การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจเชื้อก่อโรคสเตรปโตคอคโคซีส ในปลาเศรษฐกิจของไทย

Development of Multiplex PCR Technique for Detection of Streptococcosis in Economic Fish of Thailand

อัครวิทย์ อิสสะโร

Akkarawit Itsaro

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจเชื้อก่อโรค สเตรปโตคอคโคซีสในปลาเศรษฐกิจของไทย

ผู้เขียน นายอัครวิทย์ อิสสะโร

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ

(ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจเชื้อก่อโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาเศรษฐกิจของไทย

ผู้เขียน นายอัครวิทย์ อิสสะโร

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ครั้งที่หนึ่งเก็บตัวอย่างปลานิล ปลากะพงขาว ปลากะรัง ปลาเหยื่อ ดิน และน้ำจากแหล่งเลี้ยงในจังหวัดกระบี่ จังหวัดพัทลุง และจังหวัดสงขลา เพื่อตรวจหาแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่อาจเป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสด้วยการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมจากปลานิลและน้ำที่เลี้ยงในอำเภอบางแก้ว อำเภอศรีบรรพต จังหวัดพัทลุง และปลานิลและปลาเหยื่อในอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา และได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR (m-PCR) เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาจำนวน 3 ชนิดได้แก่ *Streptococcus agalactiae S. iniae* และ *Lactococcus garvieae* การทดสอบความไวของเทคนิคสามารถตรวจสอบแบคทีเรียแต่ละชนิดได้โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 9.76 39.06 และ 19.53 พิโคกรัมตามลำดับ ในครั้งที่สองเก็บตัวอย่างปลานิลปกติและปลานิลป่วยจากอำเภอป่าพะยอม อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิชล อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช เพื่อตรวจสอบโรคสเตรปโตคอคโคซีสด้วยเทคนิค m-PCR ควบคู่กับการตรวจสอบด้วยการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทคนิค m-PCR สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในตัวอย่างปลาจากอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช และไม่พบแบคทีเรียทั้งสามชนิดในตัวอย่างปลานิลจากอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช ผลการตรวจสอบครั้งนี้สอดคล้องกับการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกชนิดด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียด้วยวิธีการพื้นฐานและการใช้ชุดทดสอบ API 20 STREP ที่พบแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากตัวอย่างปลานิลในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลในอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช จำแนกชนิดได้เป็น *S. dysgalactiae* และ *S. equinus* ตามลำดับ

Thesis Title	Development of multiplex PCR technique for detection of Streptococcosis in economic fish of Thailand
Author	Mr. Akkarawit Itsaro
Major Program	Aquatic science
Academic Year	2010

ABSTRACT

This study was composed of two samplings. The first sampling, tilapia, sea bass, grouper, trash fish, soil and water from cage culture were collected in Krabi, Phatthalung and Songkhla provinces for detection of Gram-positive cocci that could be causing streptococcosis by spread plating technique. Gram-positive cocci were detected in water samples and tilapia cultured in Bangkaew, Sri Banpot district, Phatthalung province and in trash fish and cultured tilapia from Singha Nakhon district, Songkhla province. A multiplex PCR (m-PCR) technique was developed for detection of pathogenic bacteria, the causative agents of streptococcosis of fish i.e *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae* and *Lactococcus garvieae*. Study on the sensitivity of this technique indicated that the minimum DNA concentration detected by this technique were 9.76, 39.06 and 19.53 picogram for *S. agalactiae, S. iniae* and *L. garvieae,* respectively. The second sampling, healthy and diseased tilapia cultured in Paphayom and Bangkaew districts, Phatthalung province and Sichon and Hua Sai districts, Nakhon Si thammarat province were collected for detection of streptococcosis by m-PCR technique and spread plating technique. The m-PCR technique showed positive results for *S. agalactiae* from tilapia cultured in Bangkaew district, Phatthalung province and Hua Sai district, Nakhon Si Thammarat province and negative results for samples from Paphayom district, Phatthalung province and Sichon district, Nakhon Si Thammarat province. The results of m-PCR was in accordance with spread plating technique, biochemical tests of bacteria by conventional method and API 20 STREP system which detected *S. agalactiae* from tilapia cultured in the same areas. Bacteria isolated from

Paphayom district, Phatthalung province and Sichon district, Nakhon Si Thammarat province were identified as *S. dysgalactiae* and *S. equinus*, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนวิจัยประเภทเชื่อมโยงกับบัณฑิตศึกษา และทุนบัณฑิตยศึกษาจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสำเร็จได้โดยได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่าย บุคคลเหล่านี้ล้วนควรแก่การกล่าวถึง ด้วยความรู้สึกขอบคุณและยกย่องไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ชี้แนวทางในการวิจัย ให้คำแนะนำปรึกษาในระหว่างดำเนินการวิจัย การค้นคว้าแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ด้วยความเอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างดี ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ รองศาตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.นเรศ ซ่วนยุก ที่คอยให้คำปรึกษางานวิทยานิพนธ์ตลอดจนตรวจทานการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณคุณระพีพรรณ เลาหบรรจง คุณมณี ศรีชะนันท์ คุณสุณีย์ หวันเหล็ม และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ขอขอบคุณพี่ ๆ และน้อง ๆ นักศึกษาทุกระดับชั้นการศึกษา และเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาทุกท่านที่มีส่วนร่วมกับวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัว อิสสะโร และ สุวรรณโณ ทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจและกำลังทรัพย์ให้ในการเรียนระดับปริญญาโทในครั้งนี้ ถึงแม้จะยาวนานเกินไปแต่ก็พยายามจนสำเร็จครับ

สุดท้ายข้าพเจ้าขอน้อมระลึกถึงคุณความดีของรองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์ ผู้ที่มีคุณูปการต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ท่านเป็นผู้ชักชวนให้ข้าพเจ้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และคอยให้คำปรึกษา สั่งสอน และชี้แนะทั้งในส่วนของการศึกษา และการใช้ชีวิต ข้าพเจ้าขออุทิศคุณงามความดีของงานวิจัยนี้ให้แก่ท่าน

อัครวิทย์ อิสสะโร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบัญ	(7)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
1. ปลาเศรษฐกิจ	3
2. แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม (Gram-positive cocci bacteria)	9
3. Multiplex PCR (m-PCR)	25
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	28
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา	29
1. วัสดุ	29
2. อุปกรณ์	32
3. วิธีการศึกษา	33
บทที่ 3 ผลการศึกษา	39
3.1 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1: สำรวจการแพร่กระจายของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม	39
3.1.1 สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง พฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลา	39
3.1.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม	42
3.1.3 การศึกษาคุณภาพน้ำ	47
3.2 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2: ตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมด้วยเทคนิค m-PCR	52

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.2.1 สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง พฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลา	52
3.2.2 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลานิล	54
3.2.3 การปรับสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค m-PCR สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย	57
3.2.4 การตรวจสอบผลด้วยเทคนิค m-PCR	63
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการศึกษา	72
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา	77
เอกสารอ้างอิง	79
ภาคผนวก	91
ประวัติผู้เขียน	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
Table 1	Value of production of fishes cultures in Thailand in 2008	3
Table 2	Biochemical characteristics of bacterial isolated from infected fish	12
Table 3	Phenotypic characteristics of *S. agalactiae* isolated from diseased fish	18
Table 4	Phenotypic characteristics of *S. iniae* isolated from diseased fish	21
Table 5	Phenotypic characteristics of *L. garvieae* isolated from diseased fish	23
Table 6	Oligonucleotide primer sets used for m-PCR assay	36
Table 7	Fish Sampling sites and body weigth of fish in 2007	40
Table 8	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured tilapia	42
Table 9	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in water and soil in tilapia culture site	43
Table 10	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured Asian sea bass	44
Table 11	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in water and soil in Asian sea bass culture site	44
Table 12	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured grouper	45
Table 13	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in water and soil in grouper culture site	46
Table 14	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in trash fish	47
Table 15	Water quality during tilapia cultivation in 2007	50
Table 16	Water quality during Asian sea bass and grouper cultivation in 2007	51
Table 17	Fish Sampling sites and body weigth of fish in 2010	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
Table 18	Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured tilapia (Apr-May 2010)	56
Table 19	Biochemical characteristics of Gram-positive cocci bacteria isolated from fish	56
Table 20	Optimization of final concentration of m-PCR mixture for detection of *S. agalactiae, S. iniae* and *L. garvieae*	58
Table 21	Condition of m-PCR reaction	58
Table 22	Detection of *S. agalactiae*, *S. iniae* and *L. garvieae* in tilapia tissues by m-PCR technique	66
Table 23	The m-PCR results of bacterial DNA isolated from tilapia samples	69
Table 24	Identification of Gram-positive coccal isolates by conventional method and m-PCR technique	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
Figure 1	Step of PCR reaction	27
Figure 2	Survey site during March-May 2007 and November-December 2007	30
Figure 3	Survey site during April-May 2010	31
Figure 4	Cage cultured sea bass and grouper Ao Luek, Krabi province	41
Figure 5	Cage cultured sea bass and grouper Nue Klong, Krabi province	41
Figure 6	Tilapia earthen ponds in Hua Sai, Nakhon Si Thammarat province	52
Figure 7	Mass mortalities of tilapia cultured in earthen pond in Hua Sai, Nakhon Si Thammatrat province during the outbreaks of streptococcosis	53
Figure 8	Gross photograph of dead tilapia scooping up from the earthen pond	53
Figure 9	Agarose gel showing 1,100, 870 and 220 bp m-PCR amplification products generated with different annealing temperature using 3 sets of oligonucleotide primers pLG-1/pLG-2, LOX-1/LOX-2 and F1/IMOD, capable of detecting specific sequence of 16S rDNA of *L. garvieae*, *lctO* of *S. iniae* and 16S rRNA of *S. agalactiae*, respectively.	59
Figure 10	Minimum DNA concentration for detection of *L. garvieae*, *S. iniae* and *S. agalactiae* by m-PCR using 3 sets of oligonucleotide primers pLG-1/pLG-2, LOX-1/LOX-2 and F1/IMOD, capable of detecting specific sequence of 16S rDNA of *L. garvieae*, *lctO* of *S. iniae* and 16S rRNA of *S. agalactiae*, respectively.	60
Figure 11	Patial DNA sequences of *L. garvieae* from m-PCR product. The shaded letters indicate the primers used for sequencing	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
Figure 12	Patial DNA sequences of *S. agalactiae* from m-PCR product. The shaded letters indicate the primers used for sequencing	62
Figure 13	Patial DNA sequences of *S. iniae* from m-PCR product. The shaded letters indicate the primers used for sequencing	63
Figure 14	Agarose gel showing m-PCR products of *S. agalactiae* from kidney and brain tissues of tilapia cultured in Bangkeaw, Phatthalung province	64
Figure 15	Agarose gel showing m-PCR products of *S. agalactiae* from tilapia cultured in Hua Sai, Nakhon Si Thammarat province	65
Figure 16	Patial DNA sequences of *S. agalactiae* from tilapia. The shaded letters indicate the primers used for sequencing	67
Figure 17	Agarose gel showing m-PCR products of *S. agalactiae* generated by using bacterial DNA isolated from fish	68

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยนับวันยิ่งมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากประชากรมีจำนวนเพิ่มขึ้น จึงทำให้ความต้องการบริโภคอาหารโดยเฉพาะสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูกและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่การจับสัตว์น้ำจากแหล่งธรรมชาติได้ปริมาณลดลงซึ่งสาเหตุหลักมาจากการจับที่มากขึ้นทำให้สัตว์น้ำตามธรรมชาติลดลง จึงทำให้เกษตรกรจำนวนมากให้ความสนใจประกอบอาชีพเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันมากขึ้น เห็นได้จากข้อมูลการจับสัตว์น้ำจากส่วนของการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นโดยในปี พ.ศ. 2537 มีปริมาณการจับจากการเพาะเลี้ยงคิดเป็น 14.7 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสัตว์น้ำทั้งหมด เมื่อถึงปี พ.ศ. 2551 ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 41.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการจับสัตว์น้ำทั้งหมด (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2553) แต่ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในการเพาะเลี้ยงคือ การที่สัตว์น้ำหรือปลาที่เลี้ยงเกิดโรค ซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเลี้ยงแบบหนาแน่น (Intensive culture system) คุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยง การให้อาหาร รวมถึงปลาที่นำมาเลี้ยงอาจมีคุณภาพไม่ดีพอ จึงก่อให้เกิดโรคได้ โดยโรคที่พบมีหลายชนิดทั้งโรคที่เกิดจากโปรโตซัว เชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย ในส่วนของแบคทีเรียที่สำคัญที่ก่อโรคในสัตว์น้ำนั้น ได้แก่ *Aeromonas* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Vagococcus* sp., *Streptococcus* sp. (มานพ, 2544; Yanong and Francis-Floyd, 2002) และ *Vibrio* sp. (Toranzo *et al*., 2005)

โรคสเตรปโตคอคโคซีส (Streptococcosis) เกิดจากแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. เป็นโรคที่พบในปลาหลายชนิดทั่วโลก ทั้งในน้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำจืด สำหรับปลาทะเล เช่น ปลา yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) ปลา Japanese horse mackerel (*Trachurus japonica*) ปลากระบอก (*Mugil cephalus*) และปลาสลิดหิน (*Siganus canaliculatus*) (Kusuda *et al.,* 1976 อ้างโดย Austin and Austin, 1987; Kusuda *et al.,* 1978; Foo *et al*., 1985) และสำหรับปลาน้ำจืด เช่น ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*Salmo gairdneri*) ปลา ayu (*Plecogotossus altivelis*) และปลานิล (*Tilapia nilotica*) (Kitao *et al*., 1981; Eldar *et al*., 1997) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสครั้งแรกในปลาบู่ทราย

(*Oxyeleotris marmoratus*) (จิราพร และคณะ, 2529) ต่อมาในปี พ.ศ. 2530 และปี พ.ศ. 2543 มีรายงานเพิ่มเติมว่าพบในปลากะพงขาว และในปลานิลในปี พ.ศ. 2548 (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543; นเรศ และคณะ, 2548) และยังคงเกิดการระบาดของโรคนี้อย่างต่อเนื่องทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็มที่เลี้ยงในประเทศไทย (Suanyuk *et al*., 2008; 2010)

การตรวจสอบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสตั้งแต่ อดีตจนถึงปัจจุบัน มีหลายวิธีตั้งแต่การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี กายภาพ และซีรั่มวิทยา จนถึงปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการเพื่อตรวจสอบผลได้อย่างรวดเร็ว เช่นการใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction) โดยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมที่สนใจภายในหลอดทดลอง ทำให้สามารถตรวจสอบผลได้รวดเร็วกว่าหลายวิธี อย่างไรก็ดีเทคนิคพีซีอาร์ถือเป็นเทคนิคพื้นฐานหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่นการใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจสอบโรคติดเชื้อหลาย ๆ ชนิดในครั้งเดียวกัน หรือที่เรียกว่ามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (m-PCR, Multiplex PCR) ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีส อันได้แก่ *S. agalactiae*, *S. iniae* และ *L. garvieae* ในปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งจะทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรคได้รวดเร็วยิ่งขึน อีกทั้งมีความละเอียดในการวินิจฉัยมากกว่าวิธีการเพาะแบคทีเรียและการทดสอบทางชีวเคมี

ตรวจเอกสาร

1. ปลาเศรษฐกิจ

จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทยปีพ.ศ. 2551 พบว่าปริมาณการจับสัตว์น้ำในกลุ่มของปลามีปริมาณสูงถึง 2,003,200 ตัน ซึ่งคิดเป็น 62.52 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสัตว์น้ำทั้งหมดที่จับได้โดยในภาคการเพาะเลี้ยงพบว่า ปลาที่มีการเพาะเลี้ยงและสามารถทำรายได้ให้กับประเทศ 10 อันดับแรก (Table 1) ได้แก่ ปลานิล ปลาดุก ปลาตะเพียน ปลาช่อน ปลากะพงขาว ปลาสลิด ปลาเก๋า ปลาไน ปลาสวาย-เทโพ และปลาหมอ ตามลำดับ

Table1. Value of production of fishes cultures in Thailand in 2008.

