



ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวันต่อการเจริญเติบโตและการผลิต
токсин Pir ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์
ก่อโรค Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)
**Effect of Diurnal Temperature Change on Growth and Pir
Toxin Production of *Vibrio parahaemolyticus* Causing Acute
Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)**

นิอร จิรพงษ์อรกุล^{1*} อรณิชา รัตนภรณ์² พงศ์พันธุ์ แพรกทอง^{1,3} และกิตติชนม์ อุเทนะพันธ์¹

Received: May, 2018; Accepted: June, 2018

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวของประเทศไทยประสบกับปัญหาโรคระบาด Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 เป็นต้นมา ทำให้ผลผลิตกุ้งขาวลดลงเป็นจำนวนมาก โดยสาเหตุของโรค AHPND คือ การติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดและยีนผลิต毒素 Photorhabdus Insect-related (Pir) A และ Pir B ซึ่งมีรายงานวิจัยที่แสดงถึงอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงต่อการแพร่ระบาดของโรค การวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวในรอบวัน รวมถึงผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวันต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND จากผลการสำรวจอุณหภูมิน้ำในรอบวันในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดนครศรีธรรมราช ในปี พ.ศ. 2560 สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวันเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ (1) การเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิปกติ (24 - 30 °C) (2) การเปลี่ยนแปลง

¹ Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya

² Faculty of Science, Prince of Songkla University

³ Pak Panang Basin Royal Fisheries Development Center

* Corresponding Author E - mail Address: nim_nion@hotmail.com

ในช่วงอุณหภูมิต่ำ (22 - 27 °C) และ (3) การเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิผันแปร (22 - 30 °C) และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ ทั้ง 3 รูปแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและอัตราการเจริญจำเพาะพบว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียไม่มีความแตกต่าง ในขณะที่อัตราการเจริญจำเพาะมีความแตกต่างกัน และช่วงอุณหภูมิผันแปรโดยเฉพาะช่วงที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 °C ส่งผลให้แบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด นอกจากนี้ผลการศึกษาโปรตีน รวมถึงทอกซิน Pir A และ Pir B ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิส่งผลต่อการเจริญเติบโต การสร้างสารพิษ และอาจรวมถึงความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ผลที่ได้ถือเป็นองค์ความรู้สำคัญสำหรับการจัดการระบบการเลี้ยงหรือการจัดการฟาร์มกุ้งเพื่อลดความสูญเสียจากโรค AHPND

คำสำคัญ : โรค Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND); แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus*; การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวัน; ทอกซิน Photorhabdus insect-related (Pir); อัตราการเจริญจำเพาะ

Abstract

The culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thailand has encountered an acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) since 2013 resulting in a devastating reduction of white shrimp production. The infection of *Vibrio parahaemolyticus* of which strains carrying plasmids with the genes encoding the Photorhabdus insect-related (Pir) A toxin and Pir B toxin are considered as a cause of this epidemic disease. Recently, a number of environmental factors have been reported to influence the spread of disease. This research work aimed to study the variation patterns of water temperature in white shrimp culturing pond throughout the day and night. The effect of the diurnal temperature change on the growth of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* was also determined. After collecting the data of water temperature in white shrimp culturing ponds in 2017, we classified the temperature variation patterns into 3 major groups; (1) normal temperature range (24 - 30 °C), (2) low temperature range (22 - 27 °C) and (3) fluctuating temperature range (22 - 30 °C). These 3 diurnal temperature patterns were set to continually culture *V. parahaemolyticus* strain causing AHPND for 24 h and the comparative analysis of bacterial growth and specific growth rate was performed. The results showed that the bacterial growths were similar while the specific growth rates were different. The fluctuating temperature range especially that of the variation range of 3 °C caused the greatest specific growth rate. Moreover, the produced proteins including Pir A and Pir B toxins in the bacterial culture media in 3 temperature patterns were also determined via SDS-PAGE. The obtained results suggested that the temperature change could affect the growth and toxin production as well as involve in

pathogenicity of AHPND-causing *V. parahaemolyticus*. This knowledge leads to the cultural and farm management practices to efficient reduce losses caused by the AHPND.

Keywords: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND); *Vibrio parahaemolyticus*; Diurnal Temperature Change, Photorhabdus Insect-related (Pir) Toxin, Specific Growth Rate

บทนำ

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รวมถึงบทความทางวิชาการต่าง ๆ ในปัจจุบันได้มีการรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศและอุณหภูมิของโลกรวมถึงผลกระทบที่น่าจะเกิดขึ้นในหลายมิติ [1] นำไปสู่การพัฒนาและการศึกษาถึงผลกระทบต่าง ๆ อย่างจริงจังโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการผลิตอาหาร เนื่องจากอาหารเป็นปัจจัยสำคัญของการดำรงชีวิตของประชากรโลก ซึ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นกิจกรรมหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ เพราะส่วนใหญ่ยังจำเป็นต้องเลี้ยงกลางแจ้ง สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมถือเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดที่สำคัญ และมีอิทธิพลต่อสัตว์น้ำ โดยมีผลกระทบมากต่อการเจริญเติบโตและสภาวะภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

หนึ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นอาชีพสำคัญของเกษตรกรไทยคือ การเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากสถิติของกรมประมงในปี พ.ศ. 2558 พบว่าปริมาณการเพาะเลี้ยงรวมถึงผลผลิตของกุ้งขาวคิดเป็นมากกว่า 90 % ของกุ้งทั้งหมดที่เลี้ยงในประเทศไทย [2] อย่างไรก็ตาม ในช่วงปี พ.ศ. 2555 - 2556 ได้มีอุบัติการณ์ของโรคสำคัญในกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย คือ โรค Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) ซึ่งแรกเริ่มให้ชื่อโรคนี้นว่า Early Mortality Syndrome (EMS) จากสภาพของกุ้งที่ตายอย่างรวดเร็ว [3] - [4] โรค AHPND ทำให้เกิดการสูญเสียด้านผลผลิตกุ้ง และกระทบต่ออุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องอย่างมาก โดยสาเหตุของโรคนี้เกิดจากกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดและยื่นผลิตทอกซิน Photorhabdus Insect-related (Pir) A และ Pir B หรืออาจเรียกทอกซินนี้ว่า Tox A และ Tox B [3], [5] - [7] ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยที่มุ่งเน้นในการจัดการและควบคุมโรค AHPND ในหลายแง่มุม เช่น การจัดการฟาร์มและบ่อเลี้ยง ระบบน้ำเวียน การควบคุมคุณภาพน้ำ การจัดการอาหาร และลูกพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพ [8] - [9] ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงและในตัวกุ้งที่เป็นโรค [10] รวมถึงการพัฒนาการตรวจติดตามแบคทีเรียและพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค [5] - [6], [11] ในขณะการศึกษาถึงผลกระทบของสิ่งแวดล้อมต่อการเกิดโรค สุขภาพกุ้ง และชนิด/จำนวนจุลชีพ จะมีความสำคัญที่คุณภาพน้ำ pH และตะกอนดิน [12] - [13] แต่ผลกระทบของอุณหภูมิโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงในสภาวะการเลี้ยงกุ้งต่อการเจริญเติบโตและความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคนี้นั้นยังมีน้อยมาก แม้ว่าจะมีการรายงานถึงภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของโลกที่ชัดเจนมาก

