 สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส (mesophilic) มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อโรคต่างๆ ในมนุษย์ และเป็นสาเหตุหลักของการก่อโรคในปลา ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. sobria* (Janda; & Abbott. 1998: 332-333) สามารถจำแนกชนิดของทั้งสามสปีชีส์ด้วยสมบัติทางชีวเคมีที่ต่างกัน ดังตาราง 2 ในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกกลุ่มภายในสกุล *Aeromonas* โดยใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization ร่วมกับวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลอื่นๆ และการปรับปรุงแบบแผนการทดสอบทางด้าน phenotype ทำให้สามารถแยกออกเป็น 17 hybridization groups (HG) หรือ genospecies และ 14 phenospecies ดังตาราง 3 (Janda. 1991: 398; Janda; & Abbott. 1998: 334; Kozin'ska; et al. 2002: 1034-1035; Ghenghesh; et al. 2008: 81-82)

ตาราง 2 สมบัติทางชีวเคมีของ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* (Starr; et al. 1981: 1293)

สมบัติ	<i>A. hydrophila</i> (200) ⁿ	<i>A. sobria</i> (40) ⁿ	<i>A. caviae</i> (86) ⁿ
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Indole	+	+	+
Methyl red (35°C)	d	d	+
Voger-Proskauer (25°C)	d	d	-
Citrate (Simmons')	d	d	d
Citrate (K-P)	-	-	+
Nitrate to Nitrite	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Urease (Christensen)	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Phenylalanine deaminase	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Arginine dihydrolase	d	d	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-
KCN	+	-	+
Malonate	-	-	-
D-Tartrate	-	-	-
Mucate	-	-	-
Lipase (Tween 80)	+	+	-
DNase	+	+	+
Gas from glucose	+	+	-

หมายเหตุ n คือ จำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ; + คือผลบวก 90% หรือมากกว่าภายใน 1-2 วัน;
- คือผลลบ 90% หรือมากกว่า; d คือผลบวก 11-89%

ตาราง 2 (ต่อ)

สมบัติ	<i>A. hydrophila</i> (200) ⁿ	<i>A. sobria</i> (40) ⁿ	<i>A. caviae</i> (86) ⁿ
Acid from carbohydrate:			
Arabinose	d	d	d
Cellobiose	d	d	d
Maltose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	d	+	+
Trehalose	+	+	+
Xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Erythritol	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	d	-	-
Salicin	d	-	+
Arbutin	+	-	+
Inositol	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	-	+
ONPG	+	+	+
Motility	+	+	+
G+C content (mol%)	61-63	57-60	61-62

หมายเหตุ n คือ จำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ; + คือผลบวก 90% หรือมากกว่าภายใน 1-2 วัน;
- คือผลลบ 90% หรือมากกว่า; d คือผลบวก 11-89%

ตาราง 3 การจัดจำแนกกลุ่มภายในจีโนสปีส์ *Aeromonas* โดยวิธี Hybridization groups genospecies และ phenospecies (Ghenghesh; et al. 2008: 82)

HG ^a	Genospecies	Phenospecies	แหล่งแยก ^b		
			ตัวอย่างทาง การแพทย์	อาหาร	น้ำ
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	C	C	C
2	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i> -like	NR	R	NR
3	<i>A. salmonicida</i> *	<i>A. salmonicida</i> *	R	C	R
3	Unnamed	<i>A. hydrophila</i> -like	NR	NR	NR
4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	C	C	C
5A	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i> -like	NR	NR	NR
5B	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>	R	R	R
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>	NR	R	R
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	NR	R	NR
8X	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>	NR	NR	NR
8Y	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> bt <i>sobria</i>	C	C	C
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>	R	NR	R
10	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> bt <i>veronii</i>	R	R	NR
11	Unnamed	<i>Aeromonas</i> sp.	NR	NR	NR
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>	R	NR	NR
13	Unnamed	<i>A. schubertii</i> -like	NR	NR	NR
14	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>	R	R	R
15	<i>A. allosaccharophila</i>		NR	NR	NR
16	<i>A. encheleia</i>		NR	R	NR
17	<i>A. popoffii</i>		NR	NR	NR

^aHG= Hybridization groups, ^bC=พบทั่วไป; common, R=พบน้อย; rare, และ NR=ไม่พบรายงาน; not reported. * ไม่เคลื่อนที่; ส่วนใหญ่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6.1 การแพร่ระบาดและการก่อโรค (epidemiology and pathogenesis)

Mesophilic aeromonads เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบ และแยกได้จากผู้ป่วยโรคท้องร่วง และมีความเกี่ยวข้องในการติดเชื้อของบาดแผล เยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis), เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อนัยน์ตาข้อต่อ และกระดูก เป็นต้น (Abbot; Cheung; & Janda. 2003: 2348) ปัจจุบันได้มีการสำรวจการแพร่ระบาดและการจัดกลุ่ม *Aeromonas* spp. ทางด้านพันธุกรรมด้วยวิธี Hybridization groups (HGs) ของตัวอย่างส่วนใหญ่ที่แยกได้จากอุจจาระในหลายๆ พื้นที่ จากหลักฐานการสำรวจทั้งหมด 270 สายพันธุ์ (strains) พบว่ามี 85% จากตัวอย่างที่แยกได้จากคนที่ติดเชื้อ *Aeromonas* ในกลุ่มของ HGs 1 (*A. hydrophila*), 4 (*A. caviae*), และ 8 (*A. veronii* biotype *sobria*) ซึ่งนับว่าเป็น *Aeromonas* sp. ที่เกี่ยวกับการก่อโรคท้องร่วง (Janda. 1991: 400-401) โดยส่วนใหญ่มักจะพบในผู้ป่วยเด็ก (6 เดือนถึง 5 ปี) และในผู้ป่วยสูงอายุ (≥ 50) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Austin & Austin (1989: 277 – 290) ที่แสดงให้เห็นว่า *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. sobria* เป็นสปีชีส์ที่พบมากที่สุดที่แยกได้ในจำนวนตัวอย่างทาง การแพทย์ และเป็นชนิดที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในปลา

ปาเนียกัว (Paniagua; et al. 1990: 350-355) ได้ทำการเก็บรวบรวม *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากแม่น้ำพอร์มา (Porma) ประเทศสเปน พบว่าสามารถจัดกลุ่มที่แยกได้ทั้งหมดสามสปีชีส์คือ *A. hydrophila* (74 ไอโซเลต), *A. sobria* (11 ไอโซเลต) และ *A. caviae* (12 ไอโซเลต) และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบ *A. hydrophila* และ *A. sobria* 72.02 และ 63% ตามลำดับ สามารถทำให้เกิดโรคในปลาได้โดยการทดสอบฉีดใต้กล้ามเนื้อ (intramuscular challenge) แต่ไอโซเลต *A. caviae* ทั้งหมดไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ ภายในกลุ่ม motile aeromonad มีสภาวะการก่อโรคซับซ้อนที่เป็นสาเหตุให้เกิดอาการต่างๆ ในปลา เช่น แผลเน่าเปื่อยบริเวณผิวหนัง ครีบ หาง หรือดวงตา erythrodermatitis, hemorrhagic septicemia, red sore disease, red rot disease และ scale protrusion disease เป็นต้น

โรค motile aeromonas disease เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทุกประเทศที่มีการเลี้ยงปลา และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบาดในปลา รวมทั้งสัตว์เลือดเย็นอื่นๆ หลายชนิด ความรุนแรงของเชื้อจะแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่ซึ่งมีเชื้อพ้องอีกหลายชื่อ โดยเรียกตามอาการของปลา หรือสัตว์ที่ป่วย ได้แก่ โรค hemorrhagic septicemia ทำให้ปลาป่วยมีอาการตกเลือดเกิดกับปลาเขตร้อนทั่วไป เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*), โรค red sore disease ในปลา Pike (*Esok lucius*), โรค red mouth disease ในปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*), โรค bacterial septicemia เป็นลักษณะอาการที่มีเชื้อแบคทีเรียแพร่ไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ตามกระแสเลือด, red pest บริเวณด้านท้องปลามักมีสีแดงและเลือดคั่ง (dermal hyperemia), โรค fresh water eel disease พบในปลาไหลมีการตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ (petchial hemorrhagic) บริเวณท้อง และโรค red-leg disease ในกบ (ชโล ลัมสุวรรณ. 2528: 28-35)

เนลเซน (Nielsen; et al. 2001: 23–29) ได้ทำการศึกษาความสำคัญของ *A. hydrophila* ถึงความเกี่ยวเนื่องกับการแพร่กระจายของโรค ที่มีการสำรวจในโรงงานการผลิตและเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในมณฑลจีเจียง (Zhejiang) ประเทศจีน โดยทำการทดลองแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างปลา 88 ไอโซเลตและปู 7 ไอโซเลต จากการทดสอบด้วยวิธี PCR ต่อยีน 16s rRNA และสมบัติทางชีวเคมี จากทั้งหมด 69 motile aeromonad พบว่ามี 35 ไอโซเลต ที่มีสมบัติทางชีวเคมีเป็น *A. hydrophila* แต่อย่างไรก็ตามมีเพียง 29 ไอโซเลต ที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี PCR พบว่าเป็น *A. hydrophila* จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่ามีไอโซเลตของ motile aeromonad ประมาณ 42% เป็น *A. hydrophila* ที่แยกได้จากแหล่งที่มีการแพร่ระบาดของโรคในปลาหลายๆ สปีชีส์ และไม่พบ *A. hydrophila* จากปูทั้ง 7 ตัวอย่าง ในขณะที่ *A. hydrophila* มีผลต่อการเกิดโรคใน large mouth buffalo และ rice eels ได้น้อยเท่ากับ 6 และ 14% ตามลำดับ แต่เป็นข้อมูลที่น่าสนใจว่าสามารถแยก *A. hydrophila* ได้มากกว่า 50% จาก Aeromonad ทั้งหมดที่แยกได้จาก crucian carp (*Carassius carassius*) (53%) และ Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) (58%) ซึ่งเป็นโรค haemorrhagic septicaemia อย่างไรก็ตาม *A. hydrophila* ที่แยกได้ มีความสอดคล้องกับการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีและทางเซรุ่มวิทยา ซึ่งแสดง serotypes หลักที่สำคัญ 2 serotypes (O9 และ O97) จาก *A. hydrophila* ไอโซเลตทั้งหมด ถึงแม้ว่าในการศึกษาพบว่า *A. hydrophila* เป็นสปีชีส์ที่แยกได้บ่อยมากที่สุดจากอวัยวะภายในของปลาและปูที่เป็นโรค แต่ก็พบ motile *Aeromonas* spp. อื่นๆ อีกด้วยวิธีการตรวจสอบด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่จะช่วยป้องกันความผิดพลาดในการระบุ *A. hydrophila* ซึ่งอาจจะพบได้เมื่อใช้การทดสอบคุณสมบัติที่แสดงออกเพียงอย่างเดียว

จิระวานิชไพศาล (Jiravanichpaisal; et al. 2009: 1-11) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ *A. hydrophila* ใน crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) โดยทำการแยกแบคทีเรียจาก hemolymph และ hepatopancrease ของ crayfish พบว่า *A. hydrophila* และเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้โดยสามารถทำให้เกิดการตาย 100% ภายใน 6 ชั่วโมง เมื่อฉีดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.24×10^7 CFU/มิลลิลิตร จากการศึกษาลักษณะการก่อโรคทางเนื้อเยื่อวิทยาของ crayfish ที่ใกล้ตายแสดงการแตกของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือด (pyknotic nuclei) และการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเม็ดเลือดในบริเวณเนื้อเยื่อรวมทั้งบริเวณเหงือกหัวใจตับ และระบบไหลเวียนเลือด (circulatory system) จากนั้นทำการศึกษาความไวต่อ extracellular product (ECPs) ที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* โดยศึกษาทั้งแบบ *in vivo* และ *in vitro* จากการศึกษาพบว่า ECPs (200 ไมโครลิตร) สามารถทำให้ crayfish ตายได้ด้วยการฉีด และแบบ *in vitro* พบว่า ECPs สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด cytotoxicity ของเม็ดเลือดแดง คือ hematopoietic cell (hpt) ในปริมาณ และเวลาที่เป็นอิสระต่อกัน ภายในเวลา 30 นาที หลังจากการใส่ ECPs โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ hpt cell ซึ่งเกิด cytoplasmic vacuolization และต่อมาจะมีการแตกของเซลล์แบบ pyknotic nuclei นอกจากนี้ได้ทำการตรวจพบ endotoxin gene ได้แก่

hly A gene และ β -hemolysin gene จากไอโซเลต *A. hydrophila* ที่แยกได้จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า endotoxins ที่สร้างโดยแบคทีเรียเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของ crayfish

นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความสามารถในการติดเชื้อของ *A. hydrophila* ต่อ crayfish โดยอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ทำให้ crayfish รอดชีวิต ในขณะที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ *A. hydrophila* ไม่สามารถก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนหรือ มีการเพิ่มจำนวนในระดับที่ต่ำมาก จึงอาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของ crayfish มีผลตอบสนองต่อ *A. hydrophila* ที่มีจำนวนน้อยได้ดี

6.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค (virulence factor)

6.2.1 พิลไล (pili)

หน้าที่ของพิไล ช่วยให้เกาะกับพื้นผิววัสดุ หรือผิวเนื้อเยื่อของอวัยวะที่แบคทีเรียเข้าสู่ร่างกาย (Capitani G.; et al. 2006: 2284-2290) โดยใน *Aeromonas* พบว่าสามารถแบ่งชนิดของพิไลออกเป็น 2 ชนิด ตามโครงสร้างจากการศึกษาด้วย transmission electron microscopy; TEM) ชนิดแรก คือ พิลไลที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (Straight Pilus) มีความยาวตั้งแต่ 0.6 ถึง 2.0 ไมโครเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17 ถึง 18 กิโลดาลตัน เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 9 นาโนเมตร และไม่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (inherent heagglutination capability) (Carrello; et al. 1988: 19-27; Honma; & Nakasone. 1990: 83-98) ชนิดที่สองมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง (Flexible Pilus) มีลักษณะยืดหยุ่นเป็นคลื่น และคล้ายขดลวดเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 7 นาโนเมตร หรือมีอีกชื่อหนึ่ง คือ mini pilin เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก (4 กิโลดาลตัน) มีกรดอะมิโนจำนวน 46 ตัว และไม่ตรงกับลำดับกรดอะมิโนของพิไลที่เคยรายงานไว้ การแสดงออกของ mini pilin ที่มีการควบคุมการแสดงออกโดยสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะมีการแสดงออกมากที่สุดที่ 22 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและภายใต้สภาวะที่มีเหล็กลดลงในขณะที่ Straight Pilus มีการแสดงออกตลอดเวลาในทุกสภาวะ (Ho; et al. 1990: 795-806)

6.2.2 ฮีโมไลซิน (hemolysin)