Fish	Value (Million Baht)	Fish	Value (Million Baht)
Nile Tilapia	9,754.7	Snake skin gourami	1,475.9
Walking catfish	5,896.0	Grouper	1,100.1
Common silver barb	3,155.1	Common carp	857.2
Striped snake-head	1,971.1	Catfish	717.3
Sea bass	1,492.5	Common climbing perch	535.6
		Total	26,955.5

Source: Department of Fishries (2010)

1.1 ปลานิล

ปลานิล *Oreochromis niloticus* เป็นปลาที่อยู่ในตระกูลชิคลิดี (Cichlidae) มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา นำเข้ามาประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิ์อากิฮิโต เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ทรงจัดส่งมาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508

ปลานิลเป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อได้เป็นอย่างดีจึงได้รับความนิยมและเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย และเป็นปลาที่มี

คุณค่าทางเศรษฐกิจนับตั้งแต่ปี 2508 ปัจจุบันสามารถส่งเป็นสินค้าออกไปสู่ต่างประเทศในลักษณะของปลาแล่เนื้อ ตลาดที่สำคัญ ๆ อาทิ ประเทศญี่ปุ่น ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศอิตาลี เป็นต้น (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2543)

นักวิทยาศาสตร์ได้ลำดับอนุกรมวิธานของปลานิลไว้ดังนี้

Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata
Class Actinopterygii
Order Perciformes
Family Cichlidae
Genus *Oreochromis*
Species *niloticus*

1.1.1 ลักษณะทั่วไป

รูปร่างลักษณะของปลานิล มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9-10 แถบ มีครีบหลัง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อนเช่นเดียวกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำตัดขวางอยู่ทั่วไป (ยุพินท์, 2539)

1.1.2 พันธุ์ปลานิล

ปลานิลสามารถจัดจำแนกได้หลายพันธุ์ดังนี้

1. Genera *Oreochromis* สำหรับปลาในสกุลนี้ เพศเมียเท่านั้นที่จะดูแลลูกด้วยวิธีการอมไข่และมีการสร้างรัง เหงือกจะมีซี่กรอง 15-27 อัน ฟันบริเวณขากรรไกรและคอหอยมีหลายขนาด ตั้งแต่ฟันค่อนข้างหยาบไปจนถึงฟันละเอียด

2. Genera *Sarotherondon* ปลาในสกุลนี้ทั้งเพศผู้และเพศเมียจะอมไข่ไว้ในปาก เหงือกมีซี่กรอง 12-27 อัน มีฟันบนขากรรไกรและที่บริเวณคอหอยมีฟันแบบละเอียด

3. Genera *Tilapia* สำหรับปลาในสกุลนี้มีลักษณะการวางไข่เกาะติดกับวัตถุและจะมีการเฝ้าดูแลไข่ตลอดเวลา ในส่วนของกระดูกเหงือกมีซี่กรอง 6-12 อัน มีฟันแบบหยาบบริเวณขากรรไกรและส่วนล่างของคอหอย (เพ็ญพรรณ, 2543)

1.1.3 การแพร่กระจาย ถิ่นที่อยู่อาศัย และความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ปลานิลสามารถพบและเลี้ยงได้ทั้งในแหล่งน้ำจืดไปจนถึงน้ำเค็ม พบมาในเขตร้อนที่มีอุณหภูมิน้ำในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส มีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง ตามแม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง และทะเลสาบ มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ปลานิลแต่ละชนิดมีความไวต่อความเค็มแตกต่างกัน บางชนิดสามารถทนอยู่ในน้ำทะเลได้ บางชนิดสามารถทนความเค็มได้ถึง 45 ส่วนในพันส่วน แต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ดีในช่วง 6.5-8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิร้อนได้ถึง 40 องศาเซลเซียส สามารถทนอุณหภูมิเย็นได้ถึง 8 หรือ 9 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนัก เพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลาอยู่ในเขตร้อน (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2543)

ในด้านผลผลิตของปลานิลในประเทศไทย (รวมทุกสายพันธุ์) จากสถิติการประมง พบว่าเมื่อปี 2543 ประเทศไทยผลิตได้ 122,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,493.8 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2548) แต่เมื่อปี 2551 มีปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 269,500 ตัน โดยคิดเป็นมูลค่า 9,754.7 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2553)

1.2 ปลากะพงขาว

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่งที่สามารถปรับตัวให้อยู่ในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็มได้ มีขนาดใหญ่และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถหาพันธุ์ได้ง่าย เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาดดี ราคาค่อนข้างสูง เป็นที่ต้องการของตลาดมาก ปลาชนิดนี้นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในแถบจังหวัดชายทะเลของประเทศไทย นอกจากเลี้ยงเพื่อการบริโภคในประเทศแล้วยังส่งไปขายยังต่างประเทศ เช่น ประเทศไต้หวัน สิงคโปร์ มาเลเซีย ฮ่องกง และประเทศจีน เป็นต้น ปลากะพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* (Bloch) ชื่อสามัญ seabass, giant perch, white seabass, silver seabass, palmer, cock-up, baramundi และ two finned seabass (Rabanal and Soesanto, 1982) มีชื่อเรียกตามถิ่นที่อยู่ว่า “ปลากะพง” “ปลากะพงขาว” (ปัญญา, 2534)

นักวิทยาศาสตร์ได้ลำดับอนุกรมวิธานของปลากะพงขาวไว้ดังนี้

Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata
Class Actinopterygii
Order Perciformes
Family Centropomidae
Genus *Lates*
Species *calcarifer*

1.2.1 ลักษณะทั่วไป

มีลำตัวค่อนข้างยาวและหนา แบนข้างเล็กน้อย ส่วนตัวจะลาดชันและเว้า ส่วนของขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้นและตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียดบนขากรรไกรบนและล่าง และที่เพดานปาก ตามีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม มีขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ และเรียงต่อด้วยซี่เล็ก ๆ จัดตามแนวหลัง ด้านบนส่วนหัวและบนแผ่นเหงือก มีเกล็ดขนาดต่าง ๆ กัน เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่ ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องจะมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างลำตัวมีสีเงิน ครีบหลัง ครีบก้น ครีบหาง จะมีสีเทาปนดำบาง ๆ มีครีบหลังสองตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็งที่แหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบาง ๆ ครีบหลังตอนที่สองแยกจากตอนแรกอย่างเห็นได้ชัด มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนง มี 10-11 ก้าน ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีบหลังตอนที่สอง ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 7-8 ก้าน ข้อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลม เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 52-61 เกล็ด (กรมประมง, 2544)

1.2.2 การแพร่กระจาย ถิ่นที่อยู่อาศัย และความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีการแพร่กระจายในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน สามารถพบได้ในพื้นที่ระหว่างเส้นลองจิจูด (longitude) ที่ 50-160 องศาตะวันออก และเส้นละติจูด (latitude) ที่ 24 องศาเหนือ ถึง 25 องศาใต้ โดยครอบคลุมอาณาบริเวณของเขตน่านน้ำประเทศ

จีนไปจนถึงอ่าวเปอร์เซีย และแพร่กระจายตามหมู่เกาะต่าง ๆ ในประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย พม่า ออสเตรเลีย และศรีลังกา (Chomdej, 1986) ในประเทศไทยพบปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ทุกจังหวัดชายทะเลทั้งในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากชายฝั่งมากนัก โดยอาศัยอยู่ชุกชุมตามปากแม่น้ำ ลำคลอง และปากทะเลสาบ นอกจากนี้ปลากะพงขาวยังสามารถขึ้นไปอาศัยและเจริญเติบโตในแหล่งน้ำจืดได้ด้วย จึงจัดเป็นปลาประเภทสองน้ำ มีการอพยพย้ายถิ่นระหว่างน้ำจืดและน้ำเค็มอยู่เสมอ โดยเฉพาะเมื่อมีความสมบูรณ์ทางเพศต้องอพยพไปสู่ปากแม่น้ำและทะเลเพื่อสืบพันธุ์วางไข่ต่อไป ปลากะพงขาวเป็นปลาที่ปราดเปรียว ว่องไว ว่ายน้ำรวดเร็ว สามารถกระโดดพ้นน้ำได้สูงขณะตกใจหรือไล่เหยื่อ มีนิสัยซุกซ่อนอยู่ตามซุ้ม หลักโป๊ะ หรือกองหินใต้น้ำ และออกหากินในบริเวณที่มีกระแสน้ำอ่อน ปลาขนาดใหญ่มักไม่รวมฝูง นอกจากฤดูผสมพันธุ์จะรวมเป็นกลุ่มเล็ก ๆ (กรมประมง, 2544)

สำหรับความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลากะพงขาวเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสชาดดี ราคาค่อนข้างสูง และเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ จึงทำให้มีผู้สนใจเลี้ยงกันมาก ประกอบกับในปัจจุบันสถานีประมงน้ำกร่อยในสังกัดกรมประมงสามารถผลิตพันธุ์ปลากะพงเพื่อจำหน่ายจ่ายแจกให้กับประชาชน ทำให้ปริมาณการเลี้ยงขยายตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว จากข้อมูลของศูนย์สารสนเทศ กรมประมง (2553) พบว่าปริมาณผลผลิตสัตว์น้ำปี 2551 มีปริมาณของปลากะพงขาวทั้งหมดถึง 12,900 ตัน คิดเป็นเงินมูลค่า 1,492.5 ล้านบาท

1.3 ปลากะรัง

ปลากะรัง หรือมีชื่อเรียกตามภาษาชาวบ้านว่า ปลาเก๋า ปลาราปู (ภาคใต้) ปลาเก๋าฮื้อ ปลาราปูกะรัง หรือปลาตุ๊กแก ในน่านน้ำไทยมีอยู่มากมายหลายชนิดแต่มีไม่กี่ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันนับเป็นสัตว์น้ำชายฝั่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูง เนื้อมีรสชาดอร่อยจึงมักจะเป็นอาหารขึ้นโต๊ะในภัตตาคารชั้นนำ อีกทั้งเป็นที่นิยมรับประทานของชาวต่างประเทศ เช่น จีน สิงคโปร์ และมาเลเซีย เป็นต้น จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมากในปัจจุบัน (นิสราภรณ์, มปป.) สำหรับปลากะรังที่พบในประเทศไทยมีประมาณ 40 ชนิด ที่พบมากในภาคใต้มี 18 ชนิด สำหรับชนิดที่มีความสำคัญและถือเป็นปลาเศรษฐกิจ ได้แก่ ปลากะรังจุดน้ำตาล (*Epinephelus coioides*), ปลากะรังจุดดำ (*E. malabaricus*), ปลากะรังน้ำตาลหรือ

ปลากะรังลายหินอ่อน (*E. fuscoguttatus*) ปลากะรังหางตัด (*E. bleckeri*) ปลากะรังลายเสือ (*Plectropomus leopardus*) ปลากะรังลายจุด (*P. maculatus*) ปลากะรังหน้างอน (*Cromileptis altivelis*) (โปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต และศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549)

ลำดับอนุกรมวิธานของปลากะรังดังนี้

Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata
Class Actinopterygii
Order Perciformes
Family Serranidae

1.3.1 ลักษณะทั่วไป

ปลากะรังเป็นปลาที่มีรูปร่างยาวหรือป้อมเล็กน้อย ลำตัวมีขนาดใหญ่ หัวลาดโค้งลง สันหลังโค้งมากกว่าสันท้อง เกล็ดเล็กหรือโตพอสมควร ตาโตพอประมาณค่อนไปทางด้านบนของส่วนหัว มีเส้นข้างลำตัว 1 เส้นโค้งไปตามแนวสันหลังจรดไปตามครีบหาง มีปากกว้างเฉียงลงเล็กน้อย มีรูจมูกข้างละ 2 รู ริมฝีปากหนา กระดูกกรรไกรบนแผ่กว้าง ฟันบนขากรรไกรทั้งบนและล่างมีลักษณะที่เล็กแหลม มีฟันเขี้ยวใหญ่แซมอยู่ด้านหน้า กระดูกปิดเหงือกมีหนามแบน ๆ 1-3 ก้าน ครีบหลังเป็นครีบเดียวมีก้านครีบแข็งตั้งแต่ 2-15 ก้าน มีก้านครีบอ่อนตั้งแต่ 10-30 ก้าน ครีบอกส่วนมากกลม ครีบท้องมีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน และก้านครีบอ่อน 5 ก้าน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน มีก้านครีบอ่อน 6-12 ก้าน ครีบหางกลมมีลักษณะตัดหรือเว้าเล็กน้อย มีก้านครีบ 15-17 ก้าน (กรมประมง, 2536)