Lafferty, K. D. รายงานถึงผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่ออุบัติการณ์ของโรคหลายชนิด [14] ซึ่งผลของอุณหภูมิต่อการเกิดโรคอาจเกิดจากผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ [15] รวมถึงกระตุ้นให้เชื้อก่อโรคสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงต่าง ๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ซึ่งสามารถเจริญได้ระหว่างอุณหภูมิ 4 - 42 °C พบว่าการเปลี่ยนแปลง

ของอุณหภูมิมิมีผลกระทบต่อการผลิตโปรตีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. [16] นอกจากนี้ Guerreiro, I. et al. ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย เช่น Serin-metalloprotease, S-layer และ flagellins มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณการแสดงออกตามปัจจัยอุณหภูมิ [15] ในขณะที่ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ยังจำกัดอยู่ในแง่ของการปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะอาหารทะเล หรือศึกษาในสายพันธุ์ก่อโรคที่จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์โดยตรง [17] - [20] แต่ยังไม่มีการรายงานถึงผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จากสภาวะภูมิอากาศทางภาคใต้ในปัจจุบัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่างกันอยู่เป็นประจำ และแตกต่างกันชัดเจนในแต่ละช่วงฤดู ซึ่งภูมิอากาศในภาคใต้จะแบ่งเป็น 3 ช่วงหลัก ๆ คือ ช่วงฤดูร้อน ที่อากาศร้อนตลอดทั้งวันซึ่งจัดเป็นช่วงอุณหภูมิปกติ ช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกตลอดทั้งวันและมีอุณหภูมิต่ำในรอบวัน และช่วงที่มีฝนตกสลับกับแดดออก ซึ่งแบบสุดท้ายนี้จะสังเกตได้ว่าอุณหภูมิต่ำในรอบวันมีการเปลี่ยนแปลงกะทันหันหรือผันแปรอย่างชัดเจน ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าได้ทำการสำรวจและเก็บข้อมูลอุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวในรอบวัน ในปี พ.ศ. 2560 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แท้จริงโดยสำรวจในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวเขตอำเภอปากพนัง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นบริเวณหลักแห่งหนึ่งของการเลี้ยงกุ้งขาวในภาคใต้ และนำข้อมูลอุณหภูมิต่างกันที่เปลี่ยนแปลงในรอบวันที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ มาทำการออกแบบโปรแกรมกำหนดอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ทำให้เกิดโรค AHPND เพื่อศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro*) แล้วติดตามการเจริญเติบโตและอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย โดยในการศึกษาค้นคว้าได้ทำการติดตามแบบ Real-Time คือ วัดค่า Optical Density แบบอัตโนมัติอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเลี้ยงโดยไม่ต้องทำการหยุดเครื่องเพื่อเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ และสามารถวัดค่าได้ทุก ๆ 10 นาที ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ทำให้การเก็บผลมีความละเอียดสูงขึ้น อีกทั้งยังลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (Contamination) ระหว่างการสุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาโปรตีนในน้ำเลี้ยงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในช่วงอุณหภูมิที่ได้จากการเลียนแบบอุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยงจริง โดยวัดปริมาณโปรตีนและศึกษารูปแบบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเติมเต็มองค์ความรู้สำคัญสำหรับการจัดการระบบการเลี้ยงหรือการจัดการฟาร์มกุ้งเพื่อลดความสูญเสียจากโรค AHPND

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บข้อมูลอุณหภูมิน้ำในรอบวันในบ่อเลี้ยงกุ้งขาว

การเก็บข้อมูลอุณหภูมิน้ำในรอบวันในบ่อเลี้ยงกุ้งขาว โดยเก็บจากบ่อในพื้นที่อำเภอปากพนังและอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวนพื้นที่ละ 1 บ่อต่อฤดูกาล จำนวน 3 ฤดูกาล คือ ฤดูร้อนระหว่างเดือนมกราคม - เมษายน จัดเป็นการเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิปกติ การเปลี่ยนฤดูร้อนเข้าสู่ฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคม - สิงหาคม หรือช่วงอุณหภูมิผันแปร และฤดูฝนระหว่างเดือนกันยายน - ธันวาคม หรือช่วงอุณหภูมิต่ำ โดยเลือกเก็บข้อมูลอุณหภูมิน้ำด้วยเครื่องบันทึกข้อมูลอุณหภูมิต่ออัตโนมัติ รุ่น T2 (Testo) กำหนดการบันทึกข้อมูลอากาศและน้ำทุก 10 นาที จากบ่อที่อยู่ใน

ระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาว โดยเก็บข้อมูลตลอดระยะเวลา 1 รอบการเลี้ยงกุ้ง (80 - 116 วัน) จากนั้นเลือกข้อมูลอุณหภูมิในในรอบวันที่มีสภาวะอากาศตามข้อกำหนดของแต่ละฤดูกาล (อ้างอิงอุณหภูมิอากาศจากข้อมูลสาธารณะที่บันทึกโดยสถานีตรวจอากาศนครศรีธรรมราช) คือ

- ฤดูร้อน ต้องไม่พบฝนตกและอุณหภูมิอากาศในช่วงระหว่าง 26 ถึงมากกว่า 34 °C
- การเปลี่ยนฤดูร้อนเข้าสู่ฤดูฝน ต้องมีฝนตกในวันนั้น ๆ และอุณหภูมิอากาศระหว่าง 24 ถึงมากกว่า 34 °C
- ฤดูฝน ต้องมีอุณหภูมิอากาศระหว่าง 22 ถึงไม่เกิน 32 °C

โดยในแต่ละฤดูกาลได้ทำการสุ่มเลือกวันตามข้อกำหนดของอุณหภูมิอากาศ จำนวน 20 วันต่อบ่อ โดยนำข้อมูลอุณหภูมิในที่มีความซ้ำกันจากการสุ่มวันที่มีสภาวะอากาศตามที่กำหนดข้างต้นในแต่ละฤดูกาล จำนวน 10 วันต่อบ่อ (n = 20) มาคำนวณค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิในทุกชั่วโมงตั้งแต่เวลา 07.00 - 06.00 น. ของวันรุ่งขึ้น

2. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND

นำตัวอย่างกุ้งขาวที่แสดงอาการของโรค AHPND โดยมีลักษณะไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า ดับ (Hepatopancreas) มีสีซีดและหดตัว ไม่มีอาหารในลำไส้ [21] มาแยกแบคทีเรียจากตับ โดยวิธี Streak Plate บนอาหาร Thiosulfate Citrate Bile-Salts Sugar (TCBS, Difco) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการสุ่มเลือกโคโลนีแบคทีเรียสีเขียวบนอาหาร TCBS จำนวน 10 โคโลนี มาย้ายเลี้ยงบนอาหาร Crome (HiCrome™ *Vibrio* Agar, HiMedia) โดยโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร Crome มีสีเขียวปนน้ำเงิน (Bluish-Green) ซึ่งยืนยันเบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เลือกมาเป็น *V. parahaemolyticus* หลังจากนั้นนำเชื้อแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) ที่เติม 1.5 % (w/v) NaCl (อาหาร TSB⁺) นำไปเลี้ยงโดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเอาเฉพาะเซลล์แบคทีเรียสำหรับสกัด DNA ซึ่งสกัด DNA โดยใช้ DNAzol® reagent (Invitrogen) หลังจากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง A₂₆₀ และ A_{260/280}

ทำการตรวจสอบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 โคโลนีที่สุ่มเลือกมาเป็น *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND โดยการทำ Multiplex PCR ด้วย Specific Primers ที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* พลาสมิด และยีน *Pir* ตามวิธีตรวจมาตรฐานของกรมประมง (ตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ EMS/AHPND) โดยมีรายละเอียด Primer และสารในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยโปรแกรมในการทำ PCR อ้างอิงตามมาตรฐานวิธีการตรวจของกรมประมง คือ Initial Denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยการทำปฏิกิริยาจำนวน 29 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที Annealing ที่ 60 °C 30 วินาที และ Extension ที่ 72 °C 30 วินาที และ Final Extension ที่ 72 °C 5 นาที จากนั้นนำ PCR Products ที่ได้ไปแยกด้วย 1.5 % (w/v) Agarose Gel Electrophoresis

3. การเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* สำหรับทดสอบ

เตรียมหัวเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND จำนวน 1 ไอโซเลต โดยเริ่มจากเลี้ยงบนอาหาร TSA⁺ บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วแกะเชื้อ 1 ลูบ มาเลี้ยงในอาหาร

TSB⁺ ปริมาตร 1 mL เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วขยายเป็น 10 mL ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 mL ด้วยลักษณะการเลี้ยงเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น หลังจากนั้นขยายปริมาตรการเลี้ยงโดยนำหัวเชื้อปริมาตร 2 mL ผสมกับอาหาร TSB⁺ 14 mL และ น้ำเกลือ 1.5 % (w/v) NaCl 14 mL แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่อง RTS-1C Personal Bioreactor (Biosan) สำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

4. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3. ในเครื่อง RTS-1C Personal Bioreactor (Biosan) ที่ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ 3 รูปแบบ คือ (1) การเปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิปกติ (2) ช่วงอุณหภูมิต่ำ และ (3) ช่วงอุณหภูมิผันแปร (รูปแบบอุณหภูมิและช่วงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ออกแบบตามข้อมูลอุณหภูมิในรอบวัน) ช่วงโปรแกรมละ 3 ชั่วโมง โดยกำหนดให้เครื่องอ่านค่า Optical Density (แปลผลกลับเป็นปริมาณแบคทีเรีย) ทุก ๆ 10 นาทีต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแสดงผลเป็นการเจริญเติบโต (Growth Curve) และอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate)

ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ในการทำ Multiplex PCR

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')	Target	PCR Product	References
Vp.flae-79F	5'-GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT-3'	<i>V. parahaemolyticus</i>	897 bp	[21]
Vp.flae-934R	5'-ATTATCGATCGTGCCACTCAC-3'			
TUMSAT-Vp1F	5'-CGCAGATTTGCTTTTGTA-3'	Plasmid (pVA1)	500 bp	[11]
TUMSAT-Vp1R	5'-AGAAGCTGGCCGAAGTGATA-3'			
TUMSAT-Vp3F	5'-GTGTTGCATAATTTTGTC-3'	Pir toxin	360 bp	[11]
TUMSAT-Vp3R	5'-TTGTACAGAAACCACGACTA-3'			

ตารางที่ 2 สารเคมีในการทำปฏิกิริยา Multiplex PCR

PCR components	Volume (μL)/ Reaction	Final concentration
DNA free water	5.60	
2X KAPA2G Fast Multiplex Mix (Sigma-Aldrich)	10.00	1X (contains 3 mM MgCl ₂)
10 μM F/R Mix Primer (Vp.flae, Vp1, Vp3)	2.40	0.2 μM each
DNA template	2.00	
Total	20.00	

5. การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus*

5.1 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus*

หลังจากเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอุณหภูมิทั้ง 3 รูปแบบ โดยมีอาหาร TSB⁺ ผสมกับ 1.5 % (w/v) NaCl ในอัตราส่วน 1:1 เป็นชุดควบคุม (Negative Control) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนและรูปแบบโปรตีนของอาหารเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเฉพาะส่วนใสที่ได้กรองผ่าน Whatman® filter syringe เมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 µm (GE Healthcare) โดยทำวิธีเดียวกันนี้กับอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม หลังจากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงที่ปลอดเชื้อแบคทีเรียไว้ที่ -20 °C (แบ่งน้ำเลี้ยง (Aliquot) ออกเป็นส่วน ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการ Freeze-Thaw)

5.2 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อทุกตัวอย่างรวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมด้วยวิธีเบรคฟอร์ด [22] โดยผสมสารละลายเบรคฟอร์ดกับตัวอย่างน้ำเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำเลี้ยงโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA)

5.3 การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ

ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลิตและหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม ด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ หรือ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (ดัดแปลงจากวิธีของ [23]) โดยเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* และอาหารชุดควบคุม ผสมกับ Sample Buffer ที่มี β-mercaptoethanol เป็นองค์ประกอบ ทำการแยกโปรตีนด้วยเจลที่มีความเข้มข้น 12.5 % และให้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที (หรือรอจน Tracking Dye เคลื่อนที่ไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล) แล้วย้อมแถบโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยสี Coomassie Brilliant Blue และเปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนด้วยโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare)

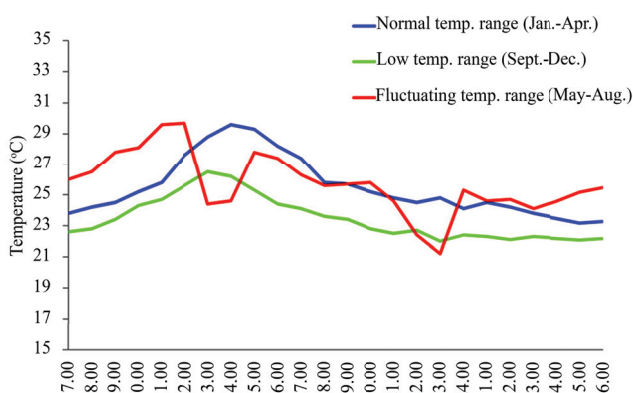
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. อุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวในรอบวัน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำในรอบวันในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวเขตพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่เป็นตัวแทนแต่ละฤดูกาลจากการกำหนดสภาวะอากาศ (รายละเอียดในวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ข้อ 1.) ผู้วิจัยทำการเก็บข้อมูลในช่วงเวลา 07.00 - 06.00 น. ของวันใหม่ เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่การทำงานของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวที่เก็บข้อมูลในช่วงฤดูร้อนซึ่งมีสภาวะอากาศปกติมีค่าต่ำสุดที่ 23.2 °C และสูงสุดที่ 29.6 °C (อุณหภูมิน้ำระหว่าง 24 - 30 °C) โดยในช่วงเวลาระหว่าง 07.00 - 14.00 น. ของรอบวันมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 11.00-14.00 น. หลังจากเวลา 14.00 น. อุณหภูมิน้ำจะลดลงอย่างต่อเนื่อง และลดลงต่ำสุดที่อุณหภูมิ 24±1 °C ระหว่างช่วงเวลา 21.00 - 09.00 น. ของวันใหม่