ฮีโมไลซินมีคุณสมบัติในการทำลายเม็ดเลือดแดง โดยการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ (pore forming) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออกของเซลล์ และทำให้เกิดการสูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์ เกิดการแตกออกของเซลล์และตายในที่สุด (Bhakdi; & Trantum-Jensen. 1988: 1-43) จากการศึกษากการแสดงออกของฮีโมไลซินของ *Aeromonas* spp. พบว่าสามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นชนิดที่มีการสร้างแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (cytolytic toxins) เดิมเรียก aerolysin มีน้ำหนักขนาด 52 กิโลดาลตัน ถูกสังเคราะห์ออกมาในรูปของสารตั้งต้น โปรตีนที่สังเคราะห์ภายในเซลล์เรียกว่า preproaerolysin ซึ่งประกอบด้วย signal sequence เป็นกรดอะมิโน 23 ตัวทางปลาย N ซึ่งจะมีการตัดออกเมื่อผ่านออกจาก cytoplasmic membrane

และยังคงอยู่ในรูปของ inactive proaerolysin ในบริเวณ periplasm เมื่อมีการหลั่งออกจากเซลล์จะถูกทำให้อยู่ในรูป active โดยตัดกรดอะมิโน 25 ตัวทางปลาย C ทั้ง proaerolysin และ aerolysin สามารถจับกับ glycophorin receptor บนเมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดแดง อย่างไรก็ตามมีเพียง aerolysin ที่สามารถ oligomerize ทำให้เกิดช่องบนเมมเบรน และทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ (Howard; et al. 1987: 2869-2871; Pemberton; Kidd; & Schmidt. 1997: 5-6) ฮีโมไลซินชนิดที่สองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน blood-agar medium ใน *Aeromonas* spp. ประกอบด้วย alpha (α) และ beta (β)-hemolysins โดย β -hemolysins ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออกอย่างสมบูรณ์ซึ่งจะเกิดวงใส (clear zone) รอบๆ โคโลนีของเชื้อบน blood agar medium β -hemolysins เป็นฮีโมไลซินชนิดที่ไม่ทนร้อน (heat labile hemolysin) ที่ความร้อน 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที มีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีน 49 ถึง 53 กิโลดาลตัน (Asao; et al. 1984: 122-127; Bernheimer; & Avigad. 1974: 1016-1021; Bloch; & Monteil. 1989: 1279-1287) α -hemolysin จะทำให้เกิดการแตกออกของเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์เป็นวงทึบแสงสีเขียวบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อบนอาหารมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีน 65 กิโลดาลตัน และค่า pI เท่ากับ 4.8 (Ljungh; Wretling; & Mollby. 1981: 387-397) จากการศึกษาผลของฮีโมไลซินทั้งสองชนิด (α และ β -hemolysin) ของ *A. hydrophila* ต่อ human lung fibroblast พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆ ที่แตกต่างกันโดย α -hemolysin ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์เป็นรูปทรงกลมทำให้เกิดความเสียหายต่อเมมเบรนเป็นหลุมขนาดใหญ่ การตอบสนองของเซลล์ต่อ α -hemolysin สามารถผันกลับได้ในขณะที่ β -hemolysin ทำให้เกิด vacuolization ของ cytoplasm ภายในเซลล์ซึ่งยังคงมีการแผ่ขยายออกมาบนบริเวณที่เจริญ มีการจับอย่างรวดเร็วและแน่นหนาโดย β -hemolysins ในปริมาณเพียงเล็กน้อยจะทำให้เซลล์มีการตอบสนองภายใน 1 นาทีและทำให้เซลล์เกิดการตายภายใน 1 ถึง 2 ชั่วโมง ถัดมา (Thelestam; & Ljungh. 1981: 949-956)

6.2.3 โปรตีเอส (protease)

โปรตีเอสมีผลทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อโดยตรง ช่วยเพิ่มความสามารถในการบุกรุกหรืออาจมีผลต่อการช่วยตัดสายเปปไทด์ (proteolytic activation) ของ aerolysin toxin precursor ของ *A. hydrophila* (Howard; & Buckley. 1985: 336-340) โปรตีเอสที่แยกได้จาก *A. hydrophila* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ โปรตีเอสที่ทนร้อน (heat stable protease) หรือ thermostable metalloprotease (TSMP) ซึ่งสามารถหยุดการกระตุ้นได้โดย EDTA ชนิดที่ 2 คือ โปรตีเอสที่ไม่ทนร้อน (heat labile protease) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หรือจัดอยู่ในกลุ่มของ thermolabile serine protease (TLSP) (Leung; & Stevenson. 1988: 151-160)

6.3 การรักษาโรค

Aeromonas spp. เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างทางการแพทย์เป็นส่วนใหญ่ และแยกได้จากแหล่งอาหาร และน้ำเป็นส่วนน้อย ซึ่งวิธีส่วนใหญ่ที่ง่ายที่สุดในการรักษามักจะเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ แต่พบว่ามักจะเกิดอัตราการต้านยาของ *Aeromonad* ที่หลากหลายกันไป ตามแต่ชนิดของยาปฏิชีวนะซึ่งจะเกี่ยวข้องกับแหล่งที่แยก *Aeromonas* spp. ได้ และส่งผลให้มีการเลือกใช้ยาที่แตกต่างกันไปตามบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ *Aeromonas* sp. (Ghenghesh; et al. 2008: 81-98) โดยส่วนใหญ่ *Aeromonad* จะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ tetracyclines, aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole, cephalosporins และ quinolones (Janda; & Abbott. 1998: 341) และจากการศึกษาการทนต่อยาของ motile aeromonads พบกลุ่มหลักคือ *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. sobria* ที่แยกได้จากลำไส้ของปลาน้ำจืด ได้แก่ *Catla catla*, *Labeo rohita* และ *Ctenopharyngodon idella* พบว่ามีรูปแบบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ oxytetracycline, amoxycillin, ampicillin, novobiocin และ polymyxin-B (Hatha; et al. 2005: 131-134) จากการศึกษาความไว และการต้านทานของเชื้อต่อยาชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้ให้ถูกต้องเหมาะสม และถูกวิธี ทั้งในด้านการรักษาทางการแพทย์หรือการนำไปใช้ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นต้น

6.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp.

การศึกษาด้วยลักษณะและสมบัติทางชีวเคมี

เอบบอร์ท (Abbott; Cheung; & Janda. 2003) ได้นำเชื้อ 193 ไอโซเลต ที่จัดได้ทั้งหมด 14 กลุ่มที่แตกต่างกันในระดับ *Aeromonas* genomospecies มาทำการศึกษาและพัฒนาแนวทางการระบุเชื้อภายในกลุ่ม mesophilic aeromonad ที่แตกต่างกันด้วยสมบัติทางชีวเคมี 63 ประการ พบว่าการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีเพียง 9 รายการ ที่แสดงรูปแบบเดียวกันจากทั้งหมด 63 รายการ คิดเป็นร้อยละ 14 จากทั้งหมด และผลจากการหมักคาร์โบไฮเดรตแสดงให้เห็นว่ามีความเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์ในกลุ่มที่ไม่ปกติหรือแสดงคุณสมบัติผิดปกติไปภายในกลุ่ม *Aeromonas* sp. สามารถตรวจพบได้จากผลการเก็บรวบรวมข้อมูลของเชื้อทั้งหมด 428 ไอโซเลต (193 ไอโซเลต ในการศึกษาและอีก 235 ไอโซเลต จากการศึกษาก่อนหน้านี้) ในการทดสอบนี้ได้รวมถึงการทดสอบความไวต่อ vibriostatic agent การหมัก *m*-inositol, D-xylose, การย่อยสลายยูเรีย (urea) และคุณสมบัติของ cytochrome oxidase activity จากการศึกษาพบว่า การหมัก melibiose มีความเกี่ยวข้องกับการหมัก raffinose ภายใน *Aeromonas* spp. ยกเว้น *A. jandaei* จากการศึกษาที่ได้จึงมีความสำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไป โดยสามารถระบุชนิดของ aeromonad ได้ในระดับสปีชีส์ ขึ้นอยู่กับการทดสอบ Møller decarboxylase และ dihydrolase reaction ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าสามารถใช้

คุณสมบัติใหม่ที่ได้ในการทดสอบ ในการระบุและช่วยแยกสมาชิกภายในกลุ่มของ *A. caviae* complex (*A. caviae*, *A. media* และ *A. eucreonophila*)

การศึกษาด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา

บอเรล (Borrell; et al. 1997: 1671-1674) ได้พัฒนาวิธีการระบุเชื้อแบคทีเรียภายในกลุ่มของ *Aeromonas* spp. ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาสั้นเหมาะแก่การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก และไม่จำเป็นต้องมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยทำการศึกษารูปแบบของชิ้น DNA ที่ถูกตัด (DNA fingerprints) จากยีน 16S rRNA ในการระบุสปีชีส์ของ *Aeromonas* ที่เคยรายงานไว้ (DNA homology group) รวมทั้งเชื้อที่ทดสอบด้วยสมบัติทางชีวเคมีอีก 76 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างทางการแพทย์จากแหล่งต่างๆ กันด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease enzyme) คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *MboI* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ภายในกลุ่ม *Aeromonas* สปีชีส์ และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NarI* และ *HaeIII* มาใช้ในการแยก *A. salmonicida*, *A. eucyanea* และ *Aeromonas* spp. (HG11) ออกจากกันจากผลการศึกษาแสดง DNA fingerprints ที่มีรูปแบบจำเพาะในการแยกแต่ละ สปีชีส์ได้ในระดับ Phylogenetic species (ชิ้น DNA มีขนาดตั้งแต่ 33 ถึง 346 คู่เบส) นำเชื้อทั้ง 76 ไอโซเลต ที่ทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมีก่อนหน้านี้มาวิเคราะห์ต่อ ด้วยวิธี RFLP ของผลผลิตยีน 16S rRNA ที่เพิ่มผลผลิตด้วยวิธี PCR กับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกไว้พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน

ยานเนส (Yáñez; et al. 2003: 875-883) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจีโนม *Aeromonas* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *gyrB* ซึ่งก่อนหน้านี้เกือบทุกสปีชีส์ภายในจีโนมมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA พบว่าเกี่ยวเนื่องและสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย DNA-DNA hybridization วิธีการศึกษาด้วย DNA probe และ RFLP profile ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ได้นำมาใช้ศึกษาในการระบุ *Aeromonas* ในระดับสปีชีส์ อย่างไรก็ตามพบว่ายังคงมีความขัดแย้ง ระหว่าง กลุ่มต่างๆ เมื่อเทียบกับข้อมูล ของ DNA-DNA hybridization และ นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีความอนุรักษ์สูง (highly conserved) ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนภายในกลุ่ม *Aeromonas* จึงนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrB* ซึ่งถอดรหัสได้เป็น B-subunit ของ DNA gyrase มีบทบาทในกระบวนการเกิด DNA replication โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเกิด synonymous substitution rate มากกว่า 16S rDNA ถึง 4 เท่า จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ เป็นเครื่องมือศึกษาความสัมพันธ์ วิวัฒนาการภายในกลุ่ม *Aeromonas* จากการศึกษา phylogenetic location ของ *Aeromonas* ทั้งหมด 53 สปีชีส์ พบว่าสามารถจัดเอาแฟมิลี Aeromonadaceae แยกออกจาก *Plesiomonas shigelloides* และ enteric bacteria อื่นๆ (*N. gonorrhoeae*, *M. xanthus*, *V. cholera* และ *E. coli*) และผลการศึกษายีน *gyrB* แสดงความสอดคล้องกันกับยีน 16S rRNA นอกจากนี้สามารถนำมาใช้

ในการแยกความแตกต่างระหว่าง สปีชีส์ซึ่งช่วยให้เกิดความชัดเจนมากขึ้น และเนื่องจากความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบได้ภายในสปีชีส์ ดังนั้นยีน *gyrB* จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการจำแนก และระบุชนิดของแบคทีเรียได้ในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ อีกทั้งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจีโนม *Aeromonas*

การศึกษาด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

โมโนโคลนอลแอนติบอดีคือแอนติบอดีที่สร้างมาจากเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์ๆ เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์ (B-lymphocytes หรือ B-cells) จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดที่จำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปที่รวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กัน เช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัมทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่น ส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่สร้างจากหนึ่งโคลนของบี-เซลล์ ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-91)

กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล (2552: ถ่ายเอกสาร) ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์จำนวน 8 ไอโซเลต (AH1-AH8) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถแบ่งออกเป็น 16 กลุ่มซึ่งทดสอบกับ *A. hydrophila* 12 ไอโซเลต (AH1-AH12), *A. caviae* 9 ไอโซเลต (AC1-AC9), *A. sobria* 10 ไอโซเลต (AS1-AS10) และแบคทีเรียอื่นๆ อีก 24 ไอโซเลต

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 มีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* 8 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ในการทดสอบ คือ *A. hydrophila* AH1, AH3, AH4, AH5, AH6, AH8, AH9 และ AH10 โดยแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. caviae* AC3 และ AC6 และสามารถจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 70 กิโลดาลตัน และจากการหา isotype พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจัดอยู่ในคลาส IgG_{2a} และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot blot indirect immunoperoxidase assay พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวต่อการตรวจหา *A. hydrophila* ที่เจือจางมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้

ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธี immunohistochemistry ได้ (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. 2552: ถ่ายเอกสาร)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย ทุกสปีชีส์ในจีนัส *Aeromonas* ที่ใช้ทดสอบยกเว้น *A. hydrophila* AH2 AH11, *A. sobria* AS4 และ *A. jandaei* โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 70 กิโลดาลตัน และจากการหา isotype พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจัดอยู่ในคลาส IgG_{2a} เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot blot indirect immune peroxidase assay พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวต่อการตรวจหา *A. hydrophila* ที่เจือจางมากที่สุดที่ความเข้มข้น 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. 2552: ถ่ายเอกสาร)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 มีความจำเพาะคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 สามารถจับกับแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบโดยจับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน และจากการหา isotype พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจัดอยู่ในคลาส IgG_{2a} และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot blot indirect immunoperoxidase assay พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความไวต่อการตรวจหา *A. hydrophila* ที่เจือจางมากที่สุดที่ความเข้มข้น 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ซึ่งสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามโคลน สรุปได้ดังตาราง 4 (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. 2552)

ตาราง 4 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ *A. hydrophila* (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. 2552: ถ่ายเอกสาร)

MAbs	คลาสและ ซับคลาส	ความไว: dot blotting (CFU/มิลลิลิตร)	แอนติเจน: Western blotting (kDa)	IHC	ความจำเพาะ (Dot blotting)
AH129	IgG _{2a}	10^6	10-70	+++	AH1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, AC3, 6
AH413	IgG _{2a}	10^6	10-70	+++	AH, AS, AC, AV, ยกเว้น AH2, 11, AS4, AJ
AH396	IgG _{2a}	10^6	10	-	AH, AC, AS, AJ, AV

AH; *A. hydrophila*; AS; *A. sobria*; AC; *A. caviae*; AV; *A. veronii* และ AJ; *A. jandaei*

7. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วย แอนติบอดีชนิด เดียวที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน ทำให้สามารถ คัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ จึงสามารถใช้ในการ พิสูจน์ทราบวัดปริมาณ ตรวจสอบตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างแม่นยำและ มีความเชื่อมั่นสูง โมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญในงานวิจัยสาขาต่างๆ

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทางการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์ มาก ทางทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัยการตรวจ และการใช้รักษา ในระยะแรกการใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีส่วนใหญ่เพื่อการวินิจฉัยต่างๆ ซึ่ง ปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ใน การวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์มากมาย วัดปริมาณยาต่างๆ ในเลือด ตรวจแอนติเจน ที่เกี่ยวข้องกัน ความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548: 95-97)

จากความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวข้างต้น พบว่าสามารถ นำไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัย การติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในไร่น้ำนางฟ้าไทย (*Branchinella thailandensis*) ได้โดยสามารถ วินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ เนื่องจากสมบัติที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตต่อ *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. sobria* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญต่อการก่อโรคในมนุษย์ และสัตว์น้ำเช่น ปลาชนิดต่างๆ รวมถึงไร่น้ำนางฟ้า ไทย ซึ่งเริ่มมีบทบาทสำคัญต่อเศรษฐกิจที่มีการวิจัยและพัฒนา เพื่อเพิ่มขีด ความสามารถในการนำเข้าสู่ธุรกิจอาหารสัตว์น้ำของประเทศ ดังนั้นการนำเอาโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าวข้างต้นมาใช้ จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก และได้ผลแน่นอน สำหรับใช้ เป็นข้อมูลพื้นฐานในการ ป้องกันและ จัดการระบบการเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้า ไทยให้มี ประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

สัตว์ทดลอง

ไร่น้ำนางฟ้าไทย (*B. thailandensis*) ที่มีอาการจุดดำจากโรงพยาบาลพะเยา แพทย์พะเยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น (KKU) และจากโรงพยาบาลพะเยา แพทย์พะเยา ภาควิชาเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี จังหวัดสุพรรณบุรี (SPCAT) และไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติจาก SPCAT

แบคทีเรีย สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียชนิดต่างๆ สำหรับใช้อ้างอิงที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 แบคทีเรียอ้างอิงชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Specimen
<i>A. hydrophila</i> 22098	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22099	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 22106	DMST	Stool
<i>Serratia marcescens</i>	SWU	?
<i>P. aeruginosa</i> 25000	DMST	Sputum

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health

SWU = Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

? = ไม่ทราบแหล่งที่แยกเชื้อ

แบคทีเรียทุกไอโซเลตนำมาเพาะเลี้ยงโดยการ streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอล 15% ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 อาหารสำหรับทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

อาหารสำหรับทดสอบทางชีวเคมี	บริษัท
Tryptone	Difco
MR-VP	Merck
Simmon's Citrate Agar	HIMEDIA
Bile Esculin Agar Base	HIMEDIA
Phenol Red Broth Base	BBL
D-Glucose monohydrate	UNILAB
Sucrose	UNIVAR
Lactose	Difco
D-Manitol	Difco
L-Arabinose	Sigma
Urea Agar Base (Christensen)	HIMEDIA
Lysine Decarboxylase Broth	HIMEDIA
Decarboxylase Broth Base, Moeller	HIMEDIA
Ornithine Decarboxylase Broth	HIMEDIA
Triple sugar Iron Agar (TSI)	Difco
Nutrient Gelatin	Biomark
Tryptic Soy Broth (TSB)	Difco
Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar	Difco
MacConkey Agar	Difco
O-F BASAL MEDIUM	Difco

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลอง

1. น้ำปลอดคลอรีน
2. สายยางหัวทราย
3. ปั๊มลม (air pump)
4. ถังพลาสติกขนาดต่างๆ

อุปกรณ์สำหรับการทดลอง

1. เตาไฟฟ้า (Hot plate)
2. ตู้ปลอดเชื้อ (Horizontal Laminar Flow Cabinets) รุ่น NU-201-330E ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น NU-2500V ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.
4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
5. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany
6. 0.45 ไมโครพอร์ nitrocellulose membrane
7. โถแก้วสำหรับใส่สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาการเกิดสี
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 6400 ของบริษัท JENWAY
9. สไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์ (Slide and Cover slide)
10. ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัท Sanyo, Thailand
11. แท่นอุ่นสไลด์ (Slide warmer) ของบริษัท Medax
12. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Freezer) ของบริษัท Sanyo, Thailand
13. ตู้ดูดควัน (Chemical fume hood) ของบริษัท official
14. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (Suction pump) พร้อมอุปกรณ์ ของบริษัท BENTON HARBORMICH U.S.A.
15. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท LEICA

สารเคมีสำหรับการทดลอง

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide; H_2O_2) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.
2. 5% blotto (ภาคผนวก ก)
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline ,PBS) 0.15 M pH 7.2
4. ไดอะมีโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidinetetrahydrochloride, DAB) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.
5. แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ค)
6. แอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) ได้แก่ Goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
7. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ของบริษัท BDH ที่ความเข้มข้น 50%, 70%, 80%, 90% และ 95%
8. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) ของบริษัท Univar
9. ไซลีน (xylene) ของบริษัท Carlo Erba
10. ฟอรัลดีไฮด์ (formaldehyde) ของบริษัท Carlo Erba
11. สารละลาย P_1^+ 10% (calf bovine serum ใน PBS)
12. พาราพลาสต์ (paraplast) ของบริษัท Bio obtica
13. น้ำยาผนึกสไลด์ (permount) ของบริษัท Fichter Scientific
14. สารละลาย Davidson's fixative
15. สีฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin) ของบริษัท Harleco
16. สีอีโอซิน (Eosin Y) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ ของบริษัท Harleco
17. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; HCl) ของบริษัท Merck
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH) ของบริษัท Riedel-de Haen
19. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution) ของบริษัท DIFCO

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้า

1.1 ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำสำหรับใช้ในการทดลอง แสดงดังตาราง 7

ตาราง 7 สถานที่เก็บตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีลักษณะอาการของโรคจุดดำ

สถานที่เก็บ	ปี ค.ศ.	จำนวนครั้งที่เก็บและแยกแบคทีเรีย
ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น (KKU)	2008	1 ครั้ง
ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น (KKU)	2009	1 ครั้ง
วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี จังหวัดสุพรรณบุรี (SPCAT)	2009	2 ครั้ง

1.2 ไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติ

เก็บรวบรวมตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติอายุ 7 วัน จาก SPCAT โดยนำไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติและไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำมาเลี้ยง ในน้ำจืดที่อุณหภูมิห้องและแสงธรรมชาติในภาชนะถึงพลาสติกขนาด 22x22x15 เซนติเมตร โดยให้อาหาร คือ สาหร่ายสีเขียว (*Chlorella* sp.) (ภาคผนวก ง) จำนวนสองครั้งต่อวัน

2. การคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้า

นำตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยที่เป็นโรคจุดดำและยังมีชีวิตจำนวน 5 ตัว ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง ทำการบดตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยใน 500 ไมโครลิตรของ 0.15 M Phosphate buffer saline (PBS) จนละเอียด แล้วนำไปเจือจางแบบ 10-fold serial dilution ด้วย PBS จากนั้นนำแต่ละความเจือจางมา 100 ไมโครลิตร ไปทำการ spread plate บนอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับ และแยกโคโลนีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อในกลีเซอรอล 15% ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการดูดเก็บเซลล์ให้อยู่ในรูปสารแขวนลอยโดยใช้

PBS นำสารแขวนลอยที่ได้มาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 1.0 ด้วย PBS ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 1×10^8 CFU/มิลลิลิตร นำแบคทีเรียที่ได้ไปฆ่าด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จะได้แบคทีเรียที่เป็นแอนติเจนในรูป คงสภาพคือ heat-killed form สำหรับใช้ในการทดสอบ ด้วยวิธี dot blotting จากนั้นนำแบคทีเรีย heat-killed ส่วนหนึ่งมาเตรียมเป็นแอนติเจนแบบคงสภาพ ด้วยฟอร์มาลิน (formalin fixed form) โดยเติม 40% formaldehyde ในอัตราส่วน 1:10 (40% formaldehyde: heat-killed) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำแบคทีเรียที่ได้ทั้งสองรูปแบบ มาแบ่งใส่ในหลอด microfuge แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน หนูต่อไป

4. การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากตัวอย่างไร่นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำเบื้องต้นโดยวิธีทางชีวเคมี

นำเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์มา streak ลงบนอาหาร TSA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวของแต่ละเชื้อมาทำการย้อมสีแกรม และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการดังตาราง 6 ทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การผลิตและตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่ม

5.1 การผลิตแอนติซีรั่มต่อแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ

นำแอนติเจนที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 3 และผ่านการระบุชนิดด้วยสมบัติทางชีวเคมีในข้อ 4 แล้ว ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 กลุ่ม ได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. (ตาราง 8) ทั้ง 2 รูปแบบคือ แบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพ และรูปแบบที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 2 แล้วนำไปฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาวจำนวน 4 ตัวๆ ละ 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 5×10^6 CFU/ตัว) และฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง ด้วยแบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพ และรูปแบบที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 2 ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 ทำการเก็บเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณตา (orbital sinus) ของหนู แล้วปั่นแยกซีรั่มออกจากเลือดที่แข็งตัว นำซีรั่มที่ได้ไปตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อไป

5.2 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม

5.2.1 โดยวิธี Dot blotting

ดูดสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่นางฟ้าไทยที่เป็นโรคจุดดำในรูปแบบ heat-killed จากการเตรียมในข้อ 3 มาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งติดตารางแต่ละช่องขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH 129, AH413 และ AH396 ที่เจือจาง 1:100 ในสารละลาย 1% blotto และแอนติซีรัมที่ผลิตได้ซึ่งทำการดูดซับแอนติเจนที่เจือปนก่อน (preabsorbition) ด้วย *A. hydrophila* ในอัตราส่วน 1:100 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเก็บส่วนใสไปทำการเจือจางที่เหมาะสม ในสารละลาย 1% blotto แยกกันในแต่ละกล่องบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายซับสเตรท 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂ และ 0.05% CoCl₂ ใน PBS แบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี และแอนติซีรัมที่ผลิตได้จะเกิดเป็นจุดสีดำทำให้สามารถพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียเบื้องต้นได้

5.2.2 โดยวิธี Western blotting

นำแบคทีเรียที่ใช้ในการปลูกหมักร่วมกันในรูปแบบเสียสภาพมาแยกบน 15% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ผ่านกระแสไฟฟ้า ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตัดแบ่งไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วนำมาบ่มด้วยแอนติซีรัมที่ผลิตได้ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายซับสเตรท 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂ และ 0.05% CoCl₂ ใน PBS ตรวจดูแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

6. การเตรียมตัวอย่างไร่นางฟ้าไทยสำหรับการทดสอบแอนติซีรัม

นำไร่นางฟ้าไทยปกติจำนวน 40 ตัว มาเลี้ยงในน้ำ 4 ลิตร จากนั้นให้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ 3 กลุ่ม ที่ผ่านการระบุชนิดด้วยสมบัติทางชีวเคมีในข้อ 4 แล้ว ได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Flavobacterium* sp. ที่ความเข้มข้น 10⁷ CFU/มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบแอนติซีรัมด้วยวิธี immunohistochemistry ดังรายละเอียดในข้อ 8

7. การตรวจการติดเชื่อแบคทีเรียตามธรรมชาติของโร้น้ำนางฟ้าไทย

เก็บตัวอย่างโร้น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการ จุดดำจาก ตาราง 7 มาทำการตรวจการติดเชื่อแบคทีเรียตามธรรมชาติด้วยวิธี immunohistochemistry ดังรายละเอียดในข้อ 8

8. การตรวจการติดเชื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC)

8.1 การเตรียมเนื้อเยื่อของโร้น้ำนางฟ้าไทย

8.1.1 นำโร้น้ำนางฟ้าไทยที่ได้จากการทดลองข้อ 6 และ 7 แช่ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8.1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับดังนี้

- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้งๆ ละ 24 ชั่วโมง
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1: 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แช่ในไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง
- แช่ในไซลีนที่ผสมกับ พาราฟลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1:1 เก็บในตู้อบ

ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- แช่ในพาราฟลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที

8.1.4 นำเนื้อเยื่อของโร้น้ำนางฟ้าไทยที่อินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราฟลาสต์

8.1.5 ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโทมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซกชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบอน (ribbon)

8.1.6 นำเซกชันมาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาตินโดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซกชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยิดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อ แล้วดูดน้ำออกจนให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.1.7 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีนและดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้

- แช่ในไซลีน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 80% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในสารละลายฟอรัมาลินเข้มข้น 10% 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

8.1.8 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

8.2 วิธี Indirect immunoperoxidase

8.2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking)

- หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละเซกชันด้วยไมโครปิเปต
- บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

8.2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

- หยดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก

- หยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่งให้คลุมเซกชันดังแสดงในภาพประกอบ 4 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ AH413 และ AH129 ตามลำดับ เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ที่ความเข้มข้น 1:20 และแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (ภาคผนวก ข) ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

- ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

8.2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

- หยด PBS ในแต่ละเซกชันออก

- หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate-GAM-HRP) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุกเซกชัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

8.2.4 นำเซกชันมาทำปฏิกิริยากับ 0.03% DAB และ 0.006 % H_2O_2 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

8.2.5 ล้างเซกชันด้วยน้ำประปา 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

8.3 การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอีโอซิน

8.3.1 ตี้งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

8.3.2 ย้อมทับด้วยสีอีโอซิน 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% และล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

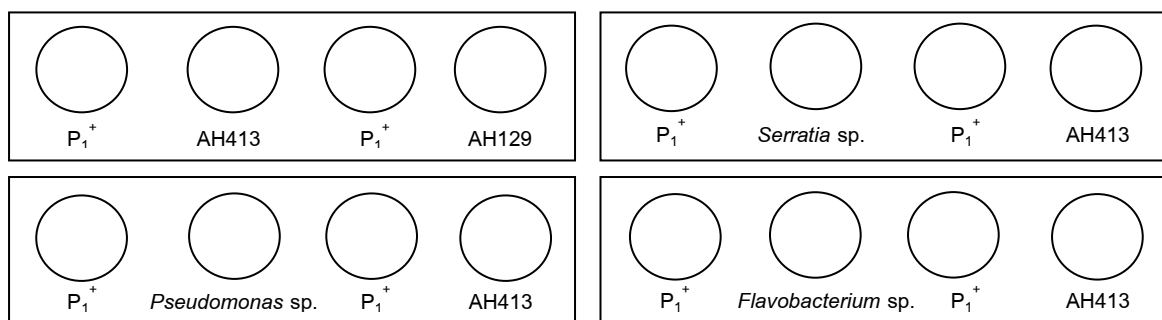
8.3.3 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

8.3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนอัตราส่วน 1:1 เวลา 5 นาที

8.3.5 แช่ในไซลีนจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

8.3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการผนึกสไลด์ด้วยตัวกลางผนึก (permount)