1.3.2 การแพร่กระจาย ถิ่นที่อยู่อาศัย และความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ปลากะรังเป็นปลาที่สืบพันธุ์วางไข่ในทะเลลึก มีความเค็มของน้ำสูง และลูกปลาจะเข้ามาเจริญเติบโตบริเวณชายฝั่งและปากแม่น้ำ โดยเริ่มวางไข่ในเดือนพฤศจิกายนไปจนถึงต้นเดือนธันวาคมของทุกปี เมื่อไข่ฟักเป็นตัว ลูกปลากะรังจะเริ่มเคลื่อนตัวเข้ามาในบริเวณชายฝั่งในช่วงเดือนดังกล่าว จะพบลูกปลาบริเวณปากแม่น้ำทั้งทางด้านทะเลอันดามัน และฝั่งอ่าวไทย

ปลากะรังเป็นปลาที่สามารถเปลี่ยนเพศได้ ขนาดสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 3 ปี น้ำหนักตัวประมาณ 3 กิโลกรัม ในช่วงแรกนี้จะเป็นเพศเมียทั้งหมด เมื่อปลาเจริญเติบโตจนมีน้ำหนักประมาณ 7 กิโลกรัมจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้ ปลากะรังเป็นปลาที่ชอบอาศัยอยู่ตามซอกหินปะการัง ส่วนปลาขนาดเล็กเข้ามาอาศัยอยู่ในเขตชายฝั่งหรือปากแม่น้ำ ปลากะรังไม่สามารถเข้ามาอาศัยอยู่ในน้ำจืดได้ สถานที่เลี้ยงจึงต้องมีความเค็มตลอดปี (กรมประมง, 2536)

ปลากะรังเป็นปลาที่มีตั้งแต่ขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ อาศัยอยู่ตามแถบชายฝั่งหน้าดิน ที่ก้นทะเล และหินปะการัง บางครั้งเข้ามาอาศัยที่ปากแม่น้ำเพื่อหาอาหาร พบอาศัยในแถบโซนร้อน และอบอุ่น มีนิสัยไม่ชอบอยู่ร่วมกับฝูง กินปลาเล็ก ๆ ตลอดจนสัตว์น้ำอื่น ๆ เป็นอาหาร สามารถเลี้ยงได้ทั้งในบ่อดินและในกระชัง ปลากะรังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นที่นิยมบริโภคของชาวเอเชีย มีราคาแพง (ไพโรจน์ และดุสิต, 2530) โดยผลผลิตรวมของปี 2551 มีปริมาณถึง 7,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,100.1 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2551)

2. แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม (Gram-positive cocci bacteria)

แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม มีด้วยกัน 17 สกุลที่แตกต่างกัน (Facklam, 2002) สำหรับในปลาแล้วโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ที่สำคัญได้แก่โรคสเตรปโตคอคโคซีส ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. โดยเชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อสูง สามารถติดต่อกันได้จากการสัมผัสกับปลาหรือบาดแผลของปลาที่ติดเชื้อ จากการที่ให้ปลากินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่ให้ (Inglis *et al*., 1993) นอกจากนี้ปลาที่เกิดความเครียดสามารถเกิดโรคได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงไม่เหมาะสม ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำ การสะสมของอินทรียสารในตะกอนดินที่เกิดจากอาหารที่เหลือจากการให้

2.1 การแบ่งกลุ่มของแบคทีเรีย Streptococci

การแบ่งกลุ่มของเชื้อ *Streptococcus* sp. โดยทั่วไปแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (haemolytic reaction) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Collin *et al*., 1989) คือ

1. Gamma - haemolytic Streptococci (γ - haemolytic Streptococci) แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะไม่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar (BA) เชื้อที่ขึ้นจะไม่มีวงใสรอบ ๆ โคโลนี สำหรับตัวอย่างของเชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. faecalis* โดยเชื้อในกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาได้หลายชนิด เช่น ในปลากัลฟ์คิลลิฟิช (*Fundulus grandis*) ที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา (Rasheed and Plumb, 1984) นอกจากนี้ยังเคยพบในปลาที่อ่าวเม็กซิโกอีกด้วย (Plumb *et al*., 1974)

2. Alpha - haemolytic Streptococci (α - haemolytic Streptococci) แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้แต่ไม่สมบูรณ์ โดยธาตุเหล็กในฮีโมโกลบินจะถูกออกซิไดซ์ทำให้อาหารรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียเห็นเป็นสีน้ำตาล หรือสีเขียวอ่อน แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. pneumoniae, S. salivarius, S. viridans* และ *L. garvieae* (Eldar *et al*., 1999) เป็นต้น มีรายงานการพบเชื้อแบคทีเรียที่จำแนกกลุ่มได้เป็น alpha - haemolytic Streptococci ในปลานิลลูกผสม (*O. niloticus* × *O. aureus*) ที่เลี้ยงในประเทศซาอุดิอาระเบีย (Al-Harbi, 1994) ปลาสลิดหิน (*Siganus canaliculatus*) ที่เลี้ยงในประเทศสิงคโปร์ (Foo *et al*., 1985) และปลาเทอร์บอท (*Scophthalmus maximus*) ในประเทศสเปน (Doménech *et al*., 1996)

3. Beta - haemolytic Streptococci (β - haemolytic Streptococci) แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ โดยรอบ ๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar มีขอบใสอย่างชัดเจน เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *S. agalactiae, S. equisimilis, S. milleri, S. pyogenes* (Stokes and Ridgwar, 1987), *S. iniae* และ *S. dysgalactiae* (Nomoto *et al*., 2004) เป็นต้น และปลาที่มีรายงานว่าสามารถเกิดโรคจากเชื้อในกลุ่มนี้เช่น ปลาหางเหลือง (Kawahara *et al*., 1984) ปลา ayu (Kawahara and Kuruda, 1987) ปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotica* × *T. aureu*) (Perera *et al*., 1994) ปลาเรดดรัม (Eldar *et al*., 1999) ปลาสไตรป แบส ลูกผสม (Evans *et al*., 2000) ปลาซีบรีม และปลากระบอก ในประเทศคูเวต (Evans *et al*., 2002) เป็นต้น

2.2 คุณสมบัติของแบคทีเรีย Streptococci

2.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

เป็นแบคทีเรียรูปกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.8-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะการเรียงตัวจะต่อกันเป็นสายสั้น ๆ หรืออยู่เป็นคู่ หากเลี้ยงในอาหารเหลว จะได้เชื้อที่ต่อกันเป็นสายยาว เป็นเชื้อแกรมบวก (Gram positive) ย้อมติดสีม่วง เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างรงควัตถุ ไม่มีการสร้างสปอร์ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเป็นกรด-ด่าง 9.6 สำหรับช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มนี้ไม่สามารถสร้าง catalase และ oxidase ได้ แต่สามารถเจริญได้ดีในน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ (Kawahara and Kusuda, 1987) สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BA (Schuhardt, 1987), Todd-Hewitt agar (THA), brain heart infusion (BHI) และ tryptic soy agar (TSA) (Inglis *et al*., 1993) แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI จะมีโคโลนีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร โคโลนีกลมนูน สีขาว ขอบเรียบ (จิราพร และคณะ, 2529) แบคทีเรียที่เจริญใน sheep blood agar ขนาดโคโลนีประมาณ 0.1-1.0 มิลลิเมตร ลักษณะสีขาวขุ่นอมเทา นูนเล็กน้อย และมีการย่อยเม็ดเลือด (haemolytic) แต่บน BA ที่ผสมเลือดม้า มนุษย์ หรือกระต่าย เชื้อจะไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ THA เชื้อที่เจริญจะมีลักษณะนูนโค้งเป็นครึ่งวงกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดของเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 มิลลิเมตร เชื้อมีสีเหลืองครีม ขาวขุ่น ขอบโคโลนีบาง (นันทนา, 2537; Inglis *et al*., 1993)

2.2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมี

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีเมตาบอลิซึมเป็นแบบ fermentation การหมักน้ำตาลกลูโคสเกิดกรดแลกติกเป็นแบบ homofermentative บางชนิดสามารถหมักกรดอินทรีย์ เช่น มาลิก และซิตริก หรือกรดอะมิโน (ดวงพร, 2537) สำหรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำนั้น พบว่าการผลิตกรดจากน้ำตาลนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ที่พบในแต่ละพื้นที่ เช่น จากการศึกษาของ Boomker และคณะ (1979 อ้างโดย Austin และ Austin, 1987) ได้ทำการแยกเชื้อจากทวีปอเมริกาใต้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถสลายโซเดียม ฮิบพูเรท ได้และสามารถผลิตกรดจากแป้งและน้ำตาล กาแลกโตส กลูโคส แลกโตส มัลโตส ซาลิซิน และ ทรีฮาโลส แต่จะไม่ผลิตกรดจาก อินูลิน และน้ำตาล อาราบิโนส แมนนิทอล ราฟฟิโนส ซอบิทอล ซูโครส และไซโลส แต่การศึกษาของ Kitao และคณะ (1981)

ซึ่งแยกเชื้อได้ที่ประเทศญี่ปุ่นนั้น เชื้อจะไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสลายโซเดียม ฮิบพูเรทได้ ในส่วนของเยาวนิตย์ และคณะ (2543) พบว่าเชื้อที่แยกได้นั้นสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลหลาย ๆ ชนิดได้เช่น จาก กลูโคส มัลโตส แมนนิทอล ซูโครส ฟรุกโตส และทรีฮาโลส แต่จะไม่ผลิตกรดจากน้ำตาล อาราบิโนส แลกโตส และไซโลส ส่วนคุณสมบัติอื่น ๆ ดังแสดงใน Table 2

Table 2. Biochemical characteristics of bacterial isolated from infected fish.

Test	Perera *et al.* (1994) Hybrid tilapia	Donayadol *et al.* (2000) Asian Sea bass	Wanman *et al.* (2005) Asian Sea bass
Gram stain	+	+	+
Haemolysis	β	β	γ
Catalase	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Motility	-	-	-
Growth in 6.5 percent NaCl	-	-	-
pH 9.6	-	-	+
temp 10 degree celsius	+	-	+
temp 45 degree celsius	+	-	-
Indole	nr	nr	-
Pyruvate	-	-	-
OF-medium	nr	nr	-
MR test	nr	-	-
Hippurate	-	nr	-
Esculin	nr	+	+
Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	nr	nr	+
α - D – galactopyranoside	nr	nr	-
β - D – glucuronate	nr	nr	-
β - D – galactopyranoside	nr	nr	-
2 – naphthyl phosphate	nr	nr	-
L-leucine -2- naphthylamide	nr	nr	-

(table cont.)

Table2. (Continued)

Biochemical test	Perera *et al.* (1994) Hybrid tilapia	Donayadol *et al.* (2000) Asian Sea bass	Wanman *et al.* (2005) Asian Sea bass
Arginine	+	+	+
Glycogen	nr	nr	-
Acid from:			
Glucose	+	+	+
Sucrose	+	+	-
Saccharose	nr	nr	-
Lactose	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Maltose			+
Dextrose	nr	nr	-
Sorbitol	-	nr	-
Ribose	nr	nr	+
L – Arabinose	-	-	-
Trehalose	-	-	+
Inulin	-	nr	-
Raffinose	-	nr	-
Xylose	-	-	-
Hydrolysis:			
Starch	+	+	+
Gelatin	-	nr	-

*: tolerance nr: not reported +: positive -: negative

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดแบคทีเรีย *Streptococcus* sp.

ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมที่มีผลให้เกิดการแพร่กระจายและการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. นั้นมีดังต่อไปนี้

2.3.1 ความหนาแน่นในการเลี้ยงและปริมาณของเชื้อที่ได้รับ

ความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเลี้ยงสัตว์น้ำให้เจริญเติบโตได้ดีนั้นขึ้นอยู่กับขนาด ชนิดของสัตว์น้ำ และปัจจัยอื่นในการเลี้ยง หากทำการเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง ส่งผลให้สัตว์น้ำที่เลี้ยงเกิดความเครียด และส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วย

Shoemaker และคณะ (2000) ศึกษาระดับความหนาแน่นในการเลี้ยงกับปริมาณของแบคทีเรียที่มีผลต่ออัตราการตายในปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. iniae* โดยแบ่งระดับความหนาแน่นในการเลี้ยงเป็น 3 ระดับคือ ความหนาแน่นต่ำ (ปลา 25 ตัวหรือ 5.6 กรัมต่อลิตร) ความหนาแน่นปานกลาง (ปลา 50 ตัวหรือ 11.2 กรัมต่อลิตร) และความหนาแน่นสูง (ปลา 100 ตัวหรือ 22.4 กรัมต่อลิตร) ในแต่ละความหนาแน่น ใช้ปริมาณแบคทีเรียที่แตกต่างกัน 3 ระดับคือ 2.5×10^7, 5.0×10^7 และ 1.0×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีการแช่ปลาในสารละลายแบคทีเรียนาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงต่อ พบว่าอัตราการตายอยู่ที่ 4.8, 28.4 และ 25.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับความหนาแน่น เห็นได้ว่าความหนาแน่นในการเลี้ยงยิ่งสูงขึ้นยิ่งทำให้อัตราการตายของปลาสูงขึ้นด้วย สอดคล้องกับรายงานของ นพดล และคณะ (2549) ที่ศึกษาระดับความหนาแน่นต่าง ๆ ต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ พบว่าการเลี้ยงแบบความหนาแน่นสูง (17 กรัมต่อลิตร) ปลามีอัตราการตายสะสมสูงกว่าที่ระดับความหนาแน่นปานกลาง (12 กรัมต่อลิตร) และความหนาแน่นต่ำ (8 กรัมต่อลิตร)

2.3.2 ความเค็ม

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ต่อความเค็มพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการเจริญเติบโตในระดับความเค็มที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังรายงานจากหลายแหล่ง เช่น *S. agalactiae* ที่แยกได้จากปลาจาระเม็ด (*Pampus argenteus* Euphrasen) ที่เลี้ยงในประเทศคูเวต พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเค็มตั้งแต่ 0.5-6.0 เปอร์เซ็นต์ แต่จะไม่เจริญเติบโตที่ความเค็ม 6.5 เปอร์เซ็นต์ (Duremdez *et al*., 2004) Chang และ Plumb (1996) ได้ศึกษาผลของความเค็มระดับต่าง ๆ ต่อการติดเชื้อ *Streptococcus* sp. ในปลานิล โดยใช้ระดับความเค็ม 0, 15 และ 30 ส่วนในพันส่วน ร่วมกับอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทั้ง 3 ระดับความเค็ม มีการตายของปลาสูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Perera และคณะ (1997) ที่รายงานว่าปลาจะมีการตายสูงที่ระดับความเค็มของน้ำสูง