ช่วงอุณหภูมิผันแปรระหว่างเปลี่ยนฤดูจากฤดูร้อนสู่ฤดูฝน มีอุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวต่ำสุดที่ 21.2 °C และสูงสุดที่ 29.7 °C แต่พบการลดลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมิน้ำจากฝนตก และอุณหภูมิน้ำจะเพิ่มสูงขึ้น 3 - 4 °C หลังจากฝนหยุดตก (อุณหภูมิน้ำระหว่าง 22 - 30 °C) ในขณะที่ฤดูฝนซึ่งน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวมีอุณหภูมิต่ำจะมีอุณหภูมิน้ำต่ำสุดที่ 22.1 °C และสูงสุดที่ 26.5 °C (อุณหภูมิน้ำระหว่าง 22 - 27 °C) โดยมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวันใกล้เคียงกับฤดูร้อนแต่อุณหภูมิต่ำกว่า 1 - 3 °C (รูปที่ 1) ซึ่งจากการเก็บข้อมูลสถิติการเกิดโรค AHPND สันนิษฐานว่าในช่วงการเลี้ยงแต่ละรอบสภาพอากาศในช่วงเวลาที่มีการผันแปรของอุณหภูมิในรอบวัน จะมีโอกาสพบการแพร่ระบาดของโรค AHPND สูงกว่า

แม้ว่าช่วงอุณหภูมิในรอบวันจะใกล้เคียงกัน แต่เป็นที่น่าสังเกตว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่างกันค่อนข้างชัดเจน โดยเฉพาะช่วงอุณหภูมิผันแปรที่มีการขึ้นลงมากกว่า 1 ครั้งในรอบวันและพบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงอย่างฉับพลัน ดังนั้นข้อมูลอุณหภูมิที่ได้จึงถูกนำมาใช้อ้างอิงในการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรอบวัน (เปรียบเทียบในรูปแบบช่วงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ในห้องปฏิบัติการ

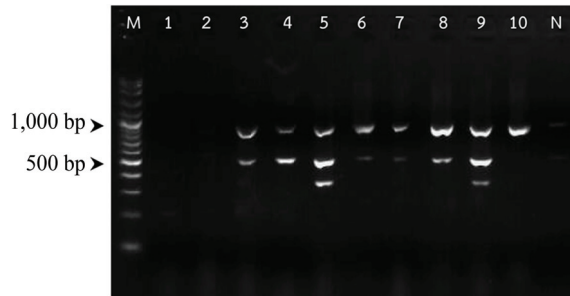


รูปที่ 1 อุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวในรอบวันจากบ่อเลี้ยงกุ้งขาวในจังหวัดนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2560

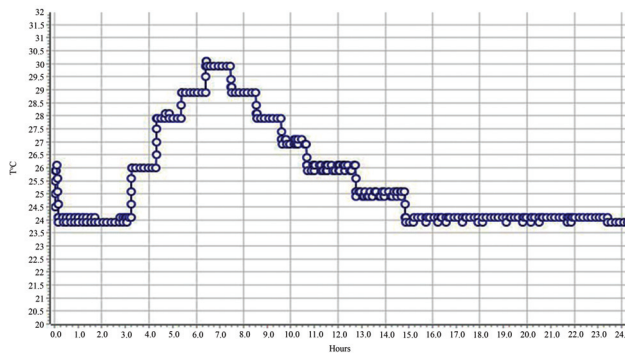
2. การตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND

ในการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ด้วยวิธี Multiplex PCR โดยใช้ primer 3 คู่ที่จับตำแหน่งจำเพาะต่างกันและเพิ่มจำนวน DNA ในตำแหน่งต่าง ๆ โดยแถบขนาด 890 bp เกิดจากการเพิ่มจำนวนด้วยการจับจำเพาะของคู่ primer Vp.fluA ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* [21] ในขณะที่แถบขนาด 500 bp เกิดจากการจับจำเพาะของคู่ primer TAMSAT-Vp1 โดยแถบที่ปรากฏจะแสดงถึงการมีอยู่ของพลาสมิด pVA1 ซึ่งมีรายงานว่าพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับโรค AHPND (AHPND-Associated Plasmid) โดยพลาสมิดสามารถส่งผ่านตัวเองไปยังเซลล์อื่น ๆ (Self-Transmissible Plasmid) เนื่องจากมีกลุ่มยีน Conjugative Transfer และ Plasmid Mobilization [24] และแถบ DNA ขนาด 360 bp ที่ได้จากการจับจำเพาะของคู่ primer TAMSAT-Vp3 จะแสดงถึงการมีอยู่ของยีน *Pir* [11] ดังนั้น ผลบวกที่จะแสดงว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ทดสอบเป็นสายพันธุ์ก่อโรค AHPND จะต้องปรากฏแถบ DNA ทั้ง 3 แถบข้างต้น

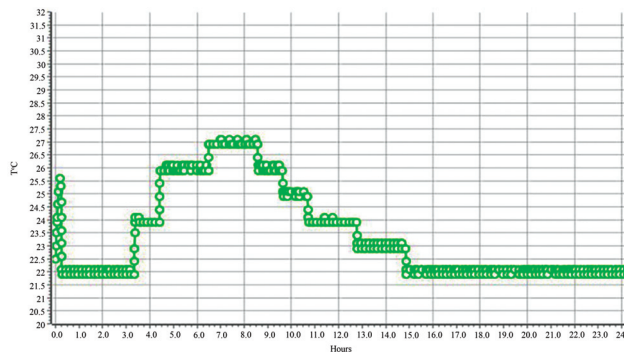
เมื่อตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากตับของกุ้งขาวป่วยที่แสดงอาการของโรค AHPND จำนวน 10 ไอโซเลต ด้วยวิธี Multiplex PCR (รูปที่ 2) พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตที่มีแถบ DNA ครบทั้ง 3 แถบ คือ ไอโซเลตที่ 5 และ 9 ผู้วิจัยจึงเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ 5 สำหรับศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการผลิตทอกซินต่อไป



รูปที่ 2 ผลการทำ Agarose Gel Electrophoresis ของการตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ด้วยวิธี Multiplex PCR (M = Molecular Weight Marker (100 bp Plus, Vivantis), 1-10 = DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ไอโซเลตที่ 1-10 และ N = Negative Control, ใส่ DEPC-treated H₂O แทน DNA)