8.3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล



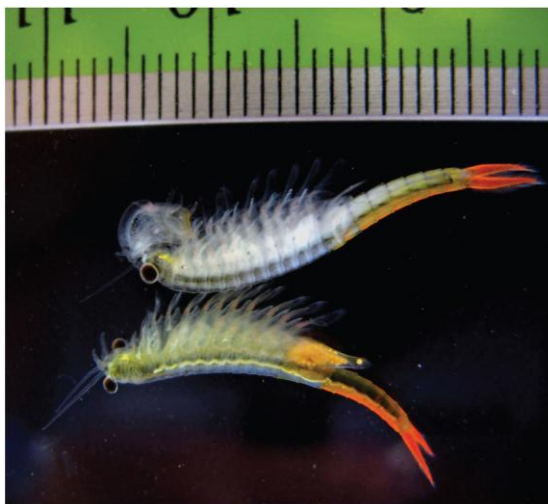
ภาพประกอบ 4 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย ในเนื้อเยื่อไร้น้ำนางฟ้าไทย (*B. thailandensis*)

บทที่ 4

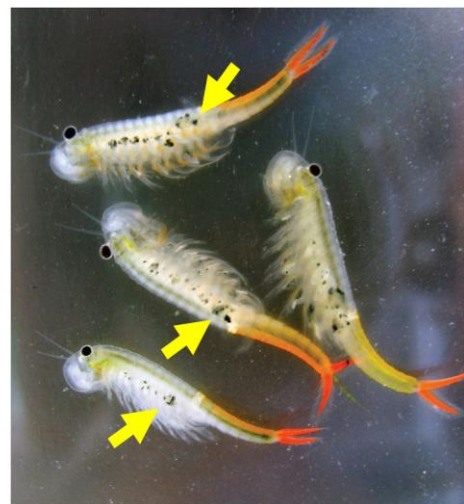
ผลของการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติ และมีอาการจุดดำ (ตาราง 7) พบปูมปมสีดำที่บริเวณขาว่ายน้ำเป็นส่วนใหญ่ และพบที่บริเวณอื่นเช่น หนวด และหาง ในไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ (ภาพประกอบ 5B) ในขณะที่ไม่พบลักษณะปูมปมสีดำในไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติ (ภาพประกอบ 5A)



(A)



(B)

ภาพประกอบ 5 ไร่น้ำนางฟ้าไทย (*B. thailandensis*) (A); ไร่น้ำนางฟ้าไทยปกติเพศผู้ (บน) และเพศเมีย (ล่าง) (B); ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีลักษณะอาการจุดดำ (black spot syndrome) ลูกศรแสดงบริเวณที่พบปูมปมสีดำ

2. การคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้า

จากการคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4 ครั้ง จากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ ซึ่งเก็บได้จากแหล่งที่ต่างกัน (ตาราง 7) พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน โดยพบโคโลนีที่มีลักษณะกลม หน้าเยิ้ม ขอบเรียบ สีเหลืองนวลเป็นส่วนใหญ่ (ภาพประกอบ 6A) และเมื่อนำมาทำการทดสอบด้วยการย้อมสีแกรมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อนสั้น (ภาพประกอบ 6B)



(A)



(B)

ภาพประกอบ 6 การคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรีย (A); ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (B); รูปร่างของ แบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3. การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยเบื้องต้นโดยวิธีทางชีวเคมี

เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำมาทดสอบลักษณะและสมบัติทางชีวเคมี พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องได้ 4 กลุ่มหลัก ได้แก่ *Aeromonas* spp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. (ตาราง 8) และเมื่อนำแบคทีเรียในกลุ่มของ *Aeromonas* spp. ไปทำการศึกษาลักษณะและ สมบัติทางชีวเคมี ต่อ โดยทำการเปรียบเทียบผลชีวเคมีกับไอโซเลตอ้างอิงของ *Aeromonas* ในแต่ละสปีชีส์ ได้แก่ *A. hydrophila* DMST 22098, *A. sobria* DMST 22099 และ *A. caviae* DMST 22106 พบว่าสามารถจัดให้เป็น *A. hydrophila* และ *A. sobria* จำนวน 12 และ 9 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยพบว่ามีสมบัติทางชีวเคมีที่มีความหลากหลายกันไป ภายในกลุ่ม ของ *A. hydrophila* และ *A. sobria* โดยสามารถแบ่ง *A. hydrophila* ได้เป็น 6 กลุ่มและ *A. sobria* ได้เป็น 4 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน (ตาราง 9) และจากการนำไปทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 ที่จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. พบว่า

ทุกไอโซเลตให้ผลบวก ซึ่งเป็นการยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมีในการระบุเป็น *Aeromonas* sp. ในทั้ง 10 กลุ่ม (ตาราง 9 และ 10) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 ให้ผลบวก เฉพาะกลุ่มที่ทดสอบด้วยชีวเคมีระบุเป็น *A. hydrophila* เท่านั้น แต่มี *A. hydrophila* ไอโซเลตลำดับ ที่ 1 และ 28 ที่ให้ผลลบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 และทั้ง *A. hydrophila* และ *A. sobria* ส่วนใหญ่ที่แยกได้ให้ผลบวกกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 นอกจาก *Aeromonas* sp. ไอโซเลตลำดับที่ 1, 9 ถึง 12 และ 32 ที่ให้ผลลบ (ตาราง 9 และ 10) จำนวนแบคทีเรียที่เก็บรวบรวม แบคทีเรียที่แยกได้จาก 2 แหล่งภายในระยะเวลา 2 ปี จำนวน 4 ครั้ง สามารถสรุปได้ดังตาราง 11

4. การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกและจำแนกได้จากตัวอย่างโร้น้ำ นางฟ้าไทยเบื้องต้นโดยวิธี Dot blotting

แบคทีเรียทั้งหมด ที่พิสูจน์สมบัติทางชีวเคมี เป็น *Aeromonas* sp. ได้แก่ *A. hydrophila* 12 ไอโซเลต และ *A. sobria* 9 ไอโซเลต สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 ได้ทุก ไอโซเลต ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 จับกับ *A. hydrophila* 11/12 และ *A. sobria* 4/9 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่ระบุเป็น *A. hydrophila* จับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 ได้ 10/12 ไอโซเลต (ตาราง 9, 10 และ ภาพประกอบ 7) เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 และ AH129 ไม่ได้จับครอบคลุมทุกไอโซเลต แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 สามารถจับกับ *Aeromonas* spp. ทุกไอโซเลต แต่สามารถระบุ แยกระหว่าง สปีชีส์ได้ด้วยสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เช่น esculin (ตาราง 9 และ ภาพประกอบ 7)

5. การผลิตและตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัม

หลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวจำนวน 4 ตัว ด้วยแบคทีเรีย 3 กลุ่ม ที่แยกได้จากโร้น้ำนางฟ้าไทย (ยกเว้น *Aeromonas* spp.) ดังแสดงในตาราง 10 ได้แก่ 1) *Serratia* sp. (ลำดับที่ 5-8) 2) *Pseudomonas* spp. (ลำดับที่ 16-21) และ 3) *Flavobacterium* sp. (ลำดับที่ 22) จากนั้นทำการเก็บแอนติซีรัมมาทดสอบความจำเพาะโดยวิธี dot blotting พบว่าแอนติซีรัมที่ได้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม ได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. (ภาพประกอบ 7D, E และ F) โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียต่างชนิด ที่แยกได้ในการทดลองครั้งนี้ เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. (ภาพประกอบ 7A, B และ C)

สำหรับ anti-*Serratia* antiserum จับกับแบคทีเรียที่พิสูจน์ทราบเป็น *Serratia* sp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลต ที่แยกได้จากแหล่งเดียวกัน เช่นเดียวกับ anti-*Flavobacterium* antiserum จับกับแบคทีเรียที่พิสูจน์ทราบเป็น *Flavobacterium* sp. ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากทั้ง 2 แหล่ง นอกจากกรณีของ anti-*Pseudomonas* antiserum จับกับ *Pseudomonas* spp. ได้ 7/9 ไอโซเลต โดยพบว่ามี *Pseudomonas* spp. 2 ไอโซเลตที่แอนติซีรัมไม่สามารถจับได้ (ภาพประกอบ 7E) ซึ่ง

เป็นไอโซเลตจากแหล่ง SPCAT ที่ไม่ได้ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติซีรัมที่ผลิตได้นี้มีความจำเพาะสูงไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่นานางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำในการทดลองนี้

จากการนำแอนติซีรัมมาตรวจสอบการจับกับแอนติเจนโดยวิธี western blotting พบว่า anti-*Serratia* antiserum สามารถจับ กับแอนติเจนที่คาดว่าเป็น polysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 36 ถึง 150 กิโลดาลตัน และแถบแอนติเจนขนาด 31 และ 33 กิโลดาลตัน ของ *Serratia* sp. ลำดับที่ 5 (ภาพประกอบ 8A และ ตาราง 10) ส่วน anti-*Pseudomonas* antiserum จับกับแถบแอนติเจนต่างกัน ใน *Pseudomonas* spp. ได้ 2 รูปแบบ (ภาพประกอบ 8B) โดยจับกับแถบแอนติเจนขนาด 19 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 8B แถว 2) ของ *Pseudomonas* spp. ลำดับที่ 20 และจับกับแถบแอนติเจนขนาด 17, 19, 20, 35, 40 และ 75 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 8B แถว 3) ของ *Pseudomonas* spp. ลำดับที่ 21 (ตาราง 10) และ anti-*Flavobacterium* antiserum สามารถจับกับแอนติเจนที่คาดว่าเป็น polysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 14-19 และ 34-150 และจับกับแถบแอนติเจนขนาด 23 และ 32 กิโลดาลตัน ของ *Flavobacterium* sp. ลำดับที่ 22 (ภาพประกอบ 8C และตาราง 10)

ตาราง 8 สมบัติ ทาง ชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากโรน่านางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ
(n คือ จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย)

สมบัติ	<i>Serratia</i> sp. (n=4)	<i>Aeromonas</i> spp. (n=21)	<i>Pseudomonas</i> spp. (n=9)	<i>Flavobacterium</i> sp. (n=2)
Gram stain	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻
Motility	+	+	+	-
Oxidase	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Indole	-	+	-	-
Methyl red	-	+	-	-
Voges-Proskauer	+	D	-	-
Simmon's citrate	-	D	D	-
Triple sugar iron	K/Ag	K/Ag	K/K	K/K
glucose Oxidation-fermentation test	F	F	OX หรือ non-OX	non-OX
Acid from:				
Glucose	+	+	-	-
Arabinose	+	D	-	-
Sucrose	+	+	-	-
Mannitol	+	+	-	-
Growth ability				
MacConkey	+	+	+	-
TCBS	-	-	-	-

+: ทุกไอโซเลตให้ผลบวก, -: ทุกไอโซเลตให้ผลลบ, D; ให้ผลแตกต่างกันไปในไอโซเลตที่ต่างกัน

K; alkaline (สีแดง), Ag; acid (สีเหลือง) / สร้างก๊าซ

F; fermenter (ผลิตกรดได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน)

OX; oxidizer (ผลิตกรดได้ในสภาวะมีออกซิเจนแต่ไม่สามารถผลิตกรดได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน)

non-OX; non-oxidizer (ไม่สามารถผลิตกรดได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน)

ตาราง 9 ความหลากหลายทางชีวเคมี ของ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มี
อาการจุดดำและปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สมบัติ	Type strains			<i>Aeromonas</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้ทั้งหมด									
	AH 22098	AS 22099	AC 22106	<i>A. hydrophila</i> * (n= 12)						<i>A. sobria</i> * (n=9)			
				2	23, 24, 25, 26, 27	3, 4	14, 15	28	1	13, 29, 30	31	9, 10, 11,12	32
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxylase:													
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Voges-Proskuer	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Gas (glucose)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from:													
Arabinose	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี													
AH129	+	-	-	+				-	-	-	-	-	-
AH413	+	+	+	+				+	-	+	-	-	-
AH396	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+

n; จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย

*; ลำดับของแต่ละไอโซเลตในตาราง 10

AH; *A. hydrophila*

AS; *A. sobria*

AC; *A. caviae*

ตาราง 10 สรุปจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้จากสมบัติทางชีวเคมีและปฏิกิริยากับแอนติบอดี

No.	isolates	MAbs			Antiserum			Biochemical identification
		AH129 ¹	AH413 ²	AH396 ³	Ser ⁴	P ⁵ _S	Fla ⁶	
First isolation in 2008 (KKU)								
1	51-2-13	-	-	+	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>
2	51-2-21	+	+	+	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>
3	51-2-31	+	+	+	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>
4	51-2-32							
5*	51-1-9	-	-	-	+	-	-	<i>Serratia</i> sp.
6*	51-2-4	-	-	-	+	-	-	<i>Serratia</i> sp.
7*	51-2-10	-	-	-	+	-	-	<i>Serratia</i> sp.
8*	51-2-11	-	-	-	+	-	-	<i>Serratia</i> sp.
Second isolation in 2009 (KKU)								
9	52-03-01	-	-	+	-	-	-	<i>A. sobria</i>
10	52-03-02							
11	52-03-03							
12	52-03-04							
13	52-03-05	-	+	+	-	-	-	<i>A. sobria</i>
14	52-03-06	+	+	+	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>
15	52-03-07							
16*	52-03-08	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
17*	52-03-09	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
18*	52-03-10	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
19*	52-03-11	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
20*	52-03-12	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
21*	52-03-13	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
22*	52-03-14	-	-	-	-	-	+	<i>Flavobacterium</i> sp.
Third and fourth isolation in 2009 (SPCAT)								
23	52-07-01	+	+	+	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>
24	52-07-02							
25	52-07-03							
26	52-07-04							
27	52-07-05							
28	52-07-06	-	+	+	-	-	-	<i>A. hydrophila</i>
29	52-07-07	-	+	+	-	-	-	<i>A. sobria</i>
30	52-07-08							
31	52-07-09	-	+	+	-	-	-	<i>A. sobria</i>
32	52-07-10	-	-	+	-	-	-	<i>A. sobria</i>
33	52-07-11	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
34	52-07-12	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
35	52-07-13	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
36	52-07-14	-	-	-	-	-	+	<i>Flavobacterium</i> sp.