2.3.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิของน้ำเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิด และการแพร่กระจายของโรค Ghittino และ Prearo (1992) รายงานว่าน้ำที่มีอุณหภูมิ 21-22 องศาเซลเซียส สามารถทำให้ปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่เลี้ยงในประเทศอิตาลีเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Palacios และคณะ (1993) พบการระบาดของโรคในปลาเรนโบว์เทร้าท์ในประเทศสเปนที่อุณหภูมิน้ำสูงกว่า 17 องศาเซลเซียส แต่ Hudson และ Peters (2005) รายงานว่าโรคนี้สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียสขึ้นไป

Perera และคณะ (1997) ได้รายงานผลของอุณหภูมิต่ออัตราการตายของปลานิลลูกผสมที่ได้รับเชื้อ *S. iniae* พบว่าในทุกช่วงอุณหภูมิ (20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) พบปลาตายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบการตายเล็กน้อยหลังจากได้รับเชื้อ 4 วัน

2.4 การแพร่กระจายของเชื้อ

แบคทีเรีย *Streptococcus* sp. สามารถแพร่กระจายได้ทั้งในปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย และปลาทะเล แต่โดยทั่วไปแล้วเชื้อจะมีความรุนแรงมากในปลาทะเล ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในระดับความเค็มที่กว้างคือตั้งแต่ 0-30 ส่วนในพันส่วน หากแยกเชื้อจากปลาน้ำกร่อยหรือปลาน้ำจืดจะพบว่าแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. บางชนิดจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีความเค็มมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ (Kitao *et al.*, 1981)

แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่ได้ในดินโคลนและน้ำ โดยพบเชื้อได้ทุกฤดู ซึ่งการระบาดของเชื้อในปลาจะเกิดขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เป็นสาเหตุทำให้ปลาเกิดความเครียดและติดเชื้อได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของโรค นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถอยู่ในปลาแช่แข็งที่นำมาเป็นอาหารให้กับปลาที่เลี้ยงได้นานถึง 6 เดือน (Minami, 1979 อ้างโดย Inglis *et al.*, 1993) ในส่วนของการถ่ายทอดของโรคนั้น เกิดจากการที่ไปสัมผัสกับปลาที่ติดเชื้ออยู่ หรือจากการปนเปื้อนของเชื้อในปลา แล้วนำปลาไปใช้เป็นอาหารก็สามารถเกิดการถ่ายทอดของเชื้อได้ นอกจากการสัมผัสและการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อแล้วการแช่ปลาลงในสารละลายเชื้อ *Streptococcus* sp. และวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง หรือกล้ามเนื้อ พบว่าสามารถทำให้ปลาเกิดโรคได้เช่นกัน (Robinson and Meyer, 1966 อ้างโดย Inglis *et al.*, 1993; McNulty *et al.,* 2003)

2.5 อาการและการเกิดโรค

อาการของโรคที่ปรากฏภายนอกจะแตกต่างและเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของปลาที่ได้รับเชื้อ แต่ส่วนใหญ่ปลาที่ติดโรคนี้ จะพบอาการว่ายน้ำแบบควงสว่าน เสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ ในปลาบางชนิดเช่นในปลานิลแดงแปลงเพศพบว่าปลาป่วยจะมีสีลำตัวซีดจางลง (นเรศ และคณะ, 2548) ตาขุ่น ตาโปนโดยอาจเกิดเพียงข้างเดียวหรือทั้ง 2 ข้าง นอกจากนี้ยังมีอาการท้องบวม มีการตกเลือดตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเช่น รอบปาก กระพุ้งแก้ม ตา โคนครีบและลำตัว เกิดบาดแผลบริเวณลำตัว (Austin and Austin, 1987) โดยแผลจะค่อย ๆ ขยายออกเรื่อย ๆ แล้วเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลจะเกิดการตาย รอบ ๆ บาดแผลจะมีสีคล้ำ นอกจากนี้อาจเกิดบาดแผลบริเวณตา ซึ่งเป็นผลมาจากการคั่งของเลือดบริเวณหลังลูกตา และเกิดการบวมน้ำ เบ้าตาขยายกว้าง เกิดการตกเลือดบริเวณเนื้อเยื่อในลูกตา เกิดวุ้นใสในเบ้าตา และเกิดการตายของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในตา เช่น บริเวณกระจกตา, optic nerve และ choroid (Inglis *et al*., 1993) จิราพร และคณะ (2529) รายงานว่าในปลาบู่ทราย (*Oxyeleotris marmoratus*) ที่เลี้ยงในกระชัง ปลาที่ป่วยเป็นโรคมีอาการตาขุ่น ตาโปน มีของเหลวปนน้ำเลือดขังภายในลูกตา กมลพร (2539) รายงานว่าพบปลานิลอาการตาขุ่นขาว ว่ายน้ำช้า ๆ หรือลอยตัวนิ่ง รอบ ๆ ช่องขับถ่ายมีสีแดง ตาโปน โดยลักษณะอาการดังกล่าวเหมือนกับที่พบในปลานิลลูกผสม (Al-Harbi, 1994)

สำหรับอาการภายใน พบการติดแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ในอวัยวะภายในหลายส่วน ได้แก่ ตับ ไต สมอง ม้าม และหัวใจ โดยตับจะมีอาการบวมผิดปกติ มีสีซีดและเซลล์ตับเกิดการตาย หัวใจมีการอักเสบบริเวณเยื่อหุ้มหัวใจ ม้ามมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีเซลล์บวมและมีสีแดงคล้ำ ภายในช่องท้องมีของเหลวสะสมอยู่ มีเลือดคั่งในระบบทางเดินอาหาร และเกิดการอักเสบบริเวณลำไส้ (Austin and Austin, 1987; Inglis *et al*., 1993; Perera *et al*., 1994; Plumb, 1994) โดยพบรายงานลักษณะอาการดังกล่าวในปลาหางเหลือง (Sano and Fukuda, 1987) ปลานิล (กมลพร, 2539) ปลาสลิดหิน (Yuasa *et al*., 1999) ปลาเรดดรัม (Eldar *et al*., 1999) และปลากะพงขาว (เยาวนิตย์ และคณะ, 2543) ในปลาสไตรป แบส (striped bass) และปลาซีเทร้าท์ (*Cynoscion regalis*) พบว่ามีการสะสมของของเหลวสีเหลืองถึงเหลือง-แดงในช่องท้อง มีสารเหนียวสีเหลืองถึงเหลือง-เขียวในบริเวณลำไส้ตอนปลาย ม้ามมีสีคล้ำและขนาดใหญ่ขึ้น ตับเหลือง และเกิดการตายของเนื้อเยื่อไต ในด้านการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาวและปลานิลแดงแปลงเพศพบว่าค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน พลาสมาโปรตีน ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวมีค่าลดลง (เฉลิม และคณะ, 2548; นเรศ และคณะ, 2548)

2.6 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในสัตว์น้ำ

มีแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. หลายชนิดที่สามารถก่อโรคในปลาและสัตว์น้ำได้ เช่น *S. agalactiae, S. dysgalactiae, S. equi, S. equisimilis, S. faecium, S. pyogenes*, *S. zooepidemicus*, *S. iniae, S. parauberis, S. shiloi* และ *S. difficile* (Alcaide *et al*., 2000; Austin and Austin, 1987; Doménech *et al*., 1996; Eldar *et al*., 1994; Evans *et al*., 2000) พบการเกิดโรคชนิดนี้ในปลานิลและปลาเรนโบว์เทร้าท์ ในประเทศอิสราเอล ปลาเทอร์บอท และปลาแอมเบอร์แจ็ค เป็นต้น (Doménech *et al*., 1996; Alcaide *et al*., 2000) และพบว่าแบคทีเรีย *S. iniae* เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลมากที่สุด (Evans *et al*., 2000) Cowan (1974 อ้างโดย Austin and Austin, 1987) พบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ (beta-haemolytic bacteria) เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้มากกว่ากลุ่มอื่น และนอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย *L. garvieae* ที่ทำให้เกิดโรคแลคโตคอคโคซีสนั้นยังมีลักษณะอาการของโรคคล้ายคลึงกับโรคสเตรปโตคอคโคซีสด้วย ซึ่งพบว่าเกิดโรคนี้ขึ้นในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (Barnes *et al*., 2002) และปลาอื่น ๆ อีกหลายชนิด

Toranzo และคณะ (2005) ได้แบ่งหมวดหมู่ของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ด้วยพื้นฐานทาง DNA โดยใช้ DNA hybridization ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียอย่างน้อย 5 ชนิดที่มีความสำคัญมากกับการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลา ได้แก่ *S. iniae*, *S. agalactiae*, *S. parauberis*, *L. Garvieae* และ *Vagococcus salmoninarum* สำหรับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในเขตน้ำอุ่นที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *S. iniae*, *S. agalactiae* และ *L. garvieae* (จิราพร และคณะ, 2529; นเรศ และคณะ, 2548; เยาวนิตย์ และคณะ, 2543; Suanyuk, 2009; Suanyuk *et al*., 2008; 2010)

2.6.1 *Streptococcus agalactiae*

แบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6 – 1.2 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นโซ่ยาว หรือแบบคู่ (Rotta, 1986) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส มีคุณสมบัติทางซีรั่มวิทยาเป็นแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์เป็นกลุ่ม B (Evans *et al*., 2002) คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่มีรายงานพบในปลาดังแสดงใน Table 3 เป็นชนิดที่พบทั้งในวัว (Martinez *et al*., 2000, 2001; Meiri-Bendek *et al*., 2002) ปลาเศรษฐกิจหลายชนิดได้แก่ ปลาจาระเม็ดขาว (Duremdez *et al*., 2004) ปลาซีบรีม (*Sparus auratus* L.) ปลากระบอก (*Lisa klunzingeri* Day) (Evans *et al*.,

2002) และปลานิล (นเรศ และคณะ, 2548; Suanyuk *et al*., 2008) โดยมีลักษณะอาการคือ ว่ายน้ำควงสว่าน สูญเสียการทรงตัว ตาขุ่น ตกเลือดบริเวณตา ลำตัว ปาก แผ่นปิดเหงือกและครีบ อาการที่พบภายในได้แก่ ตับ และม้ามโตผิดปกติ เลือดคั่งในสมอง และมีน้ำสะสมในช่องท้อง (Evans *et al*., 2002; Duremdez *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดแบคทีเรียชนิดนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน (Evans *et al*., 2009) และในคน (Persson *et al*., 2004; Ip *et al*., 2006) สำหรับหญิงมีครรภ์อาจส่งผลให้เกิดการแท้งหรือตายหลังการคลอด และยังพบการติดเชื้อนี้ในทารกแรกเกิดโดยได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากมารดา ซึ่งส่งผลให้เด็กพิการหรือตายในอัตราที่สูงขึ้น แบคทีเรียชนิดนี้ยังไม่มีการรายงานการติดเชื้อจากปลาไปสู่คน แต่มีการศึกษาการนำแบคทีเรียชนิดนี้ที่ได้จากคนฉีดเข้าตัวปลานิล พบว่าที่ความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรียที่ต่ำสุดของการทดลอง (10^2 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) สามารถทำให้ปลาตายถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (Evans *et al*., 2009)

Table 3. Phenotypic characteristics of *S. agalactiae* isolated from diseased fish.

Test	Evans *et al.* (2002)		Duremdez *et al.* (2004)	Suanyuk *et al.* (2005)
Fish	Mullet	Sea beam	Silver pomfret	Tilapia
Gram staining reaction	+	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci/ovoid	Cocci
Motality	nr	nr	-	nr
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Indole	nr	nr	nr	nr
Voges Proskauer	-/+	-/+	-	+
Haemolysis	β	β	β	β
Serogroup	B	B	B	B
Growth:				
- 6.5% NaCl	nr	nr	-	+
- pH 9.6	nr	nr	-	+*

(table cont.)

Table 3. (Continued)

Test	Evans *et al.* (2002)		Duremdez *et al.* (2004)	Suanyuk *et al.* (2005)
- temp 10 degree celsius	-	-	-	+*
- temp 37 degree celsius	nr	nr	+	+(35ºC)
- temp 45 degree celsius	nr	nr	-	-
Hippurate	-/+	+	+	+
Esculin	nr	nr	-	-
Arginine	+	+	+	+
Pyrrolidonyl arylamidase	-	-	-	-
Starch	-	-	-	nr
Gelatin	nr	nr	-	nr
α-Galactosidase	-/+	+	-	+
β-Glucuronidase	+	+	-	+
β-Galactosidase	-	-	-	-
Fish	Mullet	Sea beam	Silver pomfret	Tilapia
Alkaline phosphatase	-/+	+	+	+
Leucine aminopeptidase	+	+	+	+
Acid production from:				
- Arabinose	-	-	-	-
- Mannitol	-	-	-	-
- Sorbitol	-	-	-	-
- Lactose	-	-	-	-
- Trehalose	+	+	+	+
- Inulin	nr	nr	-	-
- Raffinose	-	-	-	-
- Sucrose	+	+	nr	+
- Maltose	+	+	nr	+

(table cont.)