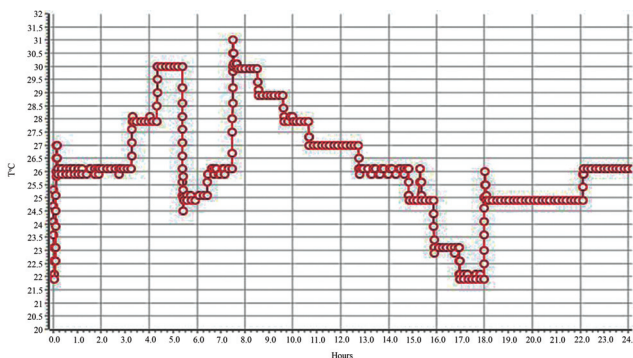


(ก) ช่วงอุณหภูมิปกติ

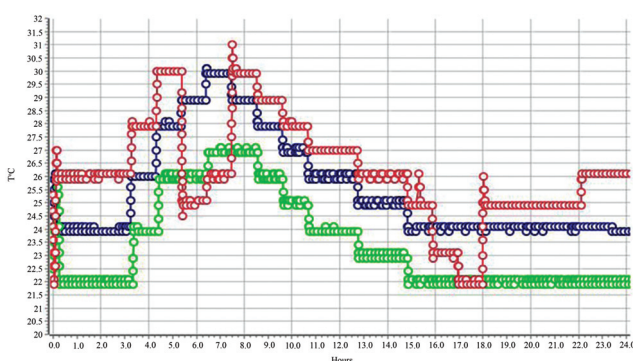


(ข) ช่วงอุณหภูมิต่ำ

รูปที่ 3 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่ออกแบบตามข้อมูลอุณหภูมิในรอบวัน



(ค) ช่วงอุณหภูมิผันแปร



(ง) รวมช่วงอุณหภูมิทั้ง 3 รูปแบบ

○ Normal temp. range

○ Low temp. range

○ Fluctuating temp. range

รูปที่ 3 โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่ออกแบบตามข้อมูลอุณหภูมิในรอบวัน (ต่อ)

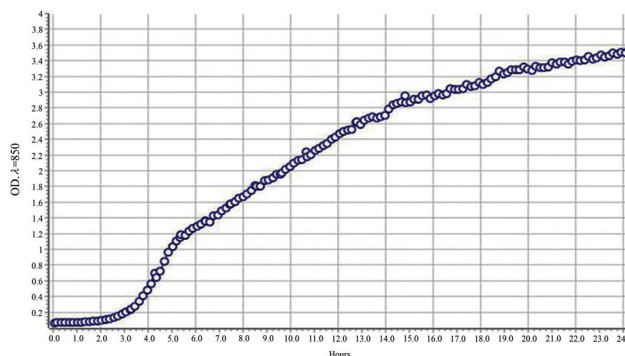
3. การเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อได้ข้อมูลอุณหภูมิในรอบวันจากการเก็บข้อมูลน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ คือ ช่วงอุณหภูมิปกติ ช่วงอุณหภูมิต่ำ และช่วงอุณหภูมิผันแปร (รูปที่ 1) นำมาสร้างโปรแกรมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND โดยใช้เครื่อง RTS-1C Personal Bioreactor (Biosan) ที่สามารถตั้งอุณหภูมิเป็นช่วง ๆ ควบคุมการเขย่า และอ่านค่า Optical Density เพื่อแสดงถึงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อย่างต่อเนื่อง โดยโปรแกรมอุณหภูมิที่ออกแบบไว้ทั้ง 3 รูปแบบ ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งช่วงอุณหภูมิปกติ (24 - 30 °C รูปที่ 3 (ก)) และช่วงอุณหภูมิต่ำ (22 - 27 °C รูปที่ 3 (ข)) จะมีลักษณะใกล้เคียงกันต่างกันเพียงแค่ช่วงอุณหภูมิเท่านั้น ในขณะที่ช่วงอุณหภูมิผันแปร (22 - 30 °C รูปที่ 3 (ค)) จะมีการแกว่งของอุณหภูมิในแต่ละช่วงอย่างชัดเจน โดยในช่วงบางช่วงจะมีความแตกต่างของอุณหภูมิเท่ากับ 3 °C ผันแปรอย่างรวดเร็ว

ข้อมูลค่า Optical Density ที่วัดทุก ๆ 10 นาที สามารถนำมาสร้างเป็นกราฟการเจริญเติบโตได้ทันที และสามารถคำนวณเป็นอัตราการเจริญจำเพาะได้ โดยคิดเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า Optical Density ในช่วงเวลาหนึ่ง พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์

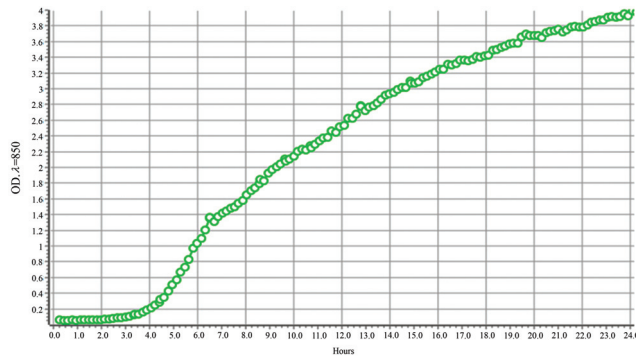
ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิทั้ง 3 รูปแบบ (รูปที่ 4) มีความใกล้เคียงกันมากโดยแสดงช่วง Lag Phase และ Exponential Phase เหมือนกัน แต่ระยะเวลาในช่วง Lag Phase มีความแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่เลี้ยงในช่วงอุณหภูมิต่ำจะมีช่วง Lag Phase ที่ยาวที่สุด ในขณะที่ช่วงอุณหภูมิผันแปร มีช่วง Lag Phase สั้นที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิเริ่มต้นในการเลี้ยง โดยพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า จะทำให้แบคทีเรียมีช่วง Lag Phase สั้นกว่า สอดคล้องกับการศึกษาการเจริญเติบโตของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าระยะเวลาในช่วง Lag Phase แปรผกผันกับอุณหภูมิ ทั้งนี้เนื่องจากการที่แบคทีเรียเจริญเติบโตในอุณหภูมิต่ำจะต้องใช้เวลาในช่วงปรับสภาพหรือ Lag Phase ยาวนานขึ้น [19]