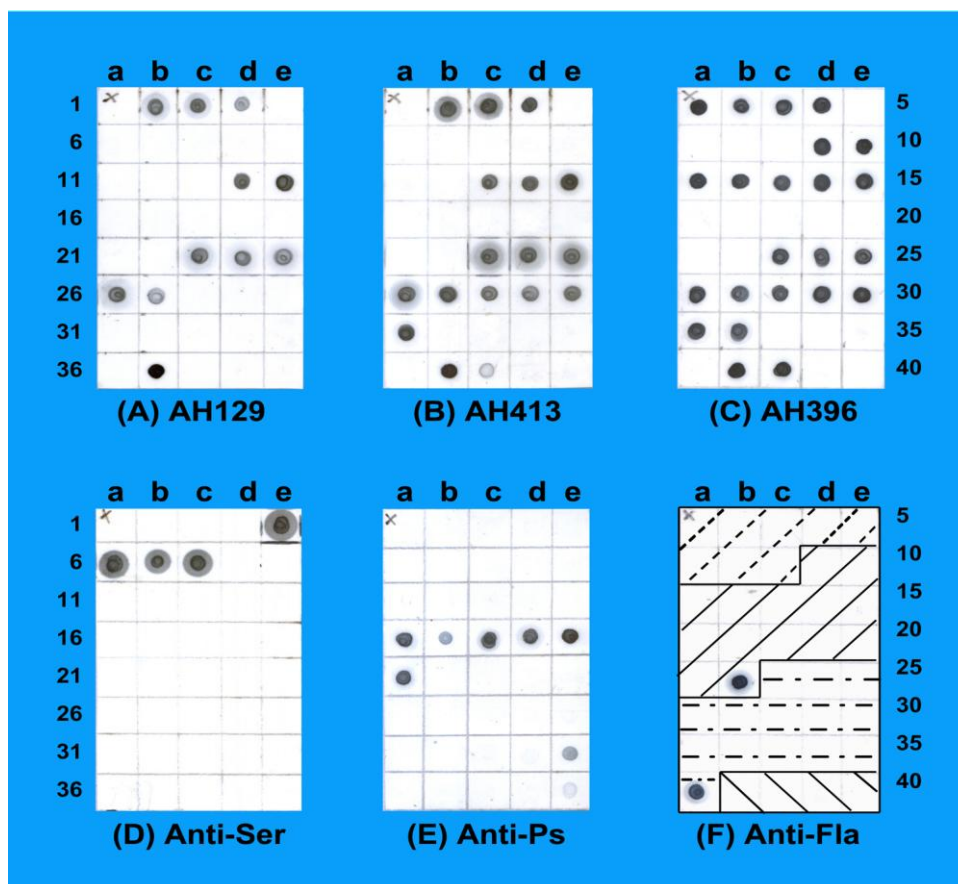
¹ AH129 จำเพาะต่อ *A. hydrophila*, ² AH413 จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. บางไอโซเลต, ³ AH396 จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp., ⁴ Ser แอนติซีรัมต่อ *Serratia* sp., ⁵ Ps แอนติซีรัมต่อ *Pseudomonas* spp., ⁶ Fla แอนติซีรัมต่อ *Flavobacterium* sp. และ *; แบคทีเรียที่ผลิตแอนติซีรัม

ตาราง 11 ผลสรุปจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่ ึงหมดที่แยกได้จากรไรน้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการ
จุดดำ ภายในระยะเวลา 2 ปี จากทั้ง 2 แหล่ง (KKU และ SPCAT)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ปี	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้				
		AH	AS	<i>Serratia</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Flavobacterium</i> sp.
KKU (1 ครั้ง)	2008	4	0	4	0	0
KKU (1 ครั้ง)	2009	2	5	0	6	1
SPCAT (2 ครั้ง)	2009	6	4	0	3	1

AH; *A. hydrophila*

AS; *A. sobria*



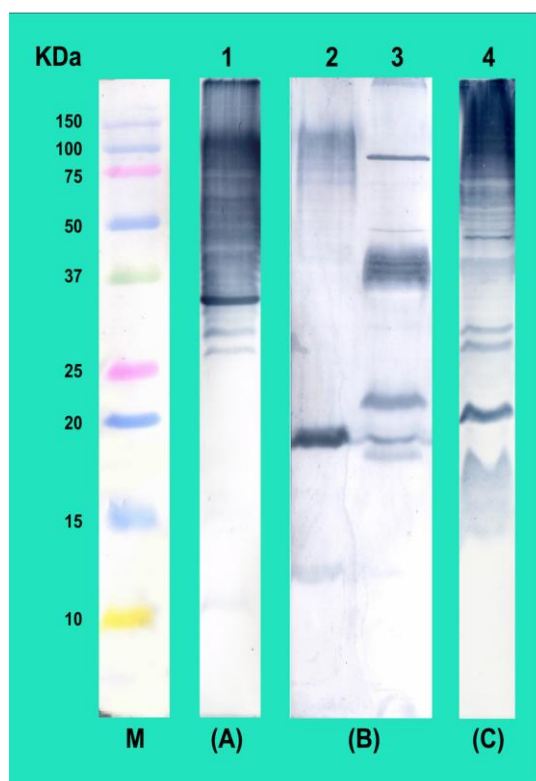
ภาพประกอบ 7 การทดสอบแบคทีเรียที่แยกได้จากแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting นำแบคทีเรียมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (1 ไมโครลิตร/จุด) โดยแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เรียงลำดับตามตาราง 10 และนำไปปฏิกิริยา โมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติซีรัม ได้แก่ โมโนโคลนอล แอนติบอดี (A); AH129, (B); AH413, (C); AH396 และแอนติซีรัมต่อ (D); *Serratia* sp., (E); *Pseudomonas* spp. และ (F); *Flavobacterium* sp.

-  แบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งที่ 1 จาก KCU
-  แบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งที่ 2 จาก KCU
-  แบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งที่ 3 และ 4 จาก SPCAT
-  แบคทีเรียอ้างอิง ลำดับที่ 37 *A. hydrophila*

ลำดับที่ 38 *A. sobria*

ลำดับที่ 39 *S. marcescens*

ลำดับที่ 40 *P. aeruginosa* (ตาราง 5)



ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาวโดยวิธี

Western blotting (M); โปรตีนมาตรฐาน, (A); แอนติซีรัมต่อ *Serratia* sp., (B); แอนติซีรัมต่อ *Pseudomonas* spp. และ (C); แอนติซีรัมต่อ *Flavobacterium* sp. โดยแอนติเจนที่ใช้ทดสอบตามตาราง 10

แถวที่ 1 แถวที่เรีย *Serratia* sp. ไอโซเลตลำดับที่ 5

แถวที่ 2 แถวที่เรีย *Pseudomonas* sp. ไอโซเลตลำดับที่ 20

แถวที่ 3 แถวที่เรีย *Pseudomonas* sp. ไอโซเลตลำดับที่ 21

แถวที่ 4 แถวที่เรีย *Flavobacterium* sp. ไอโซเลตลำดับที่ 22

6. การทดสอบความสามารถในการใช้แอนติบอดีตรวจโรคน้ำนางฟ้า ไทยที่ติดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี immunohistochemistry

จากการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม ต่างๆ ได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ที่ความเข้มข้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเลี้ยงโรคน้ำนางฟ้าไทยปกติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำโรคน้ำนางฟ้าไทยผ่านกระบวนการ paraffin sectioning และนำมาตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติซีรั่มต่อ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. โดยวิธี immunohistochemistry

เมื่อตรวจด้วยแอนติซีรั่มพบ immunoreactivity ของเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม ชัดเจนในก้อนอาหารภายในช่องทางเดินอาหาร และพบการติดเชื้อเข้าสู่เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (intestinal epithelium) ของเชื้อ 2 กลุ่ม ได้แก่ *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ในขณะที่เมื่อตรวจสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 ไม่พบการเกิด immunoreactivity ทั้งในบริเวณช่องทางเดินอาหารและเยื่อบุผิวทางเดินอาหารในโรคน้ำนางฟ้าไทยที่แช่ในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มนี้ (ภาพประกอบ 9) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแอนติซีรั่มที่ผลิตได้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้

7. การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติ ในโรคน้ำนางฟ้าไทยโดยวิธี immunohistochemistry

จากการตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemistry ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. และ *A. hydrophila* และแอนติซีรั่มต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ ได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ในโรคน้ำนางฟ้าไทยที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่เก็บรวบรวมจากมหาวิทยาลัย ขอนแก่น (KKU) และวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยี (SPCAT) ทั้งหมดจำนวน 70 ตัว สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของการติดเชื้อแบคทีเรียได้เป็น 3 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 พบแบคทีเรียเจริญในทางเดินอาหาร (ภาพประกอบ 9A)

ระดับที่ 2 แบคทีเรียมีการลุกลามเข้าสู่เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (ภาพประกอบ 9B, C, 10A, D และ 11B)

ระดับที่ 3 แบคทีเรียลุกลามมีการติดเชื้อเข้าสู่ เนื้อเยื่อ บริเวณต่างๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ และ hemocyte (ภาพประกอบ 10B, C และ 11A)

7.1 การตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. และเชื้อในกลุ่มอื่นๆ ตามธรรมชาติจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น (KKU) จำนวน 30 ตัวที่รวบรวมในช่วงปี ค.ศ. 2008 และ 2009

จากการตรวจการติดเชื้อ แบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 และ AH413 พบ *Aeromonas* immunoreactivity ทั้งหมด 17 ตัวจาก 30 ตัว (ตาราง 12) โดยทั้งหมด

พบที่บริเวณท่อทางเดินอาหาร (17/30) และบางตัวพบการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. เพิ่มบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (4/30) (ภาพประกอบ 10A) และ กล้ามเนื้อ (3/30) (ภาพประกอบ 10B)

เมื่อตรวจด้วยแอนติซีรั่มต่อ *Serratia* sp. ตรวจพบ immunoreactivity ในปริมาณน้อยทั้งหมดจำนวน 8 ตัวจาก 30 ตัว (ตาราง 12) โดยทั้งหมดพบที่บริเวณท่อทางเดินอาหาร (8/30) และพบการติดเชื้อบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร จำนวน 1 ตัวจาก 30 ตัว (ภาพประกอบ 10D) โดยโรนันางฟ้าไทย (3/8) พบการติดเชื้อ *Serratia* sp. เพียงชนิดเดียว

เมื่อตรวจด้วยแอนติซีรั่มต่อ *Pseudomonas* spp. ตรวจพบ immunoreactivity ปริมาณน้อยทั้งหมดจำนวน 3 ตัวจาก 30 ตัว (ตาราง 12) โดยส่วนใหญ่พบที่บริเวณท่อทางเดินอาหาร (2/30) และตรวจพบ immunoreactivity ปริมาณน้อยใน hemocyte จำนวน 1 ตัวจาก 30 ตัว (ภาพประกอบ 10C) อาจเกิดเนื่องจากแบคทีเรียถูกกินโดย hemocyte

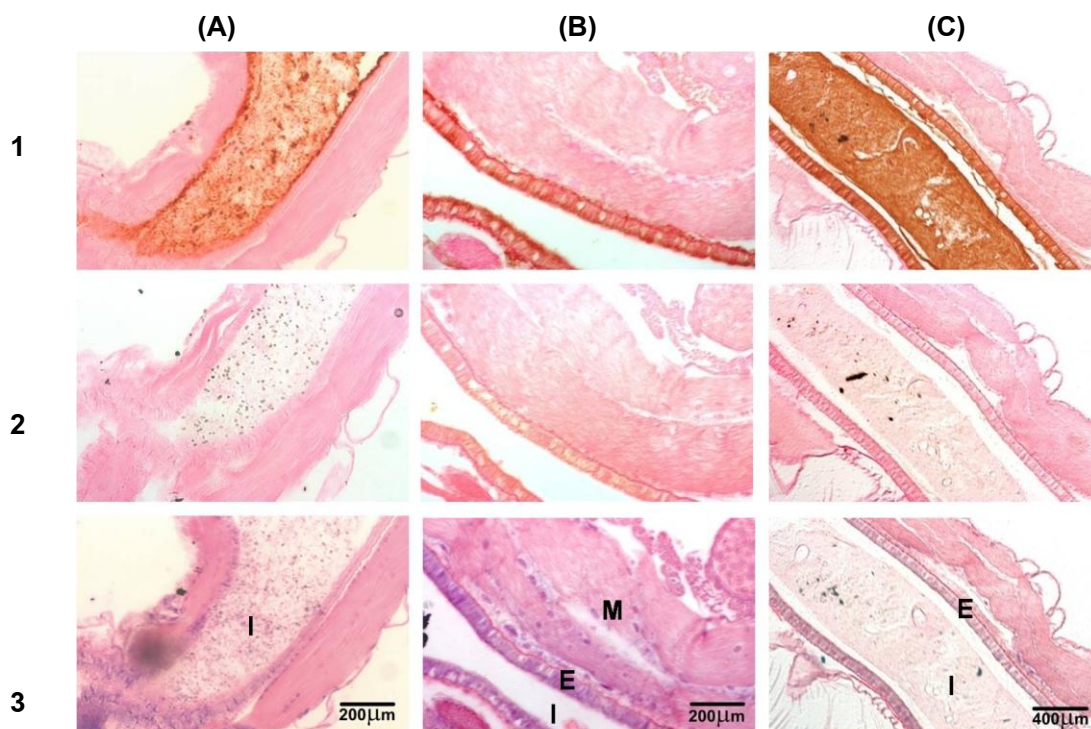
นอกจากนี้ยัง มีการตรวจพบ immunoreactivity ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ *Aeromonas* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Serratia* sp. ร่วมกันจำนวน 3 ตัวจาก 30 ตัว และพบ immunoreactivity ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. และ *Serratia* sp. ร่วมกัน 2 ตัวจาก 30 ตัว ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยแอนติซีรั่มต่อ *Flavobacterium* sp. ไม่พบ immunoreactivity และการติดเชื้อในเนื้อเยื่อของโรนันางฟ้าไทยที่เก็บรวบรวมจาก KKU (ตาราง 12)

7.2 การตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. และเชื้อในกลุ่มอื่นๆ ตามธรรมชาติจากวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี (SPCAT) จำนวน 40 ตัวที่รวบรวมในช่วงปี ค.ศ. 2009

จากการตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 และ AH413 พบ *Aeromonas* immunoreactivity ทั้งหมด 31 ตัวจาก 40 ตัว (ตาราง 12) โดยทั้งหมดพบที่บริเวณท่อทางเดินอาหาร (31/40) และมีเพียงบางตัวพบการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. เพิ่มในบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (10/40) และกล้ามเนื้อ (5/40) (ภาพประกอบ 11A)

เมื่อตรวจด้วยแอนติซีรั่มต่อ *Flavobacterium* sp. ตรวจพบ immunoreactivity ในปริมาณน้อยทั้งหมดจำนวน 10 ตัวจาก 40 ตัว (ตาราง 12) โดยส่วนใหญ่พบที่บริเวณท่อทางเดินอาหาร (7/40) และพบการติดเชื้อเข้าสู่เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร จำนวน 3 ตัวจาก 40 ตัว (ภาพประกอบ 11B) โดยในตัวอย่างทั้งหมดพบ *Flavobacterium* sp. กับ *Aeromonas* spp. ร่วมกันจำนวน 8 ตัวจาก 40 ตัว และ *Flavobacterium* sp. เพียงชนิดเดียว (2/40)

นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยแอนติซีรั่มต่อ *Serratia* sp. และ *Pseudomonas* spp. ไม่พบ immunoreactivity และการติดเชื้อในเนื้อเยื่อของโรนันางฟ้าไทยที่เก็บรวบรวมจากวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี (ตาราง 12) ในการตรวจไม่พบการติดเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อมีปริมาณน้อย และในส่วนของแอนติซีรั่มต่อ *Pseudomonas* spp. ก็พบว่าไม่สามารถจับครอบคลุมกับอีก 2/3 ไอโซเลตคือ Ps33 และ 34 (ตาราง 10) ทำให้ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อ