Table 3. (Continued)

Test	Evans *et al.* (2002)		Duremdez *et al.* (2004)	Suanyuk *et al.* (2005)
- Ribose	+	+	+	+
- AMD	nr	nr	-	-
- Glycogen	-/+	-	-	-

*: tolerance nr: not reported +: positive -: negative

2.6.2 *Streptococcus iniae*

แบคทีเรีย *S. iniae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 1.5 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวเป็นสายโซ่ยาว เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือด (BA) โคโลนีของแบคทีเรียจะมีขนาดเล็กประมาณ 1 ไมโครเมตร รอบ ๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BA สามารถเห็นขอบใสได้อย่างชัดเจนหรือเห็นเป็นสีน้ำตาล และสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ THB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีอากาศ สามารถผลิตกรดจากเด็กซ์แตรน ฟรุกโตส กาแลกโตส กลูโคส และอื่น ๆ สลายแป้งและเอสคูลินได้แต่ไม่สามารถย่อย โซเดียม ฮิบพูเรท และเจลาตินได้ (Rotta, 1996) คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *S. iniae* ที่มีรายงานพบในปลาดังแสดงใน Table 4 แบคทีเรียชนิดนี้พบครั้งแรกในปลาโลมา (Amazon Freshwater dolphin: *Inia geoffrensis*) (Pier and Madin, 1976) มีรายงานถึงอัตราการตายของปลาที่ได้รับแบคทีเรียนี้ 30 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของปลาที่เลี้ยง (Center for Food Security and Public Health, 2005) นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคในปลาหลายชนิดจากหลายประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศญี่ปุ่น ประเทศไต้หวัน ประเทศอิสราเอล และประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบว่าเกิดโรคในปลานิลได้มากที่สุด รวมถึงพบในปลาสไตรป แบสลูกผสม (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) ปลาซีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*) ปลากะพงขาว ปลากะรังจุดน้ำตาล และปลาเรดดรัม (*Sciaenops ocellatus*) (Bromage *et al*., 1999; Buller, 2004; Eldar *et al*., 1999; Evans *et al*., 2000; Lahav *et al*., 2004 ; Nguyen *et al*., 2002; Suanyuk *et al*., 2010; Weinstein *et al*., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้ปลานิลมีอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำควงสว่าน เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และตายในที่สุด (Austin and Austin, 1987) ในปลาเรนโบว์เทร้าท์พบว่าเมื่อปลาได้รับแบคทีเรียชนิดนี้ ทำให้ปลาตาขุ่น โปน ระบบประสาทส่วนกลางถูกทำลายเลือดคั่ง และตาย (Lahav *et al*., 2004) สำหรับในมนุษย์

แบคทีเรียชนิดนี้มีโอกาสติดต่อจากปลาสู่คนได้โดยการสัมผัสกับปลาที่มีเชื้อแบคทีเรียนี้ (Lau *et al*., 2006) โดยจะเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เข้าไปก่อโรคในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง มีรายงานการติดเชื้อชนิดนี้ครั้งแรกที่เท็กซัส ในปี ค.ศ. 1991 และครั้งต่อมาที่เมืองออตตาวาในปี ค.ศ.1994 แต่ไม่ได้ระบุถึงแหล่งที่มา (Centers for Disease Control and Prevention, 1996) หลังจากนั้นปีค.ศ. 1995 ที่เมืองโตรอนโต้ มีการรายงานพบผู้ป่วยชาวเอเชีย 3 ราย เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลโดยมีอาการอักเสบบริเวณมือหลังจากได้รับบาดเจ็บระหว่างการแล่เนื้อปลาดิบ การตรวจสอบเริ่มแรกพบแบคทีเรีย *S. uberis* แต่ภายหลังระบุแน่ชัดว่าเป็น *S. iniae* อาการทั่วไปที่พบในผู้ป่วยคือเกิดอาการอักเสบของเนื้อเยื่ออย่างเฉียบพลันในผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ (Weinstein *et al*., 1997)

Table 4. Phenotypic characteristics of *S. iniae* isolated from diseased fish.

Test	Al-Harbi (1994)	Perera *et al.* (1994)	Bromage *et al.* (1999)
Fish	Hybrid tilapia	Hybrid tilapia	Barramundi
Gram staining reaction	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci
Motality	-	-	-
Oxidase	-	nr	-
Catalase	-	-	-
Indole	-	nr	nr
Voges Proskauer	+	nr	nr
Haemolysis	α	β	β
Growth:			
- 6.5% NaCl	-	-	-
- pH 9.6	+	-	-
- temp 10 degree celsius	-	+	-
- temp 37 degree celsius	+[A]	+	nr
- temp 45 degree celsius	-	+	-

(table cont.)

Table 4. (Continued)

Test	Al-Harbi (1994)	Perera *et al.* (1994)	Bromage *et al.* (1999)
Hippurate	-	-	-
Esculin	+	nr	+
Arginine	+	+	+
Pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+
Starch	+	+	+
Gelatin	-	-	nr
α-Galactosidase	-	nr	-
β-Glucuronidase	+	nr	+
β-Galactosidase	-	nr	-
Alkaline phosphatase	+	nr	+
Leucine aminopeptidase	+	nr	+
Acid production from:			
- Arabinose	-	-	-
- Mannitol	+	+	+
- Sorbitol	-	-	-
- Lactose	-	-	-
- Trehalose	+	+	+
- Inulin	-	-	-
- Raffinose	-	-	-
- Sucrose	-	+	+
- Maltose	nr	+	nr
- Ribose	+	nr	+
- AMD	-	nr	nr
- Glycogen	+	nr	nr

nr: not reported +: positive -: negative A: test at 35 celsius degree

2.6.3 *Lactococcus garvieae*

แบคทีเรีย *L. garvieae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมอีกชนิดหนึ่ง อยู่ในสกุล *Lactococcus* รวมอยู่ใน family Streptococcaceae มีการเรียงเป็นโซ่สั้น ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถย่อยสลายเลือดบนอาหาร BA ได้เป็นแบบ alpha- hemolysis (Hawke, 2000) คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *L. garvieae* ดังแสดงใน Table 5 พบการติดเชื้อในสัตว์น้ำหลายพื้นที่ทั่วโลกทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ทำให้เกิดความเสียหายมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลาย ๆ ชนิด โดยพบการติดเชื้อครั้งแรกในปลาเรนโบว์เทร้าท์ ที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี 1985 (Hoshina, 1985 อ้างโดย Hawke, 2000) จากนั้นพบการระบาดในฟาร์มเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่เลี้ยงในประเทศสเปน ในปี ค.ศ. 1988 (Palacios *et al*., 1993 อ้างโดย Vendrell *et al*., 2006) ปลาหางเหลือง (*Seriola quinqueradiata*) (Eldar and Ghittino, 1999) ในประเทศออสเตรเลีย สเปน และอิตาลี (Shima *et al*., 2006) โดยเฉพาะในส่วนของประเทศอิตาลีมีรายงานว่าเกิดผลกระทบรุนแรงมากในช่วงหน้าร้อนเกิดความสูญเสียถึง 50-60 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิต และนอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้ออย่างรุนแรงในปลาทะเลในประเทศกลุ่มตะวันออกไกล และแพร่กระจายในฟาร์มปลาเทร้าท์ที่อยู่ทางตอนใต้ของยุโรป (Ghittino *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังพบในปลาแบล็ก ร็อกฟิช (*Sebastes schlegeli*) (Kang *et al*., 2004) ปลากระบอกเทา (Chen *et al*., 2002) ปลานิล ปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) ปลาโอลีฟ ฟลาวน์เดอร์ (*Paralichthys olivaceous*) ปลาแอมเบอร์แจ๊ค (*Seriola dumerili*) (Vendrell *et al*., 2006) รวมทั้งกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chen *et al*., 2001) นอกจากการติดเชื้อในสัตว์น้ำแล้ว แบคทีเรียชนิดนี้ได้มีการรายงานพบผู้ป่วยที่รับประทานปลาดิบได้รับเชื้อ *L. garvieae* ในประเทศไต้หวันด้วย (Wang *et al*., 2007)

Table 5. Phenotypic characteristics of *L. garvieae* isolated from diseased fish.

Test	Chen *et al.* (2001)	Baeck *et al.* (2006)
Fish	Giant freshwater prawn	Flounder
Gram staining reaction	+	+
Cell morphology	Cocci	nr
Oxidase	-	nr
Catalase	-	-

(table cont.)

Table 5. (Continued)

Test	Chen *et al.* (2001)	Baeck *et al.* (2006)
Haemolysis	α	γ
Growth:		
- 6.5% NaCl	-	+ (6%)
- pH 9.6	+	nr
- temp 10 degree celsius	+	nr
- temp 37 degree celsius	+	nr
- temp 45 degree celsius	-	nr
Hippurate	-	-
Esculin	v	+
Arginine	v	-
Pyrrolidonyl arylamidase	v	+
Starch	-	nr
α-Galactosidase	-	-
β-Glucuronidase	-	-
β-Galactosidase	-	-
Alkaline phosphatase	-	-
Leucine aminopeptidase	v	+
Acid production from:		
- Arabinose	-	-
- Mannitol	nr	+
- Sorbitol	-	+
- Lactose	-	-
- Trehalose	-	+
- Inulin	-	v
- Raffinose	-	-
- Sucrose	nr	+
- Ribose	-	+

(table cont.)

Table 5. (Continued)

Test	Chen *et al.* (2001)	Baeck *et al.* (2006)
- AMD	nr	-
- Glycogen	-	-

nr: not reported +: positive -: negative v: variable

โรคสเตรปโตคอคโคซีสในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคมาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2529 และมีรายงานต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน โดยพบการเกิดโรคในจังหวัดปัตตานี สงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สมุทรปราการ เพชรบุรี อยุธยา กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม (จิราพร และคณะ, 2529; สถาพร และเยาวนิตย์, 2530; Suanyuk, 2009)

3. Multiplex PCR (m-PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือ DNA ในหลอดทดลอง จากปริมาณ DNA ที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548) โดยอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) deoxyanucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine, A) กัวนีน (guanine, G) ไซโตซีน (cytosine, C) ไธมีน (thymine, T) ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้น ๆ (primer) แม็กนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บัฟเฟอร์ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ในส่วนของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำ ๆ กันหลายรอบ โดยแต่ละรอบมี 3 ขั้นตอน (Figure 1) คือ

1. การแยกสาย DNA แม่แบบ (denaturation)

ใช้อุณหภูมิสูง 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ DNA คลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ DNA

2. การจับของสายไพรเมอร์ (primer annealing)

ใช้อุณหภูมิประมาณ 50-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับ DNA แม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสคู่กัน

3. การสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (primer extension)

ใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับ DNA แม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้ DNA สายใหม่

ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ในรอบต่อ ๆ ไป ซึ่งเกิดขึ้นโดยการนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของสารดังกล่าวข้างต้นเข้า “เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติ” ผลผลิต DNA ที่ได้หลังจบปฏิกิริยาจะเพิ่มเป็นทวีคูณตามจำนวนรอบ ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2^n โดย n เท่ากับจำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548)

สำหรับ m-PCR เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ซึ่งทำการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน โดย primer แต่ละคู่ที่นำมาต้องออกแบบให้ดี ไม่มี complementary กัน และเมื่อนำไปทำ PCR จะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ m-PCR ต้องปรับสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุก primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากันและเนื่องจากในปฏิกิริยานี้จะมี primer หลายคู่ (บริษัท กิบไทย จำกัด, 2003) และเมื่อใช้ primer เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการรบกวนในปฏิกิริยามากขึ้นจึงทำให้การปรับสภาวะเพื่อให้เหมาะสมที่สุดยิ่งยากไปด้วย (Forbes *et al*., 2002)

ในด้านโรคสัตว์น้ำ ได้มีการใช้เทคนิคนี้เพื่อช่วยในการตรวจสอบโรคเพื่อให้ได้ผลเร็วยิ่งขึ้น ทำให้สามารถรักษาโรคที่กำลังเกิดขึ้นในสัตว์น้ำได้ทันท่วงที ดังเช่นการพัฒนาวิธีการของ Mata และคณะ (2004) ที่ปรับปรุงวิธีการนี้เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ที่เป็นสาเหตุของโรคในปลา ได้แก่ *S. difficilis*, *S. parauberis*, *S. iniae* และ *L. garvieae* ส่วน Altinok และคณะ (2008) ได้พัฒนาวิธีการเพื่อใช้ตรวจสอบแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* และ *Yersinia ruckeri* ในปลา นอกจากการตรวจสอบแบคทีเรียแล้วในส่วนของการตรวจสอบไวรัส Khawsak และคณะ (2008) ได้พัฒนาวิธีการ Multiplex RT-PCR เพื่อตรวจสอบหาไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ Yellow head virus, White spot syndrome virus, Taura syndrome virus, Hepatopancreatic parvovirus, Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus

และ Monodon baculovirus ซึ่งวิธีการนี้สามารถช่วยให้เกษตรกรทราบผลได้อย่างรวดเร็วขึ้นและลดต้นทุนสำหรับค่าตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างมาก

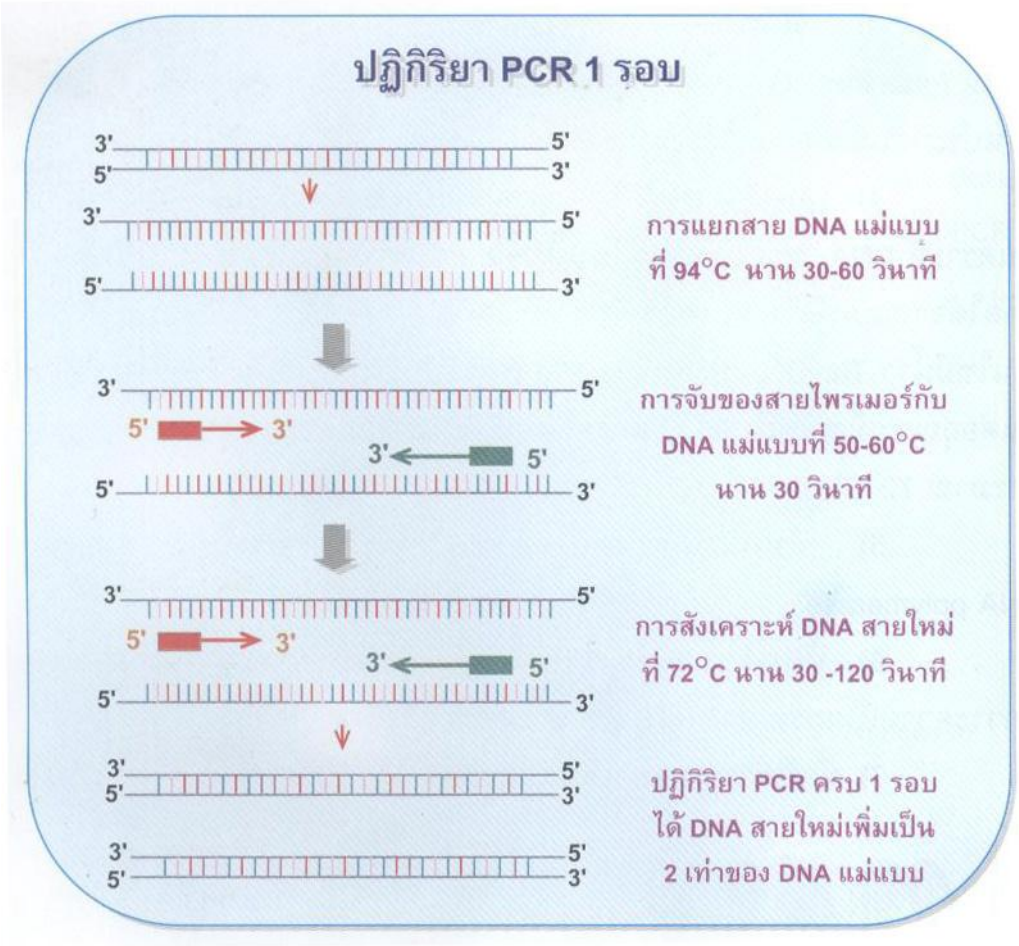

Figure 1. Step of PCR reaction

ที่มา: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2548)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลาเศรษฐกิจ โดยเฉพาะเชื้อ *S. agalactiae*, *S. iniae* และ *L. garvieae*

2. เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลาเหยื่อซึ่งอาจเป็นพาหะนำไปสู่การติดเชื้อในปลาที่เลี้ยงในกระชัง

3. พัฒนาเทคนิค m-PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อก่อโรคสเตรปโตคอคโคซีส

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างปลา

1.1.1 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1: สำรวจการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม

เก็บตัวอย่างปลานิล ปลากะพงขาว ปลากะรัง ปลาเหยื่อที่ใช้เป็นอาหารปลา รวมถึงดินและน้ำจากแหล่งเลี้ยงปลาใน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกระบี่ จังหวัดพัทลุง และจังหวัดสงขลา (Figure 2) ในช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม และพฤศจิกายนถึงธันวาคม พ.ศ. 2550 เพื่อนำมาศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างปลานิลจากอำเภอศรีบรรพต อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และตำบลปากรอ ตำบลสะทิ้งหม้อ อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา จังหวัดละ 10 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวและปลากะรังจากอำเภออ่าวลึก อำเภอเหนือคลอง และอำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ อำเภอสิงหนครและอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา จังหวัดละ 10 ตัวอย่างต่อชนิด เก็บตัวอย่างปลาเหยื่อจากแหล่งเลี้ยงปลากะพงขาว และปลากะรัง โดยรวมตัวอย่างปลาเหยื่อ 2 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง รวม 10 ตัวอย่างต่อจังหวัด และในการเก็บตัวอย่างปลานิล ปลากะพงขาว ปลากะรัง รวมถึงดินและน้ำจากแหล่งเลี้ยงทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ศึกษาได้เก็บตัวอย่างจากแหล่งเลี้ยงเดิม แต่ช่วงอายุของปลาและรอบการเลี้ยงต่างกัน

1.1.2 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2: ตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมด้วยเทคนิค m-PCR

เก็บตัวอย่างปลานิลจาก แหล่งเลี้ยงปลานิล ได้แก่ อำเภอสิชล อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอป่าพะยอม อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง (Figure 3) แหล่งเลี้ยงละ 5 ตัวอย่างในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม พ.ศ. 2553 โดยปลาแต่ละตัวจะเก็บไตและสมองเพื่อนำมาศึกษาด้วยวิธีการเพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค m-PCR โดยแบ่งแต่ละอวัยวะเพื่อตรวจสอบผลกับทั้ง 2 วิธีการ

Figure 2. Survey site during March-May 2007 and November-December 2007.

Figure 3. Survey site during April-May 2010.

1.2 สารเคมี

1.2.1สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก)

1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก)

1.2.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค m-PCR (ภาคผนวก)

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ทดสอบตัวอย่างปลา

2.1.1 อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ประกอบด้วย

1) อุปกรณ์ชุดผ่าตัดตัวอย่างปลา ได้แก่ มีดผ่าตัด, กรรไกร, กรรไกรตัดกระดูก และปากคีบ

2) อุปกรณ์ชุดแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia CNA blood agar, blood agar (BA), tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB) ลูปเขี่ยเชื้อ, spreader, phosphate buffer saline, ตะเกียงแอลกอฮอล์, 70% ethyl alcohol, micropipette และตู้บ่มเชื้อ

3) อุปกรณ์ทดสอบเชื้อทางกายภาพและชีวเคมี ได้แก่ สีย้อมแกรม, สารทดสอบคะตาเลส, ชุดทดสอบ API 20 STREP และโปรแกรม APILABPLUS

2.1.2 อุปกรณ์ตรวจสอบด้วยวิธี m-PCR ประกอบด้วย

1) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

2) หลอดพลาสติก (Microcentrifuge tube)

3) ตู้อบ (Hot air oven)

4) Autopipette ขนาด 20, 100, 200, 1,000 ไมโครลิตร

5) เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Beckman, Avanti TM 30 centrifuge)

6) เครื่อง DNA thermal cycler (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc., USA)

7) เครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส (Mupid®-exu, Japan)

8) เครื่อง UV visualizer (UV illuminator; Vilger lourmat, France)

2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1) อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter ของ Mettler Delta รุ่น 340

2) อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่, บีกเกอร์, กระบอกตวง, บิวเรต, ปิเปต, ลูกยาง และขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

3) อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์

4) อุปกรณ์วัดค่าความเค็มของน้ำ ได้แก่ Refractometer

5) อุปกรณ์วัดค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxigen) ได้แก่ ขวด BOD, ขวดรูปชมพู่, กระบอกตวง, ลูกยาง, ปิเปต

3. วิธีการศึกษา

3.1 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1: สำรวจการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก รูปกลม

3.1.1 การแยกแบคทีเรียจากปลาเศรษฐกิจ ปลาเหยื่อ ดินและน้ำที่เลี้ยงปลา

นำปลาเศรษฐกิจ และปลาเหยื่อมาผ่าท้องและสมองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อนำไตและสมองมาเพาะเชื้อแบคทีเรีย โดยชั่งน้ำหนักของชิ้นเนื้อ แล้วเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ในอัตรา 1: 10 บดให้ละเอียดก่อนนำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia CNA blood agar (BD, BBL™, France) สำหรับน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ดูดตัวอย่างน้ำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในส่วนของดินทำการตักดินบริเวณใกล้กระชังเลี้ยงปลาขึ้นและชั่งตัวอย่างดินให้ได้ประมาณ 1 กรัม แล้วทำการเจือจางด้วย PBS pH 7.4 ในอัตรา 1: 10 ผสมให้เข้ากันก่อนนำตัวอย่างดิน 100 ไมโครลิตรไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญมานับจำนวนแยกแต่ละลักษณะโคโลนี และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้วยการย้อมสีแกรม โดยเลือกแต่ละลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาย้อมสีแกรม แบคทีเรียที่ให้ผลเป็นแกรมบวก รูปกลมจะถูกคำนวณโคโลนีรวมและนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จนได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากะพงขาว และปลากะรัง ใช้อาหาร TSA ที่ผสมเกลือแกง 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสด้วยการหยด

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นว่าแบคทีเรียที่ได้เป็นกลุ่ม *Streptococcus* sp.

3.1.2 การศึกษาคุณภาพน้ำที่เลี้ยงปลา

ทำการเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำบริเวณกระชังเลี้ยงปลาในด้านอุณหภูมิของน้ำด้วยเทอร์โมมิเตอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำด้วย pH meter สำหรับความเค็มนำน้ำจากกระชังหยดลงบน salinometer แล้วอ่านค่าความเค็มที่ได้ สำหรับค่าความเป็นด่างของน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่แล้ววิเคราห์ผลด้วยวิธีที่ระบุในภาคผนวก ในส่วนของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เก็บน้ำใส่ขวด BOD ให้เต็มขวดโดยไม่ทำให้เกิดฟองจากนั้นทำการวิเคราะห์ตามวิธีการที่แสดงในภาคผนวก และเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษาจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละแหล่งเลี้ยงปลา

3.2 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2: ตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมด้วยเทคนิค m-PCR

3.2.1 การพัฒนาเทคนิค m-PCR

แบคทีเรีย ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 3 ชนิดเพื่อปรับวิธีการของเทคนิค m-PCR ได้แก่ *S. iniae* และ *L. garvieae* FK 040708 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. T. Itami; Miyazaki University, Japan) และ *S. agalactiae* DMST 17129 เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนถัดไป

การสกัดดีเอ็นเอ นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Ausubel และคณะ (1999) โดยการนำตัวอย่างมาเติม TE buffer (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA) 567 ไมโครลิตร SDS (Sodium dodecyl sulfate) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำกลับมาเติมสารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 5 โมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ CTAB/NaCl solution ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส อีก 10 นาที เติม chloroform/isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ในปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรในหลอด (ประมาณ 0.78 – 0.8 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรตัวอย่างในหลอด ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรตัวอย่างในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทหรือดูดส่วนใสในหลอดออกอย่างระวัง เติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอภายในหลอด แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง เทของเหลวในหลอดทิ้ง และตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 นาที แล้วเติม TE buffer 100 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอน เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค m-PCR

การปรับวิธีการของเทคนิค m-PCR ดัดแปลงวิธีการจากวิธีของ Mata และคณะ (2004) เพื่อให้ได้ขั้นตอนและวิธีการที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สารเคมีที่ประกอบด้วย PCR buffer (200 mM Tris-HCl (pH8.4), 500 mM KCl), dNTPs, แม็กนีเซียมคลอไรด์, ไพรเมอร์ (Table 6), เอนไซม์ *Taq* polymerase และดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่สกัดไว้ โดยในการปรับ ทดลองใช้สารแต่ละชนิดที่ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันได้แก่ dNTPs ที่ความเข้มข้น 150, 200, 250 ไมโครโมลาร์ของแต่ละเบส แม็กนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ และทดลองปรับอุณหภูมิของขั้นตอนแต่ละขั้นได้แก่ ขั้นตอน denaturation จากอุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสถึง 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing จากอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 และ 1 นาที ขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 1.5 นาที เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ตรวจสอบแบคทีเรีย 3 ชนิด เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดแล้ว

การหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ต่ำที่สุดของแบคทีเรีย นำเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาได้มาทดลองหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ต่ำที่สุดของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจสอบพบ โดยทำการปรับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิดให้เท่ากัน แล้วเจือจางปริมาณดีเอ็นเอลงครั้งละ 2 เท่าตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 4.8828125 พิโคกรัม แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาได้ และตัวอย่างที่ได้จะนำมาตรวจสอบผลด้วยวิธีเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส เพื่อแยกแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรส เจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแน่นอน (100 bp

DNA ladder) ด้วยการใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลที่ได้ย้อมด้วยเอธิทิเดียม โบรไมด์ ประมาณ 10 นาที ล้างตัวอย่างเจลด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปส่องด้วยเครื่องฉายแสงยูวีเพื่อตรวจสอบผล

Table 6. Oligonucleotide primer sets used for m-PCR assay.

Primer pair	Sequences (5'-3')	Target gene	PCR amplicon (bp)	Pathogen	Reference
F1	GAGTTTGATCATGGCTCAG	16S rRNA	220	*S. agalactiae*	Martinez *et al.* (2001)
IMOD	ACCAACATGTGTTAATTACTC				
LOX-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	*lctO*	870	*S.iniae*	Mata *et al.* (2004)
LOX-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA				
pLG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S rDNA	1,100	*L. garvieae*	Zlotkin *et al.* (1998)
pLG-2	GCACCCTCGCGGGTTG				

3.2.2 การแยกแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมจากปลานิล

เก็บตัวอย่างปลานิลจากแต่ละแหล่งมาผ่าท้องและสมองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อนำไตและสมองมาเพาะเชื้อแบคทีเรีย โดยชั่งน้ำหนักของชิ้นเนื้อ แล้วเจือจางด้วย PBS pH 7.4 ในอัตรา 1: 10 บดให้ละเอียดก่อนนำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia CNA blood agar (BD, BBL™, France) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญมานับจำนวนแยกแต่ละลักษณะโคโลนี และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้วยการย้อมสีแกรม โดยเลือกแต่ละลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาย้อมสีแกรม แบคทีเรียที่ให้ผลเป็นแกรมบวก รูปกลมจะถูกคำนวณโคโลนีรวมและนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จนได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ ทำการเก็บรักษาตัวอย่างแบคทีเรียที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ผสมกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำขั้นตอนถัดไป

3.2.3 การจำแนกแบคทีเรียจากตัวอย่าง

นำแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ที่แยกได้จากข้อ 3.2.1 มาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสด้วยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นว่าแบคทีเรียที่ได้เป็นกลุ่ม *Streptococcus* sp. ทดสอบการย่อยสลายเม็ด

เลือดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Columbia CNA blood agar รวมถึงทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 STREP และจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้โปรแกรม API LABPLUS รวมทั้งใช้คู่มือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Schleifer, 1986) เพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4 การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมด้วยเทคนิค m-PCR

การตรวจสอบจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตัวอย่างไตและสมองจากปลานิลแต่ละตัวอย่างถูกเก็บด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ลงในหลอดพลาสติกที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ แล้วเก็บในน้ำแข็ง เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการข้างต้นและตรวจสอบผลด้วยเทคนิค m-PCR ที่พัฒนาวิธีการไว้ บันทึกผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ปรากฏจากแบน หากมีแบคทีเรียที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้จะปรากฏแบนออกมาตรงกับแถวที่เป็น positive ของเชื้อแต่ละชนิด

การตรวจสอบจากตัวอย่างแบคทีเรีย นำแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่แยกได้จากปลาในหัวข้อ 3.2.2 มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการเดียวกัน และตรวจสอบผลอีกครั้งด้วยเทคนิค m-PCR เพื่อตรวจสอบผลเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.2.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกด้วยเทคนิค m-PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค m-PCR แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจล QIAquick gel extraction kit โดยเติมสาร buffer QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักตัวอย่างเจล แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเขย่าหลอดตัวอย่างทุก ๆ 2-3 นาทีเพื่อให้เจลละลายหมด จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักตัวอย่างเจลแล้วผสมให้เข้ากัน นำสารในหลอดใส่ใน QIAquick spin column แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์นาน 1 นาที ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จะติดอยู่ในตัวกรองภายใน QIAquick column เทส่วนใสที่ได้ทิ้ง จากนั้นเติม buffer QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงใน QIAquick column แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์นาน 1 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอในคอลัมน์ด้วย buffer PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร วางตัวอย่างทิ้งไว้ 2-5 นาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วนำ QIAquick column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่ แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ติดในตัวกรองภายใน QIAquick column ด้วย buffer EB ปริมาตรประมาณ 50 ไมโครลิตรแล้วเซนตริฟิวจ์นาน 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้วิเคราะห์หาลำดับเบสโดยวิธี single-nucleotide polymorphism assay ด้วยเครื่อง Mega BACE DNA Analysis system ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมา

เปรียบเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูลใน Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อดูความเหมือนของลำดับเบสจากแบคทีเรียชนิดนั้น เพื่อให้แน่ชัดว่าแบคทีเรียที่ตรวจสอบพบนั้นเป็นชนิดเดียวกับในฐานข้อมูลหลัก

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1: สำรวจการแพร่กระจายของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม

การเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างปลา ปลาเหยื่อ ดิน และน้ำ รวมถึงการวัดคุณภาพน้ำบริเวณที่เลี้ยงจาก 3 จังหวัด ประกอบด้วยพื้นที่ ตำบลปากรอ และตำบลสะทิ้งหม้อ อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา อำเภอบางแก้ว และอำเภอศรีบรรพต จังหวัดพัทลุง เป็นพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างปลานิล ส่วนปลากะพงขาวและปลากะรังทำการเก็บตัวอย่างจาก อำเภอสิงหนคร และอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา อำเภออ่าวลึก อำเภอเหนือคลองและอำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ปรากฏผลดังต่อไปนี้

3.1.1. สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง พฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลา

ปลานิลที่ศึกษาเป็นตัวอย่างจากอำเภอบางแก้ว อำเภอศรีบรรพต จังหวัดพัทลุง และตำบลปากรอ ตำบลสะทิ้งหม้อ อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา น้ำหนักปลาตัวอย่างประมาณ 150-600 กรัมต่อตัว (Table 7) เลี้ยงในกระชัง โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นอาหาร ลักษณะของปลาที่นำมาศึกษาไม่พบสิ่งผิดปกติที่บ่งชี้ถึงการป่วยของปลา

ปลากะพงขาวและปลากะรังที่ศึกษาเป็นตัวอย่างจากอำเภอสิงหนคร และตำบลนาทับ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา อำเภออ่าวลึก อำเภอเหนือคลอง และอำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ น้ำหนักปลากะพงขาวประมาณ 200-600 กรัมต่อตัว น้ำหนักปลากะรังประมาณ 200-900 กรัมต่อตัว (Table 7) ลักษณะการเลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรังในพื้นที่เก็บตัวอย่างจังหวัดสงขลาเป็นการเลี้ยงในกระชังบริเวณชายฝั่งทะเล ระดับความลึกของน้ำไม่เกิน 3 เมตร อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นปลาเหยื่อสับ ส่วนการเลี้ยงในเขตพื้นที่เก็บตัวอย่างจังหวัดกระบี่ เป็นการเลี้ยงปลาในกระชังที่มีความลึกมากกว่า 3 เมตร ในเขตอำเภออ่าวลึกเป็นกระชังที่ลอยอยู่กลางทะเลห่างจากชายฝั่งประมาณ 1-2 กิโลเมตร (Figure 4-5) ตัวอย่างปลาที่ศึกษาไม่มีสิ่งผิดปกติที่บ่งชี้ถึงการป่วยของปลา

Table 7. Fish sampling sites and body weight of fish in 2007.

Date	Area	Fish	Weight (g)	Culture system
Mar 07/ Dec 07	Bangkaew, Phatthalung	Nile Tilapia	370.00±127.19	Cage in earthen pond
	Sri Banpot, Phatthalung	Nile Tilapia	457.00±51.22	Cage in reservoir
Apr 07/ Dec 07	Singha Nakhon, Songkhla[1]	Red Tilapia	395.00±78.63	Cage in canal
	Singha Nakhon, Songkhla[2]	Nile Tilapia	234.00±40.40	Cage in gulf of Thailand
Apr 07/Dec 07	Chana , Songkhla	Asian sea bass	480.00±58.12	Cage in gulf of Thailand
		Grouper	653.00±140.26	Cage in gulf of Thailand
	Singha Nakhon, Songkhla	Asian sea bass	371.50±105.07	Cage in gulf of Thailand
		Grouper	790.50±66.18	Cage in gulf of Thailand
May 07/ Nov 07	Ao Luk, Krabi	Asian sea bass	389.38±41.78	Cage in Andaman sea
		Grouper	291.88±52.98	Cage in Andaman sea
	Muang, Krabi	Asian sea bass	492.50±22.30	Cage in Andaman sea
		Grouper	544.17±261.08	Cage in Andaman sea
	Nue Klong, Krabi	Asian sea bass	433.33±106.52	Cage in Andaman sea
		Grouper	645.00±99.55	Cage in Andaman sea

[1]Tumbon Pak Ro; [2]Tumbon Sating Mo

Figure 4. Sea bass and grouper cage culture at Ao Luek, Krabi province.

Figure 5. Sea bass and grouper cage culture at Nue Klong, Krabi province.

3.1.2. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม

3.1.2.1. การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลานิล

การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ด้วยวิธีเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างปลานิลที่เลี้ยงในจังหวัดพัทลุงและจังหวัดสงขลา ในช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม พบแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นแกรมบวก รูปกลมจากไต ปลานิลจำนวน 1 ตัว จากตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวที่ศึกษา ที่เลี้ยงในอำเภอบางแก้วจังหวัดพัทลุง ส่วนอำเภอศรีบรรพต จังหวัดพัทลุง ตำบลปากรอ และตำบลสะทิ้งหม้อ อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลาไม่พบตัวอย่างปลาที่มีแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม สำหรับช่วงเดือนธันวาคมในปีเดียวกัน ตรวจพบปลาที่มีแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม 3 แหล่งเลี้ยงดังนี้ ปลาในอำเภอบางแก้วตรวจพบ 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 5 ตัวที่ศึกษา ซึ่งตรวจพบในสมอง ในอำเภอศรีบรรพต ตรวจพบ 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด5 ตัวที่ศึกษา ซึ่งเป็นตัวอย่างจากไตปลา 1 ตัวอย่างและจากสมองปลา 1 ตัวอย่าง ส่วนในจังหวัดสงขลา สามารถตรวจสอบพบจากไตของปลาที่เลี้ยงในตำบลปากรอเป็นจำนวน 2 ตัวอย่างจากปลาทั้งหมด 5 ตัวที่ศึกษา ดังแสดงใน Table 8

การตรวจหาแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในน้ำและดินในบริเวณแหล่งเลี้ยงปลานิลพบแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำที่เลี้ยงปลานิลในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุงในช่วงเดือนมีนาคม ส่วนแหล่งเลี้ยงอื่น ๆ ไม่พบแบคทีเรียในน้ำและดิน ดังแสดงใน Table 9

Table 8. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured tilapia.

Date	Area	No. positive (Total fish)	Average total count (CFU/g)	
			Kidney	Brain
Mar 07	Bangkaew, Phatthalung	1(5)	213	0
	Sri Banpot, Phatthalung	0(5)	0	0
Apr 07	Singha Nakhon, Songkhla[1]	0(5)	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla[2]	0(5)	0	0
Dec 07	Bangkaew, Phatthalung	1(5)	0	194
	Sri Banpot, Phatthalung	2(5)	95*	1442*
Dec 07	Singha Nakhon, Songkhla[1]	2(5)	335±297	0
	Singha Nakhon, Songkhla[2]	0(5)	0	0

[1]Tumbon Pak Ro; [2]Tumbon Sating Mo; *n = 1

Table 9. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in water and soil in tilapia culture site.

Date	Area	Average total count	
		Water (CFU/ml)	Soil (CFU/g)
Mar 07	Bangkaew, Phatthalung	400	0
	Sri Banpot, Phatthalung	0	0
Apr 07	Singha Nakhon, Songkhla[1]	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla[2]	0	0
Dec 07	Bangkaew, Phatthalung	0	0
	Sri Banpot, Phatthalung	0	0
Dec 07	Singha Nakhon, Songkhla[1]	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla[2]	0	0

[1]Tumbon Pak Ro; [2]Tumbon Sating Mo

3.1.2.2. การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ในปลากะพงขาว

การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลาและจังหวัดกระบี่ ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวทั้งในไตและสมองของปลากะพงขาวที่เลี้ยงในทั้งสองจังหวัด (Table 10) เช่นเดียวกับการตรวจหาแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในน้ำและดินจากแหล่งเลี้ยงกะพงขาวที่ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวดังแสดงใน Table 11

Table 10. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured Asian sea bass.

Date	Area	No. positive (Total fish)	Average total count (CFU/g)	
			Kidney	Brain
Apr 07	Chana, Songkhla	0(5)	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0(5)	0	0
May 07	Ao Luk, Krabi	0(4)	0	0
	Muang, Krabi	0(2)	0	0
	Nue Klong, Krabi	0(4)	0	0
Nov 07	Ao Luk, Krabi	0(4)	0	0
	Muang, Krabi	0(3)	0	0
	Nue Klong, Krabi	0(3)	0	0
Dec 07	Chana, Songkhla	0(5)	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0(5)	0	0

Table 11. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in water and soil in Asian sea bass culture site.

Date	Area	Average total count	
		Water (CFU/ml)	Soil (CFU/g)
Apr 07	Chana, Songkhla	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0	0
May 07	Ao Luk, Krabi	0	0
	Muang, Krabi	0	0
	Nue Klong, Krabi	0	0
Nov 07	Ao Luk, Krabi	0	0
	Muang, Krabi	0	0
	Nue Klong, Krabi	0	0
Dec 07	Chana, Songkhla	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0	0

3.1.2.3. การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ในปลากะรัง

การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลากะรังที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลาและจังหวัดกระบี่ ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวทั้งในไตและสมองของปลากะรังที่เลี้ยงจากทั้งสองจังหวัด (Table 12) เช่นเดียวกับการตรวจหาแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมในน้ำและดินในบริเวณแหล่งเลี้ยงปลากะรังที่ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวเช่นกัน ดังแสดงใน Table 13

Table 12. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured grouper.

Date	Area	No. positive (Total fish)	Average total count (CFU/g)	
			Kidney	Brain
Apr 07	Chana, Songkhla	0(5)	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0(5)	0	0
May 07	Ao Luk, Krabi	0(4)	0	0
	Muang, Krabi	0(3)	0	0
	Nue Klong, Krabi	0(3)	0	0
Nov 07	Ao Luk, Krabi	0(5)	0	0
	Muang, Krabi	0(2)	0	0
	Nue Klong, Krabi	0(3)	0	0
Dec 07	Singha Nakhon, Songkhla	0(5)	0	0
	Chana, Songkhla	0(5)	0	0

Table 13. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in water and soil in grouper culture site.

Date	Area	Average total count	
		Water (CFU/ml)	Soil (CFU/g)
Apr 07	Chana, Songkhla	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0	0
May 07	Ao Luk, Krabi	0	0
	Muang, Krabi	0	0
	Nue Klong, Krabi	0	0
Nov 07	Ao Luk, Krabi	0	0
	Muang, Krabi	0	0
	Nue Klong, Krabi	0	0
Dec 07	Chana, Songkhla	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0	0

3.1.2.4. การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ในปลาเหยื่อ

ตัวอย่างปลาเหยื่อที่นำมาตรวจสอบเป็นปลาที่มีขนาดเล็กที่ติดอวนขึ้นมา แต่ชาวประมงไม่สามารถวางขายได้ จึงนิยมนำมาทำเป็นปลาเหยื่อสำหรับเลี้ยงปลา ปลาส่วนใหญ่ได้แก่ ปลาหลังเขียว ปลากะปาย ปลาโคก ในการเก็บตัวอย่างปลาเหยื่อจึงรวมปลา 2 ตัวเป็น 1 ตัวอย่าง จากการตรวจสอบพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในปลาเหยื่อจำนวน 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จากอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา และทั้ง 2 ตัวอย่างพบแบคทีเรียในส่วนของไต (Table 14)

Table 14. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in trash fish.

Date	Area	No. positive (Total fish)	Average total count (CFU/g)	
			Kidney	Brain
Apr 07	Chana, Songkhla	0(10)	0	0
	Singha Nakhon, Songkhla	0(10)	0	0
May 07	Ao Luk, Krabi	0(8)	0	0
	Muang, Krabi	0(12)	0	0
Dec 07	Singha Nakhon, Songkhla[1]	2*(10)	122	0
	Singha Nakhon, Songkhla[2]	0(10)	0	0
Nov 07	Ao Luk, Krabi	0(10)	0	0
	Muang, Krabi	0(10)	0	0

[1]Tumbon Pak Ro; [2]Tumbon Sating Mo; * pooled sample: 2 fishes/sample

3.1.3. การศึกษาคุณภาพน้ำ

3.1.3.1. คุณภาพน้ำจากแหล่งเลี้ยงปลานิล

การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งเลี้ยงปลานิลเพื่อศึกษาคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยง พบว่าจังหวัดพัทลุงช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคมที่เก็บตัวอย่างอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 32.50 – 33.50 องศาเซลเซียส เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 32.97 ± 0.51 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่อำเภอบางแก้ว 32.50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้อยู่ที่อำเภอศรีบรรพต 33.50 องศาเซลเซียส ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 30.00 – 31.00 องศาเซลเซียส เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 30.50 ± 0.00 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่อำเภอศรีบรรพต 30.00 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้อยู่ที่อำเภอบางแก้ว 31.00 องศาเซลเซียส และปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคมอยู่ในช่วง 5.56 – 5.98 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉลี่ยอยู่ที่ 5.77 ± 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่บริเวณกระชังปลาที่อำเภอบางแก้วปริมาณ 5.56 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสูงสุดที่วัดได้ที่อำเภอศรีบรรพตปริมาณ 5.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำอยู่ในช่วง 5.20 - 6.48 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉลี่ยอยู่ที่ 5.76 ± 0.57 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่บริเวณกระชังปลาที่อำเภอศรีบรรพตปริมาณ 5.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสูงสุดที่วัดได้ที่อำเภอบางแก้วปริมาณ 6.48 มิลลิกรัมต่อลิตร