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะของ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิทั้ง 3 รูปแบบ (รูปที่ 5) พบความแตกต่างของกราฟอย่างชัดเจน โดยในช่วงอุณหภูมิผันแปรพบอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 2 ช่วงหลัก ซึ่งช่วงที่มีการเจริญจำเพาะสูงสุดช่วงแรกอยู่ในช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิอื่น ๆ และเป็นช่วงที่อุณหภูมิมีการขึ้นลง (รูปที่ 3) แต่ในอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในช่วงที่ 2 เกิดขึ้นเฉพาะในการเลี้ยงด้วยช่วงอุณหภูมิผันแปรเท่านั้น พบความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในการเลี้ยงที่มีการขึ้นลงเช่นเดียวกัน ซึ่งช่วงที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 °C ส่งผลให้แบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เป็นที่น่าสังเกตว่าการผันแปรหรือช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะทำให้มีอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงขึ้น ในขณะที่จะไม่พบความแตกต่างเมื่อพิจารณาจากการเจริญเติบโตทั่วไป เนื่องจากการเจริญเติบโตเป็นการวัดค่า Optical Density ของเซลล์แบคทีเรียแสดงถึงปริมาณแบคทีเรียที่สะสมต่อเนื่องไป ไม่สะท้อนถึงความสามารถในการเจริญเติบโต หรือการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ [25] ในขณะที่ยการศึกษาที่ผ่านมา ได้ทำการศึกษาเฉพาะผลของอุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง ๆ หรือส่วนต่างของอุณหภูมิ ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียเท่านั้น โดยไม่ได้แสดงถึงผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงในช่วงการเลี้ยง [26] - [28] การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกที่ติดตามผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างฉับพลันต่อการเจริญเติบโตแบบ Real-Time ของแบคทีเรีย และผลการวิจัยแสดงอย่างชัดเจนว่าการขึ้น/ลงของอุณหภูมิจะส่งผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดอย่างชัดเจน

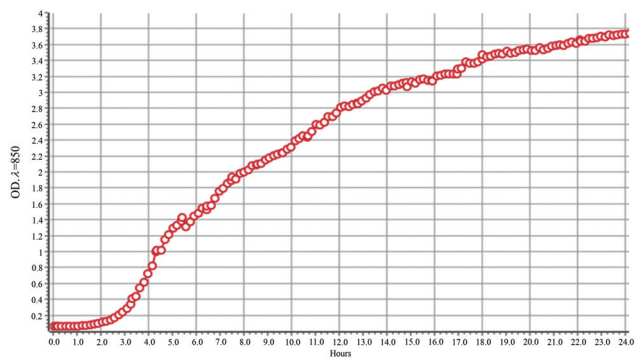


(ก) ช่วงอุณหภูมิปกติ

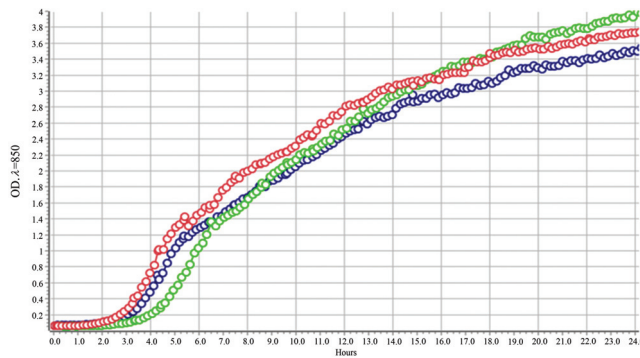
รูปที่ 4 การเจริญเติบโต (Growth Curve) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่าง ๆ



(ข) ช่วงอุณหภูมิต่ำ



(ค) ช่วงอุณหภูมิผันแปร



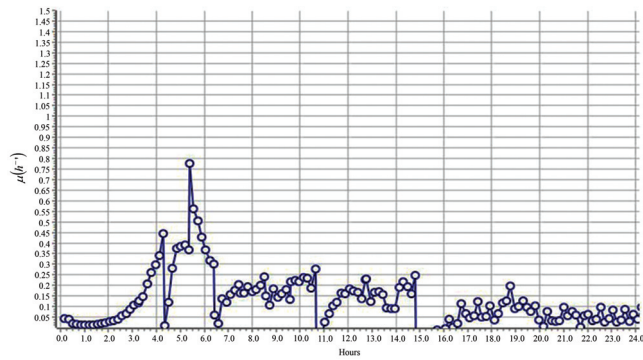
(ง) รวมช่วงอุณหภูมิทั้ง 3 รูปแบบ

○ Normal temp. range

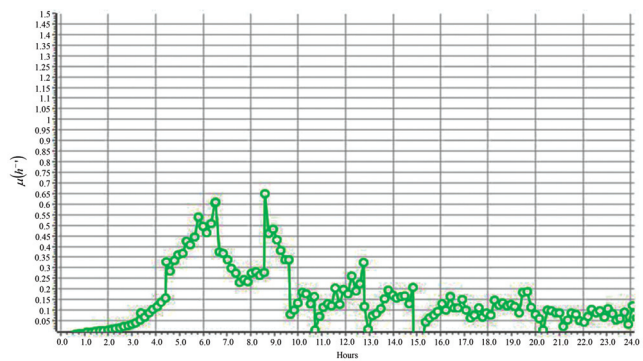
○ Low temp. range

○ Fluctuating temp. range

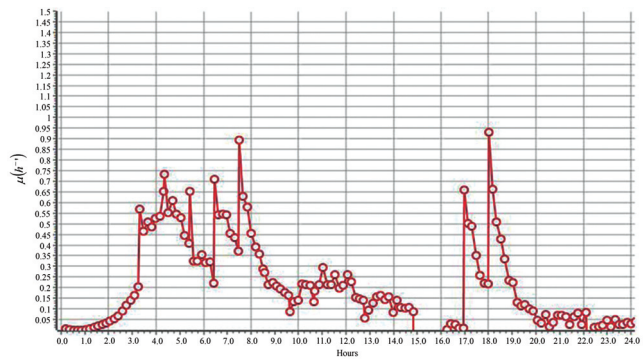
รูปที่ 4 การเจริญเติบโต (Growth Curve) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)



(ก) ช่วงอุณหภูมิปกติ

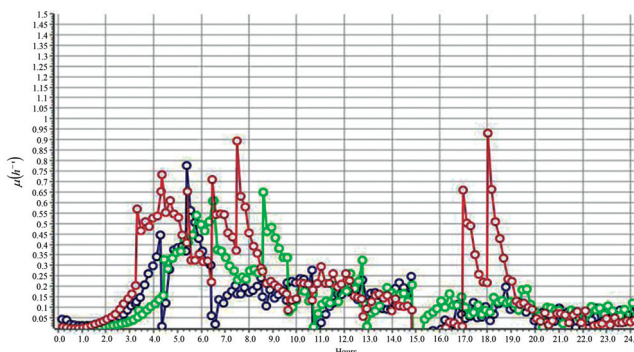


(ข) ช่วงอุณหภูมิต่ำ



(ค) ช่วงอุณหภูมิผันแปร

รูปที่ 5 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่าง ๆ



(ง) รวมช่วงอุณหภูมิทั้ง 3 รูปแบบ

○ Normal temp. range

○ Low temp. range

○ Fluctuating temp. range

รูปที่ 5 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่าง ๆ (ต่อ)

4. การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND

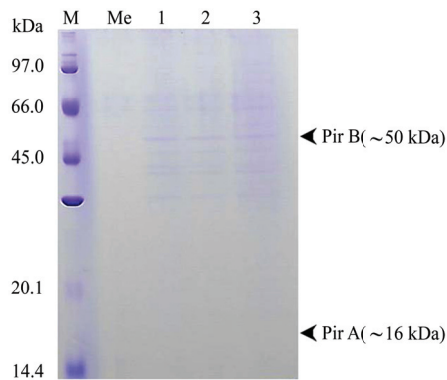
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงในอาหารผสม TSA⁺ และ 1.5 % (w/v) NaCl ในอัตราส่วน 1:1 ในอุณหภูมิต่าง ๆ ทั้ง 3 รูปแบบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาวัดปริมาณโปรตีนพบว่า โปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในช่วงอุณหภูมิผันแปร มีความเข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือ ช่วงอุณหภูมิปกติ และช่วงอุณหภูมิต่ำ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีโปรตีนน้อยมาก (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลโปรตีนในเจล SDS-PAGE ซึ่งมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนมากที่สุดในช่องของน้ำเลี้ยงที่ช่วงอุณหภูมิผันแปร และน้อยที่สุดในช่องอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 6) แสดงให้เห็นว่าการที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตสูงขึ้น และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงจะผลิต Extracellular Protein ออกมามาก

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่าง ๆ

	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ช่วงอุณหภูมิปกติ	ช่วงอุณหภูมิต่ำ	ช่วงอุณหภูมิผันแปร
โปรตีน (μg/mL)	0.91±0.16	11.54±0.48	7.77±0.00	26.46±1.86

เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนในน้ำเลี้ยงต่าง ๆ พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 kDa ในอาหารที่มีการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND โดยไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งน่าจะเป็นทอกซิน Pir B ตรงกับรายงานที่แสดงถึงขนาดของทอกซิน Pir B หรือ Tox B ประมาณ 50 kDa และเป็นโปรตีนหลักที่สามารถตรวจพบในน้ำเลี้ยงหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่มี plasmid ที่มียีน *Pir B* [5] - [6] ในการศึกษาครั้งนี้พบแถบโปรตีนขนาด 16 kDa บางมาก โดยมีรายงานว่าแถบโปรตีนทอกซิน Pir A หรือ Tox A ขนาดประมาณ 16 kDa จะต้องตรวจพบได้ในน้ำเลี้ยงหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND เช่นกัน อย่างไรก็ตาม

Lee, C.-T. et al. ได้ให้ข้อสังเกตว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND จะตรวจพบโปรตีน Pir B ในปริมาณมากกว่า Pir A มาก [24]



รูปที่ 6 การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue เมื่อ M = Molecular Weight Marker, ME = อาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (อาหาร TSB⁺ ผสมกับ 1.5 % (w/v) NaCl ในอัตราส่วน 1:1), ช่องหมายเลข 1, 2 และ 3 = น้ำเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เลี้ยงในช่วงอุณหภูมิปกติ ช่วงอุณหภูมิต่ำ และช่วงอุณหภูมิผันแปร ตามลำดับ

การก่อให้โรคหรืออาการของ AHPND ในกุ้งเกิดจากผลการทำงานของทอกซิน Pir ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เท่านั้น เนื่องจากเมื่อใช้ Cell-Free Medium ที่มีเพียงทอกซิน Pir ทดสอบกับกุ้งพบว่าสามารถทำให้เกิดอาการของโรค AHPND ได้ [6], [24] โดยกุ้งที่ได้รับทอกซิน Pir A และ B หรือ Pir B แสดงอาการของโรค แต่กุ้งที่ได้รับเฉพาะทอกซิน Pir A ไม่แสดงอาการ [24] มีรายงานว่าโปรตีนทอกซินทั้ง 2 ชนิดนี้มีรูปแบบการทำงานคล้ายคลึงกับทอกซิน Cry ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ซึ่งทำลายเซลล์เป้าหมายด้วยการทำให้เกิด Pore-Forming เนื่องจากโครงสร้างของทอกซิน Pir B คล้ายกับ Domain I และ Domain II และ Pir A คล้ายกับ Domain III ของทอกซิน Cry ซึ่งเข้าจับกับตัวรับ (Receptor) บนเซลล์เป้าหมายเกิดเป็น Complex แล้วทำให้เกิด Pore-Forming ที่เซลล์เป้าหมาย รวมถึงเป็นการส่งสัญญาณ (Signal Transduction Pathway) กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ (Cell Death) [24], [29] ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ทำให้การแสดงออกของยีน *Pir A* และ *Pir B* รวมถึงการผลิตโปรตีนทอกซิน Pir A และ Pir B เปลี่ยนแปลงไปก็จะส่งผลต่อความรุนแรงในการเกิดโรค AHPND เช่นกัน

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของน้ำในรอบวันในบ่อเลี้ยงกุ้งชาวดลอดปี พ.ศ. 2560 สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ 3 รูปแบบ คือ (1) ช่วงอุณหภูมิปกติ (24 - 30 °C) (2) ช่วงอุณหภูมิต่ำ (22 - 27 °C) และ (3) ช่วงอุณหภูมิผันแปร (22 - 30 °C) โดยเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาตั้งโปรแกรมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

V. parahaemolyticus สายพันธุ์ก่อโรค AHPND พบว่ากราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไม่ต่างกัน แต่มีความแตกต่างในระยะเวลาช่วง Lag Phase และรูปแบบของอัตราการเจริญจำเพาะมีความแตกต่างกัน โดยเมื่ออุณหภูมิมีความแตกต่าง 3 °C จะทำให้แบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด นอกจากนี้รูปแบบอุณหภูมิในการเลี้ยงที่แตกต่างกันยังส่งผลต่อ Extracellular Protein รวมถึงทอกซิน Pir ที่แบคทีเรียผลิตและหลั่งออกภายนอกเซลล์ โดยพบว่าการเลี้ยงภายใต้ช่วงอุณหภูมิผันแปรที่มีการขึ้นลงของอุณหภูมิอย่างฉับพลันจะส่งผลให้มีการผลิตโปรตีนสูงสุด โดยสูงกว่าช่วงอุณหภูมิปกติและช่วงอุณหภูมิต่ำคิดเป็น 2 และ 3 เท่า ตามลำดับ ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND เนื่องจากโปรตีนทอกซิน Pir เป็นตัวแปรหลักในการทำให้เกิดโรคหรือความรุนแรงของโรค AHPND ดังนั้น ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่ช่วยในการจัดการระบบการเลี้ยงหรือการจัดการฟาร์มกุ้งเพื่อลดความสูญเสียจากโรค AHPND

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งชาวในจังหวัดนครศรีธรรมราชที่อนุเคราะห์ให้คณะผู้วิจัยติดตั้งอุปกรณ์และอำนวยความสะดวกในการเก็บข้อมูล โดยส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้เป็นวิทยานิพนธ์ของนายพงศ์พันธุ์ แพรกทอง นักศึกษาปริญญาโท สาขาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการจัดการทรัพยากรประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

References

- [1] Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., and Valtonen, E. T. (2010). Increasing Water Temperature and Disease Risks in Aquatic Systems, Climate Change Increases the Risk of Some, but Not All, Diseases. **International Journal for Parasitology**. Vol. 40, Issue 13, pp. 1483-1488. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.04.015
- [2] Fisheries Statistics Analysis and Research Group, Fisheries Development Policy and Strategy Division. (2017). Statistics of Marine Shrimp Culture 2015. **Department of Fisheries Ministry of Agriculture and Cooperatives**. No. 2, pp. 1-46 (in Thai)
- [3] Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., and Lightner, D. V. (2013). Determination of the Infectious Nature of the Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome Affecting Penaeid Shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**. Vol. 105, Issue 1, pp. 45-55
- [4] Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., and Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* Isolates from a Single Thai Shrimp Farm Experiencing an Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). **Aquaculture**. Vol. 428-429, pp. 297-302. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.03.030