ภาพประกอบ 9 การตรวจการติดเชื้อ แบคทีเรียของ ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่ชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรียโดยการจุ่มแบคทีเรียในกลุ่ม (A); *Serratia* sp., (B); *Pseudomonas* spp. และ (C); *Flavobacterium* sp. ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยใช้แอนติซีรัมจำเพาะต่อแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม ได้แก่ (1A); anti-*Serratia* antiserum, (1B); anti-*Pseudomonas* antiserum, (1C); anti-*Flavobacterium* antiserum และ (2); ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. หรือ (3); ย้อมด้วย H&E ในเนื้อเยื่อของไร่น้ำนางฟ้าไทยจาก SPCAT ตรวจพบ *Serratia* sp. พบเพียงในทางเดินอาหาร บางส่วนจับติดบนเยื่อบุผิวทางเดินอาหารแต่ไม่มีการแทรกตัวเข้าสู่เยื่อบุผิว ในขณะที่ *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. พบในทางเดินอาหารและมีการแทรกตัวเข้าสู่เยื่อบุผิวทางเดินอาหารด้วย I = ช่องทางเดินอาหาร, E = เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร และ M = กล้ามเนื้อ

ตาราง 12 การติดเชื้อแบคทีเรียของไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำจากแหล่งธรรมชาติ โดยเก็บรวบรวมจาก มหาวิทยาลัยขอนแก่น (KKU) จำนวน 30 ตัว และ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี (SPCAT) จำนวน 40 ตัว โดยตรวจการติดเชื้อด้วยแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry

บริเวณที่พบ immunoreactivity	MAbs จำนวนตัวที่พบ immunoreactivity / จำนวนตัวทั้งหมด		PAbs จำนวนตัวที่พบ immunoreactivity / จำนวนตัวทั้งหมด		
	AH413 ¹	AH129 ²	Ser ³	Ps ⁴	Fla ⁵
In 2008 (KKU)					
Intestinal tract	13+1+3	2+0+0	7+1+0	2+0+0	0+0+0
Intestinal epithelium	0+1+3	0+0+0	0+1+0	0+0+0	0+0+0
Muscle, other tissues	0+0+3	0+0+0	0+0+0	0+0+1*	0+0+0
รวม (ตัว)	17/30	2/30	8/30	3/30	0/30
In 2009 (SPCAT)					
Intestinal tract	21+5+5	5+0+1	0+0+0	0+0+0	7+3+0
Intestinal epithelium	0+5+5	0+0+1	0+0+0	0+0+0	0+3+0
Muscle, other tissues	0+0+5	0+0+1	0+0+0	0+0+0	0+0+0
รวม (ตัว)	31/40	6/40	0/40	0/40	10/40
ทั้งหมด (ตัว)	48/70	8/70	8/70	3/70	10/70

0 คือ ไม่พบการเกิด immunoreactivity

¹ AH413 จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. บางไอโซเลต

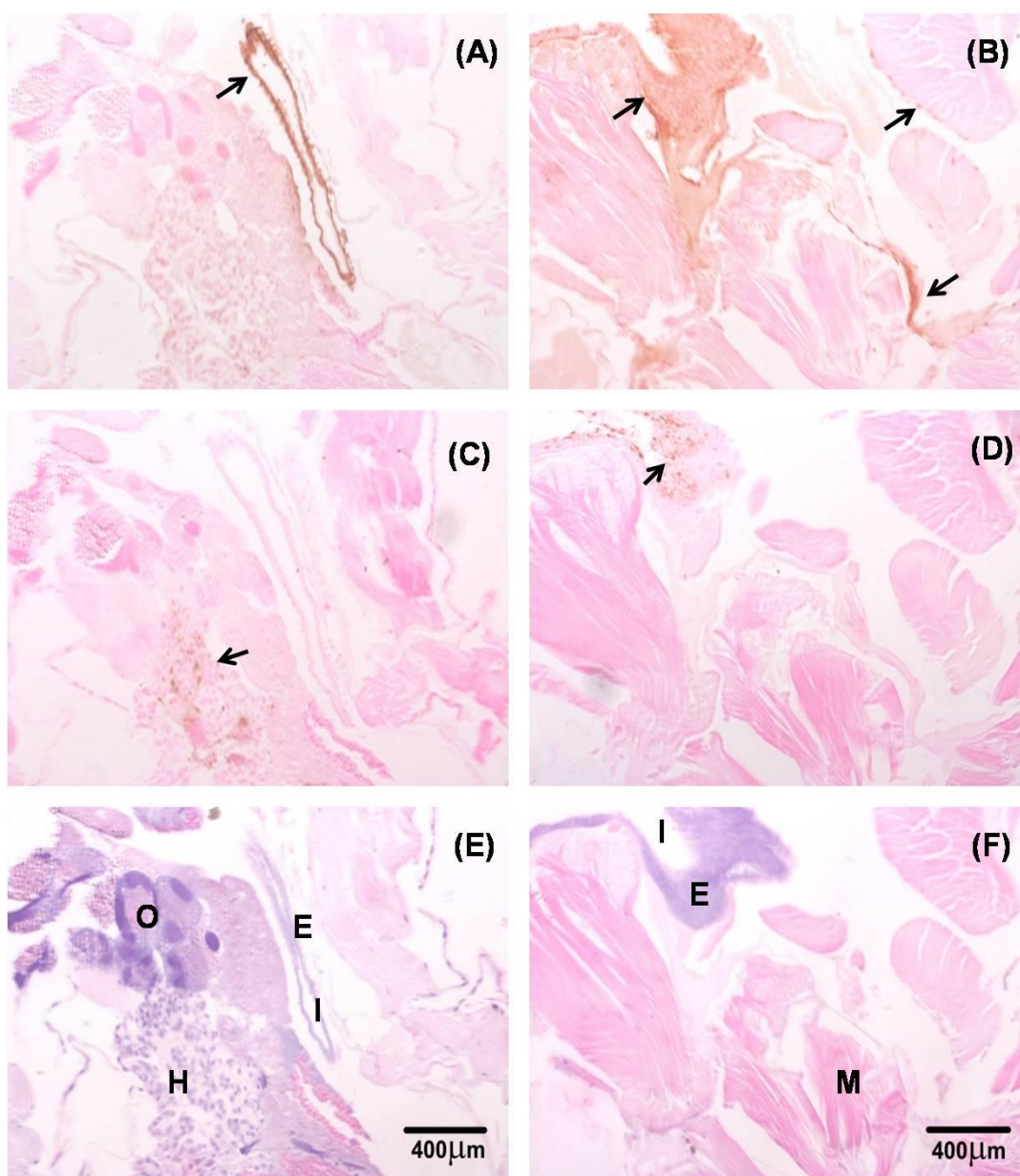
² AH129 จำเพาะต่อ *A. hydrophila*

³ Ser แอนติซีรัมต่อ *Serratia* sp.

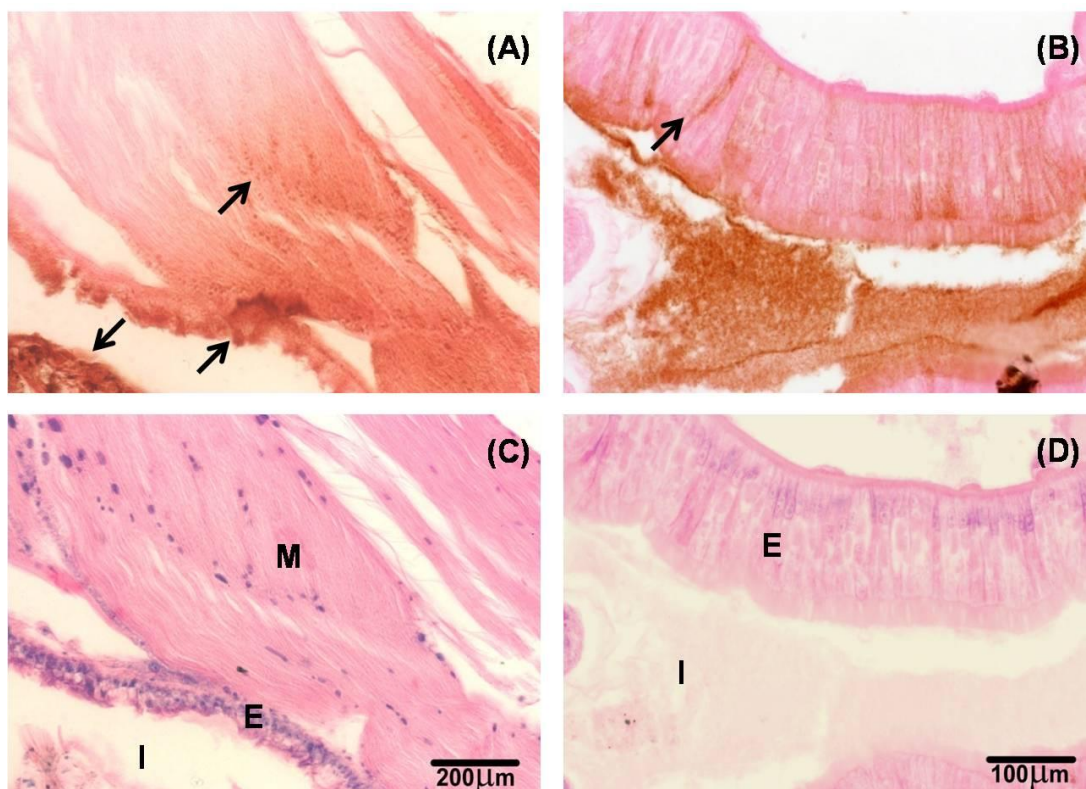
⁴ Ps แอนติซีรัมต่อ *Pseudomonas* spp.

⁵ Fla แอนติซีรัมต่อ *Flavobacterium* sp.

* พบการติดเชื้ออ่อนๆ ใน hemocyte



ภาพประกอบ 10 การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติของโรคน้ำนางฟ้าไทยจาก KKU โดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (A, B); AH413 และแอนติซีรัมต่อ (C); *Pseudomonas* spp., (D); *Serratia* sp. และ (E, F); ที่ย้อมด้วย H&E ในเซกชันติดต่อกันจากโรคน้ำนางฟ้าไทยตัวเดียวกัน โดยพบการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในเยื่อบุผิวทางเดินอาหารและกล้ามเนื้อ (A และ B) และพบการติดเชื้ออ่อนๆ ของ *Pseudomonas* spp. ใน hemocyte (C) และพบ *Serratia* sp. ในเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (D), I = ช่องทางเดินอาหาร, E = เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร, H = hemocyte, O = ovum และ M = กล้ามเนื้อ



ภาพประกอบ 11 การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติของโรคน้ำนางฟ้าไทยจาก SPCAT โดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (A); AH413 และ (B); anti-*Flavobacterium* antiserum หรือ (C, D); ย้อมด้วย H&E พบการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ในอาหารในช่องทางเดินอาหาร (I), เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (E) และกล้ามเนื้อ (M) และการติดเชื้อ *Flavobacterium* sp. ในช่องทางเดินอาหารและในเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร

บทที่ 5

การสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการรวบรวมโรคน้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำจาก 2 แหล่งในระยะเวลา 2 ปี ได้แก่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (KKU) และวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี (SPCAT) พบว่าโรคน้ำนางฟ้าไทยที่รวบรวมได้จากทั้ง 2 แหล่ง (ตาราง 7) แสดงอาการจุดดำไม่แตกต่างกัน โดยพบปมสีดำที่บริเวณขาว่ายน้ำเป็นส่วนใหญ่ และพบที่บริเวณหนวดและหางเป็นส่วนน้อย จากผลการสังเกตพบว่า อาการของการเกิดจุดดำไม่มีความแตกต่างกันใน ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากทั้ง 2 แหล่ง ซึ่งลักษณะอาการและบริเวณที่พบจุดดำนั้นคล้ายกับรายงานของเดอร์คเคน (Diercken; et al. 1998) และหนูเดือน เมืองแสน (2549)

การเกิดปมปมสีดำ (melanin formation) เป็นผลจากกลไกการป้องกันผ่านกระบวนการ prophenoloxidase activating system (proPO system) เมื่อได้รับโมเลกุลแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย เช่น lipopolysaccharides, peptidoglycans และ 1,3-glucans ทำให้เกิดการทำงาน cascade ของ serine proteinase ไปกระตุ้นให้ proPO-activating enzyme (PPAE) ให้อยู่ในรูป active และกระตุ้น prophenoloxidase ให้เป็น active enzyme (phenoloxidase) โดยเกิดการ oxidize phenol ไปเป็น quinones และ autocatalyze เป็น melanin ที่ห่อหุ้ม (capsule) หรือปมปม (nodule) ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียไว้ ซึ่งจะพบได้ในกระบวนการตอบสนองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายกลุ่ม (Jiravanichpaisal; et al. 2006: 213–236)

จากการคัดเลือกและแยกเชื้อ แบคทีเรีย จากตัวอย่าง โรคน้ำนางฟ้า ไทย ที่ยังมีชีวิต และมีอาการจุดดำทั้งหมด 4 ครั้งจาก 2 แหล่ง KKU และ SPCAT ในระยะเวลา 2 ปี สามารถแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีรูปท่อนดัดสี่แฉกกลม จากนั้นทำการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และเมื่อนำมาทำการจัดจำแนกกลุ่มโดยอาศัยหลักการที่อธิบายไว้ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt; et al. 1994) ทำให้สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *Serratia* sp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ภายในกลุ่ม *Aeromonas* spp. ที่แยกได้ระบุออกเป็น 2 ชนิด คือ *A. hydrophila* และ *A. sobria* ซึ่งพบทุกครั้งและทุกแหล่ง แต่แบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Serratia* sp. แยกได้จาก KKU ครั้งแรกในปี ค.ศ. 2008 เท่านั้น ส่วน *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. สามารถแยกได้จาก KKU และ SPCAT ในปี ค.ศ. 2009 เท่านั้น (ตาราง 9) ดังนั้นจะเห็นว่า *Aeromonas* sp. ทั้ง 2 ชนิด น่าจะเป็นเชื้อหลักในการก่ออาการจุดดำในโรคน้ำนางฟ้าไทย

จากการรวบรวมโรคน้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำจากแหล่งที่แตกต่างกัน 2 แหล่ง ได้แก่ KKU และ SPCAT มาทำการตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าจากทั้ง 2 แหล่งสามารถตรวจพบ immunoreactivity ของ *Aeromonas* spp. ในช่องทางเดินอาหารได้

เป็นส่วนใหญ่ และพบการติดเชื้อบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร และกล้ามเนื้อ ในขณะที่ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่น ได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. บริเวณกล้ามเนื้อ หรือพบแต่การติดเชื้อ บริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร และมี immunoreactivity ค่อนข้างอ่อน แสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรียน้อยมากที่ บริเวณช่องทางเดินอาหาร นอกจากนี้ เนื่องจากไร่น้ำนางฟ้าไทยเป็น filter-feeder ดังนั้นการสะสมของแบคทีเรียจึงถูกสะสมเข้าสู่ทางเดินอาหารในปริมาณสูงถึงแม้แบคทีเรียจะปรากฏในสิ่งแวดล้อมในปริมาณที่แตกต่างกันก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่มักจะพบการติดเชื้อร่วมกับ *Aeromonas* spp. จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. รุนแรงมากกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ

จากการตรวจการติดเชื้อของไร่น้ำนางฟ้าไทยที่แสดงอาการจุดดำ พบการติดเชื้อเพียงบางส่วน 17/30 จาก KKU และ 31/40 จาก SPCAT ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่ไม่พบการติดเชื้อนี้อาจเนื่องมาจากไร่น้ำนางฟ้าไทยที่แสดงอาการจุดดำบางตัวเป็นไร่น้ำนางฟ้าที่เก็บรวบรวมขณะยังมีชีวิต และมีการกำจัดแบคทีเรียที่ลุกลามเข้าสู่ร่างกายได้สำเร็จและฟื้นตัวจากการติดเชื้อแล้ว โดยจะเห็นจาก immunoreactivity ของเชื้อต่างๆ ทั้ง 3 กลุ่ม และ *Aeromonas* spp. ในบางตัวพบ immunoreactivity ค่อนข้างอ่อนกว่ามากในไร่น้ำนางฟ้าไทยที่ชักนำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในไร่น้ำนางฟ้าไทยบางตัวพบ immunoreactivity อ่อนๆ ของ *Pseudomonas* spp. ใน hemocyte ซึ่งคาดว่าเกิดจากการทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยกระบวนการ phagocytosis ที่ยังไม่สมบูรณ์

นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติ ซีรัมที่ผลิตยังไม่ครอบคลุมแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่แยกได้ ได้แก่โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 ไม่สามารถจับกับ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างไร่น้ำนางฟ้าไทยที่เก็บจาก KKU ในครั้งที่ 1 และ 2 คือ ไอโซเลตลำดับที่ 1 และ 9 ถึง 12 และจาก SPCAT ในครั้งที่ 3 คือลำดับที่ 32 และ anti-*Pseudomonas* antiserum ไม่สามารถจับกับ *Pseudomonas* spp. อีก 2 ไอโซเลตคือลำดับที่ 33 และ 34 (ตาราง 10) ดังนั้นไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีการติดเชื้อ *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ไอโซเลตดังกล่าวอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่สามารถตรวจพบโดยกระบวนการ immunohistochemistry

ผลที่ได้จากการทดลองนี้มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Diercken; et al. (1998) ที่แยกแบคทีเรียจากไร่น้ำจืด 3 ชนิดที่เป็นโรคจุดดำจากโรงเพาะเลี้ยงในประเทศเบลเยียมโดยพบแบคทีเรีย 5 กลุ่ม คือ *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Comamonas testosteroni*, *Aeromonas* sp. และ *Flavobacterium* sp. แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการก่ออาการจุดดำอาจจะพบว่ามี ความแตกต่างกันไปตามแต่สภาพแวดล้อมแต่ก็เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (*Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp.) ซึ่งมักจะพบได้ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป ส่วนในกลุ่มของ *Serratia* sp. เคยมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสามารถแยก *Serratia* sp. ได้จากไร่น้ำจืด *Branchinella spinosa* ซึ่งเป็น microflora ที่พบได้ในช่องทางเดินอาหาร (digestive tract) บริเวณ hindgut (Ampe; & Thieèry. 1998: 201-205)

เมื่อทำการพิสูจน์ทราบชนิด ของแบคทีเรียที่แยกได้โดยวิธีทางชีวเคมี พบว่าไอโซเลต ที่แยกได้ส่วนใหญ่ (21/36) เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* spp. และพบว่าสามารถระบุเป็น *A. hydrophila* และ *A. sobria* ได้ 12 และ 9 ไอโซเลตตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีในการระบุชนิดภายในกลุ่ม *Aeromonas* spp. เนื่องจากสมบัติความแตกต่างที่จะใช้แยกออกจากกันในแต่ละสปีชีส์มีจำนวนน้อยและภายในกลุ่มเองก็มีความแปรปรวนในการแสดงสมบัติทางชีวเคมีที่ใช้ทดสอบทำให้เป็นการยากที่จะแยก ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้น จึงได้เลือกใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396, AH413 และ AH129 ที่มีความจำเพาะกับ *Aeromonas* spp. และ *A. hydrophila* ในการศึกษาและสนับสนุนการทดลอง

จากผลการทดลองการพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้โดยวิธีทางชีวเคมี มีความสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี dot blotting โดยทุกไอโซเลตที่ระบุให้ *Aeromonas* spp. สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 และ AH413 ที่จำเพาะกับ *Aeromonas* spp. และที่ระบุเป็น *A. hydrophila* สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 ที่มีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* ได้ ยกเว้น 2 ไอโซเลต คือ 1 และ 28 (ตาราง 10) ซึ่งจะจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 และจับกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 กับ AH396 ตามลำดับ และภายในกลุ่ม *A. hydrophila* ที่ให้ผลการใช้กรดอะมิโน Arginine, Ornithine และ Lysine decarboxylase เป็นบวก, ลบ และบวกตามลำดับ สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 ที่มีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* ได้เป็นส่วนใหญ่ (ตาราง 9) แต่ยังไม่ครบทุกไอโซเลต เนื่องจากสมาชิกของ *A. hydrophila* และ *A. sobria* มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงมาก

แม้ว่าผลชีวเคมีของไอโซเลตอ้างอิง AH 22098 จะให้ผล Lysine decarboxylase (LDC) เป็นลบ แต่ในรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *A. hydrophila* ให้ผล LDC เป็นบวก (Abbott; Cheung; & Janda. 2003: 2348–2357) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ให้ผลระบุเป็น *A. hydrophila* และสามารถจับกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 ได้ แต่อย่างไรก็ตามในรายงานของ เนลเซน (Nielsen; et al. 2001) พบว่าไอโซเลตของ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลาและปู ให้ผลการใช้ LDC เป็นลบ และก็พบความหลากหลายของการใช้น้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาใน *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นๆ ที่แยกได้ในครั้งนี้ ที่ให้สมบัติทางชีวเคมีและการจับกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีรูปแบบที่แตกต่างกันออกไปในไอโซเลตต่างๆ กัน และที่ระบุเป็น *A. sobria* สามารถจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH413 หรือ AH396 ได้ และไม่จับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH129 และภายในกลุ่มของ *A. sobria* ให้ผล arabinose เป็นลบทุกไอโซเลต ซึ่งตรงกับผลชีวเคมีของไอโซเลตอ้างอิง AS 22099 และสอดคล้องกับรายงานของ Abbott; Cheung; & Janda ในปี ค.ศ. 2003

จากผลความผันแปรของสมบัติทางชีวเคมีที่พบได้ภายในกลุ่ม *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากไร่นานางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำ อาจเนื่องมาจากการเลือกใช้แบบแผนการอ่านผลสมบัติทางชีวเคมีซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นผลที่ได้ในการทดสอบตัวอย่างทางการแพทย์ แต่ในการแยกจากตัวอย่าง

สิ่งแวดลอมมักแยกไอโซเลตที่มีสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามในการทดลองยังคงสามารถแยก *A. hydrophila* และ *A. sobria* ได้จาก esculin ซึ่งทั้ง 2 สปีชีส์จะให้ผลที่แตกต่างกันคือ บวก และ ลบ ตามลำดับ

จากผลการผลิตแอนติซีรัมที่ได้จาก ปลุกภูมิคุ้มกันหนู ด้วยแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่แยกได้จากโรแนนางฟ้าไทยยกเว้น *Aeromonas* spp. ซึ่งมีด้วยกัน 3 กลุ่ม คือ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. (ตาราง 8) เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี dot blotting พบว่าสามารถจับกับไอโซเลตที่ใช้ในการปลุกภูมิคุ้มกันและมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม อีกทั้งสามารถจับกับไอโซเลต *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ที่แยกได้ในครั้งที่ 3 ซึ่งไม่ได้เป็นไอโซเลตที่ใช้ในการปลุกภูมิคุ้มกัน (ตาราง 10 และ ภาพประกอบ 7) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแอนติซีรัมต่อ *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. ได้แต่อาจจะยังไม่ครอบคลุมทุกไอโซเลต ภายในกลุ่ม ของแบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งที่ 3 (ตาราง 10) อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบด้วยวิธี dot blotting แสดงให้เห็นว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความจำเพาะสูงและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกันระหว่างกลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้จากโรแนนางฟ้าไทย (ภาพประกอบ 8)

ในการทดลองการตรวจ การติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อโรแนนางฟ้าไทย พบว่าแอนติโคลนอลแอนติบอดี ได้แก่ AH129, AH413 และ AH396 จะสามารถตรวจ *Aeromonas* spp. ได้ด้วยวิธี dot blotting แต่พบว่ามีเฉพาะแอนติโคลนอลแอนติบอดี AH129 และ AH413 เท่านั้นที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อได้ด้วยวิธี immunohistochemistry แต่ AH396 ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล . 2552) ในทำนองเดียวกัน แอนติซีรัมต่อแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม จากการนำแอนติซีรัมที่ผลิตได้มาทดสอบความสามารถในการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียในโรแนนางฟ้าไทยที่ชักนำให้ติดเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี immunohistochemistry พบว่าแอนติซีรัมของทั้ง 3 กลุ่ม สามารถตรวจพบ immunoreactivity บริเวณช่องทางเดินอาหารของโรแนนางฟ้าไทยที่ชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 3 กลุ่ม และพบการติดเชื้อบริเวณเยื่อบุผิวทางเดินอาหารของเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. แต่ไม่พบใน *Serratia* sp. นอกจากนี้ยังเป็นการยืนยันได้ว่า แอนติซีรัม ที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

อย่างไรก็ตามพบว่าโรแนนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำที่เก็บได้จาก KKU พบ immunoreactivity กับแอนติ ซีรัม ในกลุ่ม *Serratia* sp. และ *Pseudomonas* spp. แต่ไม่พบ immunoreactivity กับแอนติซีรัมในกลุ่ม *Flavobacterium* sp. โดยพบการติดเชื้อ *Serratia* sp. บริเวณ เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร ในขณะที่ พบการติดเชื้อ *Pseudomonas* spp. ใน hemocyte (ตาราง 12) แต่ในตัวอย่างจาก SPCAT ตรวจพบ immunoreactivity กับแอนติซีรัมในกลุ่ม *Flavobacterium* sp. เพียงกลุ่มเดียว ในขณะที่ไม่พบ immunoreactivity กับแอนติซีรัมในกลุ่ม

Serratia sp., และ *Pseudomonas* spp. (ตาราง 12) แต่พบการติดเชื้อ *Flavobacterium* sp. เข้าสู่เยื่อหุ้มทางเดินอาหาร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะของแหล่งน้ำที่แตกต่างกันและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในแหล่งน้ำในขณะนั้นที่อาจมากพอทำให้มีการติดเชื้อได้ นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากไอโซเลตของแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ ที่แยกได้ในครั้งที่ 3 และ 4 ไม่ได้นำไปใช้ในการปลูกหมักร่วมกันให้กับหนู ทำให้แอนติซีรัมที่ผลิตได้อาจจะยังไม่ครอบคลุมกับทุกไอโซเลตของแบคทีเรียในทุกกลุ่ม เช่น แอนติซีรัมจำเพาะต่อ *Pseudomonas* spp. ไม่สามารถจับกับไอโซเลต *Pseudomonas* spp. ที่แยกได้ในครั้งที่ 3 และ 4 จำนวน 2 ไอโซเลต (ตาราง 10) ส่วนตัวอย่างที่ได้จาก SPCAT ไม่พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Serratia* sp. ในการแยกแบคทีเรียในครั้งที่ 3 และ 4 อาจเป็นไปได้ว่าในการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry ในตัวอย่างจากแหล่งดังกล่าว ทำให้ไม่พบ immunoreactivity กับแอนติซีรัมในกลุ่ม *Serratia* sp. และ *Pseudomonas* spp. (ตาราง 12)

จากการ ศึกษา อัตราการตายสะสมของ ไร่นางฟ้าไทย โดยชักนำให้มีการติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *Serratia* sp. พบว่าทำให้ไร่นางฟ้าไทยมีอัตราการตายสะสมไม่แตกต่างกัน และก่อให้เกิดอาการจุดดำได้ในเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตรวมถึงในกลุ่มควบคุม (ไม่แสดงผลการ ทดลอง) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติในไร่นางฟ้าไทยโดยวิธี immunohistochemistry ที่สามารถตรวจพบการเกิด immunoreactivity ที่บริเวณช่องทางเดินอาหารหรือการ ติดเชื้อเข้าสู่บริเวณเยื่อหุ้มทางเดินอาหาร ของแบคทีเรียได้ในทุกกลุ่ม ซึ่ง แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียทุกกลุ่มที่แยกได้จากไร่นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาส ติดเชื้อร่วมกับ *Aeromonas* ซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับสุขภาพของไร่นางฟ้าที่อ่อนแอหรืออายุของไร่นางฟ้า เนื่องจากการพักตัวของตัวอ่อนในสภาพแวดล้อมธรรมชาติไม่พร้อมกันและ วงจรชีวิตของไร่นางฟ้าสั้น มีช่วงชีวิต ประมาณ 21-29 วัน (นุกูล แสงพันธุ์; และ ราเมศ ชูลสิงห์. 2549: 32-37) ดังนั้นไร่นางฟ้าไทยที่มีอายุน้อยมากจึงอ่อนแอและมีโอกาสติดเชื้อต่างๆ มากกว่าไร่นางฟ้าไทยที่มีอายุน้อยกว่า หรือขึ้นอยู่กับความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียที่ลุกลามเข้าสู่ทางเดินอาหารและป้องกันไม่ให้แบคทีเรียลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อหุ้มทางเดินอาหารและภายในร่างกายได้ ทำให้สามารถพบอาการจุดดำได้ในแบคทีเรียทุกกลุ่มในการทดลอง

จะเห็นว่าการทดลองครั้งนี้ การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรียในไร่นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* และ *Aeromonas* spp. และแอนติซีรัมต่อเชื้อแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มที่แยกได้จากไร่นางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำได้แก่ *Serratia* sp., *Pseudomonas* spp. และ *Flavobacterium* sp. สามารถยืนยันผลจากการตรวจการติดเชื้อ *Aeromonas* ในไร่นางฟ้าไทยที่คาดว่าจะสาเหตุหลักในการก่ออาการจุดดำ และ การพิสูจน์ทราบชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่นางฟ้าที่มีอาการจุดดำด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี dot blotting ก็สามารถช่วยในการยืนยันผลร่วมกับวิธีทางชีวเคมีได้เช่นกัน