- [5] Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., and Flegel, T. W. (2015). AP4 Method for Two-Tube Nested PCR Detection of AHPND Isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture Reports**. Vol. 2, pp. 158-162. DOI: 10.1016/j.aqrep.2015.10.002
- [6] Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., and Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR Detection of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates That Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. **PLOS ONE**. Vol. 10(5). DOI:10.1371/journal.pone. 0126987
- [7] Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., and Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-Causing Plasmids Encoding the PirAB Toxins as Mediated by PirAB-Tn903 are Prevalent in Various *Vibrio* species. **Scientific Reports**. Vol. 7, Article number: 42177. DOI: 10.1038/srep42177
- [8] Boonyawiwat, V., Patanasatienkul, T., Kasornchandra, J., Poolkhet, C., Yaemkasem, S., Hammell, L., and Davidson, J. (2017). Impact of Farm Management on Expression of Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (EMS/AHPND) on Penaeid Shrimp Farms in Thailand. **Journal of Fish Diseases**. Vol. 40, Issue 5, pp. 649-659. DOI: 10.1111/jfd.12545
- [9] Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T. and Kanzaki, H. (2017). The Roles of Probiotic Purple Nonsulfur Bacteria to Control Water Quality and Prevent Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) for Enhancement Growth with Higher Survival in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during Cultivation. **Aquaculture**. Vol. 473, pp. 327-336. DOI: 10.1016/j.aquaculture. 2017.02.033
- [10] Chen, W. -Y., Ng, T. H., Wu, J. -H., Chen, J. -W., and Wang, H. -C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-Out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. **Scientific Reports**. Vol. 7, No. 1, Article number: 9395. DOI: 10.1038/s41598-017-09923-6
- [11] Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Thawonsuwan, J., Sriwanayos, P., Kongkumnerd, J., Chaweepack, T., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R., Kondo, H., and Hirono, I. (2014). Development of PCR Diagnosis for Shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) Strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish Pathology**. Vol. 49, Issue 4, pp. 159-164. DOI: 10.3147/jsfp.49.159
- [12] Thakur, D. P. and Lin, C. K. (2003). Water Quality and Nutrient Budget in Close Shrimp (*Penaeus monodon*) Culture Systems. **Aquaculture Research**. Vol. 27, No. 3, pp. 159-176
- [13] Akazawa, N. and Eguchi, M. (2017). Pond Sludge and Increased pH Cause Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (EMS/AHPND) in Cultured White Shrimp. **Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture**. Vol. 1, pp. 92-96

- [14] Lafferty, K. D. (2009). The Ecology of Climate Change and Infectious Diseases. **Ecology**. Vol. 90, Issue 4, pp. 888-900. DOI: 10.1890/08-0079.1
- [15] Guerreiro, I., Pérez-Jiménez, A., Costas, B., and Oliva-Teles, A. (2014). Effect of Temperature and Short Chain Fructooligosaccharides Supplementation on the Hepatic Oxidative Status and Immune Response of Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish & Shellfish Immunology**. Vol. 40, Issue 2, pp. 570-576. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.08.017
- [16] Yu, H. B., Kaur, R., Lim, S. M., Wang, X. H., and Leung, K. Y. (2007). Characterization of Extracellular Proteins Produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. **Proteomics**. Vol. 7, No. 3, pp. 436-449. DOI: 10.1002/pmic.200600396
- [17] Yoon, K. S., Min, K. J., Jung, Y. J., Kwon, K. Y., Lee, J. K., and Oh, S. W. (2008). A Model of the Effect of Temperature on the Growth of Pathogenic and Nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Oysters in Korea. **Food Microbiology**. Vol. 25, Issue 5, pp. 635-641. DOI: 10.1016/j.fm.2008.04.007
- [18] Chase, E. and Harwood, V. J. (2011). Comparison of the Effects of Environmental Parameters on Growth Rates of *Vibrio vulnificus* Biotypes I, II, and III by Culture and Quantitative PCR Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 77, No. 12, pp. 4200-4207. DOI: 10.1128/AEM.00135-11
- [19] Kim, Y. W., Lee, S. H., Hwang, I. G., and Yoon, K. S. (2012). Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Vol. 9, No. 12, pp. 4662-4675. DOI: 10.3390/ijerph9124662
- [20] Mudoh, M. F., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., and Chaudhuri, A. (2014). The Effects of Storage Temperature on the Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and Organoleptic Properties in Oysters. **Frontiers in Public Health**. Vol. 2, DOI: 10.3389/fpubh.2014.00045
- [21] Tarr, C. L., Patel, J. S., Pühr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A., and Strockbine, N. A. (2007). Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and rpoB Sequence Determination. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 45, No. 1, pp. 134-140. DOI: 10.1128/JCM.01544-06
- [22] Bradford, M. M. (1979). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. Vol. 72, Issue 1-2, pp. 248-254
- [23] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage T4. **Nature**. Vol. 227, pp. 680-685

- [24] Lee, C. -T., Chen, I. -T., Yang, Y. -T., Ko, T. -P., Huang, Y. -T., Huang, J. -Y., Huang, M. -F., Lin, S. -J., Chen, C. -Y., Lin, S. -S., Lightner, D. V., Wang, H. -C., Wang, A. H., Wang, H. -C., Hor, L. -I., and Lo, C. -F. (2015). The Opportunistic Marine Pathogen *Vibrio parahaemolyticus* Becomes Virulent by Acquiring a Plasmid that Expresses a Deadly Toxin. In **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Vol. 112, No. 34, pp. 10798-10803. DOI: 10.1073/pnas.1503129112
- [25] Maier, R. M. (2000). Bacterial Growth. In **Environmental Microbiology**. Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gebra C.P., eds. pp. 43-59. Academic Press
- [26] Zwietering, I., De Wit, J. C., Cuppers, H. G. A. M., and Van 't Riet, K. (1994). Modeling of Bacterial Growth with Shifts in Temperature. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 60, No. 1, pp. 204-213
- [27] Van Derlinden, E., Bernaerts, K., and Van Impe, J. F. (2008). Dynamics of *Escherichia coli* at Elevated Temperatures: Effect of Temperature History and Medium. **Journal of Applied Microbiology**. Vol. 104, No. 2, pp. 438-453. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03592.x
- [28] Zotta, T., Guidone, A., Ianniello, R. G., Parente, E., and Ricciardi, A. (2013). Temperature and Respiration Affect the Growth and Stress Resistance of *Lactobacillus plantarum* C17. **Journal of Applied Microbiology**. Vol. 115, No. 3, pp. 848-858. DOI: 10.1111/jam.12285
- [29] Soberón, M., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Gómez, I., Porta, H., and Bravo, A. (2010). Pore Formation by Cry Toxins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Vol. 677, pp. 127-142