ประโยชน์ของการวิจัย

การเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าไทยเริ่มมีความสำคัญในทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้น เนื่องจาก ส่วนหนึ่งสามารถทดแทนการนำเข้า *Artemia* ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากคิดเป็น มูลค่าไม่ต่ำกว่าปีละ 500 ล้านบาท แต่อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าประสบปัญหาการเกิดอาการจุดดำที่ทำให้ลดมูลค่าทางเศรษฐกิจและปริมาณการผลิต การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดอาการจุดดำในไร่น้ำนางฟ้าไทยได้ ซึ่งจากผลการทดลองทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* spp. น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดอาการจุดดำ เพราะมีการตรวจพบการติดเชื่อในปริมาณมากกว่าเชื่อในกลุ่มอื่นๆ จากข้อมูลเบื้องต้นก็จะช่วยในการจัดการคุณภาพ น้ำและควบคุมปริมาณของเชื้อ *Aeromonas* spp. และเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ ที่เป็นสาเหตุหลักในแหล่งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้าไทยได้

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการจุดดำ ไม่สามารถทราบผลที่แน่นอนได้อาจเนื่องมาจาก

1. ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถควบคุมช่วงอายุให้เท่ากันได้เนื่องจากพฤติกรรมการฟักตัวของตัวอ่อนตามธรรมชาติที่ไม่พร้อมกัน และไร่น้ำนางฟ้าไทย มีอายุสั้นทำให้ไร่น้ำนางฟ้าไทยที่ทดลองมีความแข็งแรงและอ่อนแอที่ไม่เท่ากัน
2. ไร่น้ำนางฟ้าไทยเป็น filter-feeder ถึงแม้จะมีเชื่อปริมาณน้อยก็สามารถจะมีการสะสมภายในร่างกายในปริมาณสูงได้
3. ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ลงไป ในน้ำในแต่ละความเข้มข้นมีโอกาสรอดหรือ แบ่งเซลล์ได้ไม่เท่ากัน โดยการใส่เชื่อในปริมาณสูงอาจจะมีตายเกิดขึ้นหรือการใส่เชื่อในปริมาณน้อยก็อาจจะมีการเพิ่มขึ้นได้ส่งผลให้ปริมาณเชื่อแบคทีเรียไม่คงที่
4. ในการทดลองไร่น้ำนางฟ้าไทยที่นำมาใช้ในการทดลองไม่สามารถควบคุมไร่น้ำนางฟ้าไทยที่ปราศจากเชื่อได้แน่ นอก ซึ่งอาจจะมีการติดเชื่อมาแล้วจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่เพาะพันธุ์ขาย ทำให้สามารถพบไร่น้ำนางฟ้าไทยที่มีอาการจุดดำและตายได้ในการทดลองของกลุ่มควบคุม

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. (2552). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila* ปริณูณานิพนธ์ วท .ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2528). โรคปลา (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- นุกุล แสงพันธุ์; และ ละออศรี เสนาะเมือง. (2547). การเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้า. ศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นุกุล แสงพันธุ์; โฆษิต ศรีภูธร; และ ละออศรี เสนาะเมือง. (2549). ไร่น้ำนางฟ้า: จี๊แต่แจ้ว. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.
- นุกุล แสงพันธุ์; และ ราเมศ ชูสิงห์. (2549). ความหลากหลายชนิดและการแพร่กระจายของไร่น้ำนางฟ้าใน ต. ห้วยเขย่ง คณะวิชาประมง วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี. รายงานการวิจัย BRT: 32-37.
- บพิตร จารุพันธุ์; และ นันทพร จารุพันธุ์. (2546). สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II แอนเนลิดา ถึง โพรโทคอร์ดาตา. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พุทธพรณี บุญมาก; นุกุล แสงพันธุ์; และ ละออศรี เสนาะเมือง. (2550). ชีววิทยาและความตกไข่ ไร่น้ำนางฟ้าสีรินทร์และไร่น้ำนางฟ้าไทย. วารสารวิจัย มข. 12 (2) : 125-131.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- ละออศรี เสนาะเมือง; และคนอื่นๆ. (2543). ความหลากหลายชนิดและการแพร่กระจายของไร่น้ำนางฟ้าในประเทศไทย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รายงานการวิจัย BRT.
- หนูเดือน เมืองแสน; สุวรรณ เนียมสนธิ; และ สุรศักดิ์ ศิริพรดูลศิลป์. (2549). โรคจุดดำของไร่น้ำนางฟ้าและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง. วารสารวิจัย มข. 11 (1): 39-45.
- หนูเดือน เมืองแสน; และ จิตติพร สุวรรณาลัย. (2551). การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในการระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากไร่น้ำนางฟ้า. วารสารวิจัย มข. 36 (1): 59-66.
- อนันต์ ต้นสุตะพานิช; และคนอื่นๆ. (2536). คู่มือการเพาะเลี้ยงและการใช้ประโยชน์จากอาร์ทีเมีย. กองส่งเสริมการประมง กรมประมง.
- Abbott, S.L.; Cheung W.K.W.; & Janda J.M. (2003). The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. microbial.* 41: 2348–2357.

- Ampe, F.; & Thie ry, A. (1998). Microflora associated with the digestive tract of the fairy shrimp *Branchinella spinosa* (H. Milne Edwards, 1840). *FEMS Microbiol. Lett.* 158: 201-205.
- Asao, T.; et al. (1984). Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.* 46: 122-127.
- Austin, D.A.; McIntosh, D.; Austin, B. (1989). Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov. *Syst. and Appl. Microbiol.* 11: 277–290.
- Awong-Taylor, J.; et al. (2008). Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of bacterial isolates associated with failed loggerhead sea turtle eggs. *Original article. J. Appl. Microbiol.* 104: 1244-125.
- Barghouthi, S.; et al. (1989). Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 171: 1811-1816.
- Bernheimer, A.W.; & Avigad, L.S. (1974). Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 9: 1016-1021.
- Baron, E.J.; & Finegold, S.M. (1990). Bailey & Scott's: Diagnostic Microbiology, 8th ed., C.V. Mosby Com: 437.
- Bhakdi, S.; & Trn um-Jensen, J. (1988). Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Prog. Allergy* 40: 1-43.
- Bloch, S.; & Monteil, H. (1989). Purification and characterization of *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin. *Toxicon* 27: 1279-1287.
- Borrell, N.; et al. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1671–1674.
- Campbell, L.M.; et al. (1976). Isolation of *Klebsiella pneumoniae* from lake water. *J. Microbiol.* 229(12): 1762-1767.
- Carrello, A.; et al. (1988). Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.* 26: 19-27.
- Capitani, G.; et al. (2006). Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and Infect.* 8: 2284-2290.
- Colwell, R.R.; MacDonell, M.T.; & De Ley, J. (1986). Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 473-477.

- Dierckens, K.R.; et al. (1998). *Aeromonas hydrophila* causes black disease in fairy shrimps (Anostraca; Crustacea). *J. Fish Dis.* 21(2): 113-119.
- Ghenghesh, K.S.; et al. (2008). *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Review Article J. Infect Devel. Countries.* 2(2): 81-98.
- Hatha, M.; et al. (2005). Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *Inter. J. Food Microbiol.* 98: 131–134.
- Ho, A.S.Y.; et al. (1990). The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated "mini pilin." *J. Exp. Med.* 172: 795-806.
- Holt; et al. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., Waverly Com.
- Honma, Y.; & Nakasone, N. (1990). Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. *Microbiol. Immun.* 34: 83-98.
- Howard, S.P.; et al. (1987). Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 169: 2869-2871.
- Howard, S.P.; & Buckley, J.T. (1985). Activation of the Hole-forming Toxin Aerolysin by Extracellular Processing. *J. Bacteriol.* 163: 336-340.
- Janda, J.M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Reviews* 4: 397–410.
- Janda, J.M.; & Abbott, L.H. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered question. *Clin. Infec. Dis.* 27: 332-344.
- Jiravanichpaisal, P.; et al. (2009). A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Invert. Pathology. Article in press*: 1-11.
- Jiravanichpaisal, P.; Lee, B.L.; Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immun.* 211: 213–236.
- Kozin'ska, A.; et al. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) *J. Appl. Microbiol.* 93: 1034–1041.
- Leung, K.Y.; & Stevenson, R.M.W. (1988). Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 151-160.

- Ljungh, A.; Wretling, B.; & Mollby, R. (1981). Separation and characterization of enterotoxin and two hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. 89*: 387-397.
- Nielsen, M.E.; et al. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?. *Dis. Aqua. Organism*, 46: 23–29.
- Niemi, M.; Sibakov, M.; & Niemela, S. (1983). Antibiotic resistance among different species of faecal coliforms isolated from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* (45)1: 79-83.
- Paniagua; et al. (1990). Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) or motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.* 28: 350–355.
- Pemberton, J.M.; Kidd, S.P.; & Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *Mini Review FEMS Microbiol. Lett.* 152: 1-10.
- Purivirojkul, W., & Khidprasert S. (2009). First report of microsporidiosis in fairy shrimp *Branchinella thailandensis* (Sanoamuang, Saengphan and Murugan, 2002) *Aquaculture* 289: 185–190.
- Sanoamuang; et al. (2000). *Streptocephalus sirindhornae*, new species of freshwater fairy shrimp (Anostraca) from Thailand. *J. Crustacean Biology* 20(3): abstract.
- Sanoamuang, L., Saengphan, N.; & Murugan, G. (2002). First record of the family Thamnocephalidae, (Crustacea, Anostraca) from Southeast Asia and description of a new species of Branchinella. *Hydrobiologia* 486: 63-69.
- Saengphan, N.; Shiel, R.J.; & Sanoamuang, L. (2005). The cyst hatching pattern of the Thai fairy shrimp, *Branchinella thailandensis* Sanoamuang, Saengphan and Murugan, 2002 (Anostraca). *Crustacean* 78(5): 513-523.
- Starr, M.P.; et al. (1981). *The prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, Springer-Verlag Vol II: 1293.
- Thelestam, M.; & Ljungh, A. (1981). Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha and beta hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 34: 949-956.

- Thune, R.L.; et al. (1982). Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effects on age-0 channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 111: 749-754.
- Timms, B.V; & Geddes, M.C. (2003). The fairy shrimp genus *Branchinella* Sayce, 1903 (Crustacea:Anostraca: Thamnocephalidae) in south Australia and the northern territory including descriptions of three new species. *Trans. of the Royal Soc. of S. Aust.* 127(1): 53-68.
- Yáñez, M.A.; et al. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Inter. J. of Sys. and Evo. Microbiol.* 53: 875–883.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.20	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1000.00	มิลลิลิตร

2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.00	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.00	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลท (Merthiolate) เข้มข้น 1% (Sigma)	1.00	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.10	มิลลิลิตร

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โรซอล (Thimerosal) (Sigma)	1.00	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	100.00	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย

แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) สำหรับ การทดลองด้วยวิธี dot blotting และ immunohistochemistry

1. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง (C. Kanlaya; et al. 2008)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี	ความจำเพาะ	IHC
AH 396	AH, AS, AC, AJ, AV	-
AH 413	AH, AS, AC, AV ยกเว้น AH2, AH11, AS 12	+++
AH 129	AH1,3,4,5,6,8,9,10, AC17, 6	+++

AH; *A. hydrophila*, AS; *A. sobria*, AC; *A. caviae*, AV; *A. veronii* และ AJ; *A. jandaei*

2. แอนติซีรัมที่ใช้ในการทดลอง

แอนติซีรัม	ความจำเพาะ *
<i>Serratia</i> sp.	5-8
<i>Pseudomonas</i> spp.	16-21 และ 35
<i>Flavobacterium</i> sp.	22 และ 36

* ตาราง 10

ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.00	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	100.00	มิลลิลิตร

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	30.00	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100%	20.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.00	มิลลิลิตร

3. สารละลาย Calf serum 10% (P₁)⁺

Calf serum	10.00	มิลลิลิตร
PBS	90.00	มิลลิลิตร

4. สี Enrilich's acid hematoxylin

สี Hematoxylin	8.00	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	400.00	มิลลิลิตร
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.00	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	400.00	มิลลิลิตร

5. สี Eosin Y 0.2% ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.20	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	100.00	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

การเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลา (น้ำเขียว)

คลอเรลลา (*chlorella* sp.) เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว ขนาดเล็ก จัดเป็นแพลงก์ตอนพืชมีขนาด 2.5-3.5 ไมโครเมตร จึงนิยมใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน รวมทั้งไร่น้ำนางฟ้า

การเพาะเลี้ยงคลอเรลลาดำเนินการดังนี้

1. เตรียมบ่อซีเมนต์เส้นผ่านศูนย์กลาง 100 เซนติเมตรทำความสะอาดและตากบ่อทิ้งไว้ อย่างน้อย 1 วัน

2. เติมน้ำลงไปให้ได้ระดับความลึก 20 เซนติเมตร หรือมีปริมาตร 150 ลิตร

3. เตรียมสูตรอาหาร ดังนี้

ยูเรีย 46-0-0 30.00 กรัม

ปุ๋ย 16-20-0 15.00 กรัม

รำอ่อน 50.00 กรัม

ปูนขาว 9.00 กรัม

4. เติมน้ำลงในส่วนผสม แล้วคนให้ละลายในภาชนะขนาดเล็กก่อนแล้วจึงเทสารละลาย ของส่วนผสมลงบ่อซีเมนต์

5. จากนั้นกรองหัวเชื้อสาหร่ายคลอเรลลาประมาณ 20-40% ของปริมาตรน้ำในบ่อ (30-60 ลิตร) เทผสมให้เข้ากันหมั่นคนทุกวัน ทิ้งให้น้ำเขียวถูกแสงแดด และให้ฟองอากาศ ตลอดเวลาเพื่อเพิ่มการหมุนเวียนของน้ำ

6. เมื่อน้ำเขียวอายุประมาณ 5-7 วัน กรองด้วยผ้ากรองขนาดตาไม่เกิน 60 ไมโครเมตร ก่อนนำมาเลี้ยงไร่น้ำนางฟ้า

หมายเหตุ การเพาะน้ำเขียวกรณีที่อายุเกิน 2 สัปดาห์ มักจะพบน้ำเขียวเริ่มตาย และมีกลิ่นเหม็น ถ้าเติมน้ำหมักชีวภาพ อัตรา 1:150-200 จะทำให้น้ำเขียวสามารถเจริญเติบโตได้อีก 1-2 สัปดาห์ การเติมน้ำหมักชีวภาพเป็นการเติมสารอาหาร และช่วยย่อยของเสียในบ่อยืดยอายุ ของน้ำเขียว (นุกูล แสงพันธุ์, โฆษิต ศรีภูธร, และละออศรี เสนาะเมือง. ไร่น้ำนางฟ้าจิวแต่แจ๋ว. 2549: 53-54)

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	รัตชนก ศิริคะรินทร์
วันเดือนปีเกิด	27 มกราคม 2529
สถานที่เกิด	พัทลุง
สถานที่อยู่	49/48 อาคารร่วมน้ำใจ ถ.สุขุมวิท 101/1 ซ.วชิรธรรมสาธิต 6 เขตบางนา แขวงบางนา กรุงเทพฯ 10260
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	—
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	—
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2550	วท.บ. (จุลชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2552	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