จังหวัดสงขลาช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคมเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคมอุณหภูมิของน้ำที่วัดได้เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 30.50 ± 0.00 องศาเซลเซียส ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 26.00 ± 0.00 องศาเซลเซียส และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคมอยู่ในช่วง 5.00 – 6.60 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉลี่ยอยู่ที่ 5.87 ± 0.77 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่บริเวณกระชังปลาที่อำเภอสิงหนครปริมาณ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสูงสุดที่วัดได้ที่ตำบลนาทับ อำเภอเมืองปริมาณ 6.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำอยู่ในช่วง 5.50 – 6.80 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 6.18 ± 0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้อยู่ที่บริเวณกระชังปลาที่อำเภอสิงหนครปริมาณ 5.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณสูงสุดที่วัดได้ที่ตำบลนาทับ อำเภอเมืองปริมาณ 6.80 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีคุณภาพน้ำค่าอื่น ๆ ได้แก่ ความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) รวมถึงความเค็มของน้ำ (Salinity) ดังแสดงใน Table 15

3.1.3.2. **คุณภาพน้ำจากแหล่งเลี้ยงปลากะพงขาว และปลากะรัง**

คุณภาพน้ำบริเวณกระชังที่เลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรังในบริเวณจังหวัดสงขลา พบว่า ช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม อุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 30.50 ± 0.00 องศาเซลเซียส ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 27.50 ± 0.55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่วัดได้ที่ตำบลนาทับ อำเภอจะนะ 27.00 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้ที่อำเภอสิงหนคร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม เฉลี่ยอยู่ที่ 5.97 ± 0.88 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวัดได้ค่าต่ำสุดที่อำเภอสิงหนครปริมาณ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดได้ค่าสูงสุดที่ตำบลนาทับ อำเภอจะนะ ปริมาณ 6.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมเฉลี่ยอยู่ที่ 5.48 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดได้ค่าต่ำสุดปริมาณ 5.10 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณกระชังเลี้ยงปลากะพงขาวและปลากะรังที่อำเภอสิงหนคร และค่าสูงสุดปริมาณ 5.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่บริเวณตำบลนาทับ อำเภอจะนะ

สำหรับคุณภาพน้ำบริเวณกระชังเลี้ยงปลากะพงขาว และปลากะรังในจังหวัดกระบี่พบว่า ช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม อุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 30.67 ± 0.26 องศาเซลเซียส วัดได้ค่าต่ำสุดที่ตำบลคลองประสงค์ อำเภอเมือง และตำบลตลิ่งชัน อำเภอเหนือคลอง อุณหภูมิ 30.50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่บริเวณบ้านแหลมสัก อำเภออ่าวลึก

อุณหภูมิ 31.00 องศาเซลเซียส ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 28.17 ± 0.25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่วัดได้ที่บ้านแหลมสัก อำเภออ่าวลึก และตำบลคลองประสงค์ อำเภอเมือง อุณหภูมิ 28.00 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้ที่ตำบลตลิ่งชัน อำเภอเหนือคลอง อุณหภูมิ 28.50 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม เฉลี่ยอยู่ที่ 5.87 ± 0.56 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวัดได้ค่าต่ำสุดที่ตำบลตลิ่งชัน อำเภอเหนือคลอง ปริมาณ 5.30 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดได้ค่าสูงสุดที่ตำบลคลองประสงค์ อำเภอเมือง ปริมาณ 7.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำช่วง เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคมเฉลี่ยอยู่ที่ 4.63 ± 0.61 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดได้ค่าต่ำสุดปริมาณ 4.00 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณกระชังเลี้ยงปลาที่ตำบลคลองประสงค์ อำเภอเมือง และค่าสูงสุดปริมาณ 6.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่บริเวณบ้านแหลมสัก อำเภออ่าวลึก สำหรับค่าความเป็นด่างทั้งหมด ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มของน้ำที่วัดค่าจากแหล่งเลี้ยงปลากะพงขาว และปลากะรัง ดังแสดงใน Table 16

Table 15. Water quality during collection of tilapia samples in 2007.

Area	Alkalinity (mg/L)		pH		Salinity (ppt)	
	Mar-May	Nov-Dec	Mar-May	Nov-Dec	Mar-May	Nov-Dec
Phatthalung						
Bangkaew	14.97 ± 0.06	10.00 ± 2.00	6.79 ± 0.00	7.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Sri Banpot	45.33 ± 0.58	26.33 ± 0.58	8.25 ± 0.00	6.67 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Songkhla						
Pak Ro, Singha Nakhon	96.33 ± 0.58	30.67 ± 0.58	7.48 ± 0.00	7.06 ± 0.01	8.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
Sating Mo, Singha Nakhon	96.67 ± 0.58	85.33 ± 2.52	7.62 ± 0.00	7.22 ± 0.00	26.00 ± 0.00	22.00 ± 0.00

Mean ± standard deviation of three replications

Table 16. Water quality during collection of Asian sea bass and grouper samples in 2007.

Area	Alkalinity (mg/L)		pH		Salinity (ppt)	
	Mar-May	Nov-Dec	Mar-May	Nov-Dec	Mar-May	Nov-Dec
Songkhla						
Chana	98.33 ± 0.58	87.33 ± 2.08	7.50 ± 0.00	7.06 ± 0.00	31.00 ± 0.00	27.00 ± 0.00
Singha Nakhon	96.67 ± 0.58	103.67 ± 1.53	7.62 ± 0.00	7.82 ± 0.00	26.00 ± 0.00	24.00 ± 0.00
Krabi						
Ao Luk	105.67 ± 0.58	109.67 ± 2.08	7.62 ± 0.00	7.96 ± 0.00	30.00 ± 0.00	30.00 ± 0.00
Muang	107.67 ± 1.53	107.67 ± 1.53	7.04 ± 0.00	7.23 ± 0.00	24.00 ± 0.00	24.00 ± 0.00
Nue Klong	106.00 ± 2.00	108.00 ± 2.00	7.44 ± 0.00	7.58 ± 0.00	30.00 ± 0.00	32.00 ± 0.00

Mean ± standard deviation of three replications

3.2 เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2: ตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมด้วยเทคนิค m-PCR

การเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างปลานิล จาก 4 แหล่งเลี้ยง ได้แก่ อำเภอป่าพะยอม และอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง อำเภอสิชล และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช และนำมาตรวจสอบผลด้วยการเพาะเชื้อบนอาหารลี้ยงเชื้อและใช้เทคนิค m-PCR เพื่อตรวจสอบผล ซึ่งผลการตรวจสอบแสดงดังต่อไปนี้

3.2.1. สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง พฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลา

การเก็บตัวอย่างปลานิลครั้งนี้พบปลานิลป่วยจำนวนมากในบ่อที่เลี้ยงในอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ลักษณะภายนอกของปลามีอาการตาโปนและขุ่น ตกเลือดในตา ลักษณะอาการภายใน มีน้ำขังในช่องท้องและเกิดการตาย การเลี้ยงเป็นแบบเลี้ยงในบ่อดินจำนวน 3 บ่อโดยที่บ่อดังกล่าวเคยผ่านการเลี้ยงกุ้งมาก่อน แล้วจึงปรับเปลี่ยนเป็นการเลี้ยงปลานิล ในความหนาแน่นปานกลาง การสอบถามข้อมูลเบื้องต้นพบว่าปลาเริ่มกินอาหารน้อยลงมาเกือบ 1 เดือน หลังจากนั้นมีการลอยขึ้นมาผิวน้ำ และเริ่มทยอยตายไปทีละน้อยจนเกินครึ่งหนึ่งของบ่อ อีกสองบ่อพบการตายบ้างเล็กน้อย (Figure 6-8)

Figure 6. Tilapia earthen pond in Hua Sai, Nakhon Si Thammarat province.

Figure 7. Mass mortalities of tilapia cultured in earthen pond in Hua Sai, Nakhon Si Thammarat province during the outbreaks of streptococcosis.

Figure 8. Gross photograph of dead tilapia scooping up from the earthen pond.

ตัวอย่างในอำเภอสิชลไม่พบความผิดปกติของปลาทุกตัว สำหรับจังหวัดพัทลุง ปลานิลที่เก็บจากอำเภอป่าพะยอม มีอาการภายนอกตกเลือดบริเวณท้อง ลำตัวและปาก ลักษณะอาการภายในมีถุงน้ำดีบวม ตับซีด ม้ามมีสีเข้ม ในส่วนของอำเภอบางแก้วพบว่าปลานิลที่ศึกษามี

อาการว่ายน้ำนิ่งที่ผิวน้ำ มีการตายเล็กน้อย กินอาหารน้อยและไม่พบลักษณะผิดปกติภายนอกตัวปลา สำหรับตัวอย่างปลานิลในครั้งนี้มีขนาดประมาณ 300-1,000 กรัมต่อตัว (Table 17)

3.2.2. การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ในปลานิล

การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลาที่เก็บครั้งที่ 2 จากจังหวัดพัทลุงและจังหวัดนครศรีธรรมราช พบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในไต และสมองของปลานิลจาก อำเภอป่าพะยอม อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง อำเภอสิชลและอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช (Table 18) ทดสอบเบื้องต้นพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่ทดสอบคะตาเลสเป็นผลลบ เมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวไปจำแนกชนิดโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี รวมทั้งใช้ชุดทดสอบ API 20 STREP สามารถจำแนกได้เป็น *S. agalactiae*, *S. equinus* และ *S. dysgalactiae* (Table 19) โดยพบแบคทีเรีย *S. agalactiae* แยกได้จากตัวอย่างปลานิลจากอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช และอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแต่ละแหล่ง พบว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่พบในปลานิลจากอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ไม่มีการสร้างเอนไซม์ฮิบพูเรท ไฮโรเลส คะตาเลส ไพโรลิโดนิล เอริลอะมิเดส และเบต้า-กาแลกโตซิเดส สำหรับการผลิตกรดจากน้ำตาล พบว่าสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลไรโบส ทรีฮาโลส ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาล อะราบิโนส แมนนิทอล แลกโตส อินนูลิน และราฟฟิโนส ส่วนแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่พบในปลานิลจากอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุงไม่มีการสร้างเอนไซม์ฮิบพูเรท ไฮโรเลส คะตาเลส และเบต้า-กาแลกโตซิเดส สำหรับการผลิตกรดจากน้ำตาล พบว่าสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลไรโบส ทรีฮาโลส ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาล อะราบิโนส แมนนิทอล แลกโตส อินนูลิน และราฟฟิโนส สำหรับแบคทีเรีย *S. equinus* แยกได้จากปลานิลจากอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช และ *S. dysgalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลจากอำเภอป่าพะยอม แสดงผลคุณสมบัติทางชีวเคมีดัง Table 19

Table 17. Fish sampling sites and body weight of fish in 2010.

Date	Area	Fish	Weight (g)	Culture system
Apr 10	Paphayom, Phatthalung	Red Tilapia	620.00±327.11	Earthen pond
Apr 10	Sichon, Nakhon Si Thammarat	Nile Tilapia	324.00±25.10	Earthen pond
Apr 10	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	Nile Tilapia	430.00±83.67	Earthen pond
May 10	Bangkeaw, Phatthalung	Nile Tilapia	412.00±52.13	Cage in earthen pond

Table 18. Occurrence of Gram-positive cocci bacteria in cultured tilapia (Apr-May 2010).

Area	No. positive (Total fish)	Average total count (CFU/g)	
		Kidney	Brain
Paphayom, Phatthalung	3(5)	1,853 ± 402	2391
Bangkeaw, Phatthalung	5(5)	14,050 ± 22,745	12,019 ± 17,039
Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	5(5)	27,587 ± 45,458	15,125 ± 10,765
Sichon, Nakhon Si Thammarat	2(5)	3,922 ± 5,059	0

Table 19. Biochemical characteristics of Gram-positive cocci bacteria isolated from fish.

Test	Sichon (n=3)	Hua Sai (n=3)	Bangkeaw (n=3)	Paphayom (n=3)
Gram staining reaction	+	+	+	+
Cell morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Catalase	-	-	-	-
Haemolysis	γ	β	β	γ
VP test	+	+	+	-
Hippurate	-	-	-	-
Esculin	+	-	-	-
Pyrrolidonyl arylamidase	-	-	+	+
α-galactosidase	-	+	+	-
β-glucuronidase	-	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Leucine aminopeptidase	+	+	+	+
Arginine	-	+	+	+
D-ribose	-	+	+	+

(table cont.)

Table 19. (Continued)

Test	Sichon (n=3)	Hua Sai (n=3)	Bangkeaw (n=3)	Paphayom (n=3)
L-arabinose	-	-	-	-
D-mannitol	+	-	-	-
D-lactose	-	-	-	-
D-trehalose	-	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
D-raffinose	-	-	-	-
Starch	+	-	-	+
Glycogen	+	-	-	+
Species	*S. equinus*	*S. agalactiae*	*S. agalactiae*	*S. dysgalactiae*
(% identity by API 20 STREP)	(99.2)	(99.8)	(95.9)	(96.5)

3.2.3 การปรับสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค m-PCR สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย

การทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค m-PCR เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ทดลองหาความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาซึ่งสามารถปรับสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคนี้ได้โดยในส่วนของสารเคมีที่ใช้และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาแสดงดัง Table 20, 21 และ Figure 9

ในการทดลองหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ต่ำสุดของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่เทคนิคที่ได้นี้สามารถตรวจสอบพบพร้อมกันได้ที่ 39.0625 พิโคกรัม โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ต่ำสุดของแต่ละแบคทีเรียได้ต่างกันคือ แบคทีเรีย *S. iniae* สามารถตรวจสอบพบเมื่อใช้ดีเอนเอเริ่มต้นปริมาณต่ำสุดที่ 39.0625 พิโคกรัม แบคทีเรีย *L. garvieae* สามารถตรวจสอบพบเมื่อใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณต่ำสุดที่ 19.53125 พิโคกรัม และแบคทีเรีย *S. agalactiae* สามารถตรวจสอบพบเมื่อใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณต่ำสุดที่ 9.765625 พิโคกรัม (Figure 10)

Table 20. Optimization of final concentration of m-PCR mixture for detection of *S. agalactiae, S. iniae* and *L. garvieae* using 3 sets of oligonucleotide primers, F1/IMOD, LOX-1/LOX-2 and pLG-1/pLG-2.

Mixture	Final concentration
PCR buffer	1 x
$MgCl_2$	2.0 mM
dNTPs	0.2 mM each
Taq DNA polymerase	1.25 U
Primer F1/IMOD	0.2 µM each
Primer LOX1/LOX2	0.2 µM each
Primer pLG1/pLG2	0.4 µM each

Table 21. Condition of m-PCR reaction.

Step	Temperature (°C)	Time (min)	cycle
predenaturation	94	4	1
denaturation	94	1	35
annealing	58	1	35
extension	72	2	35
Post extension	72	10	1

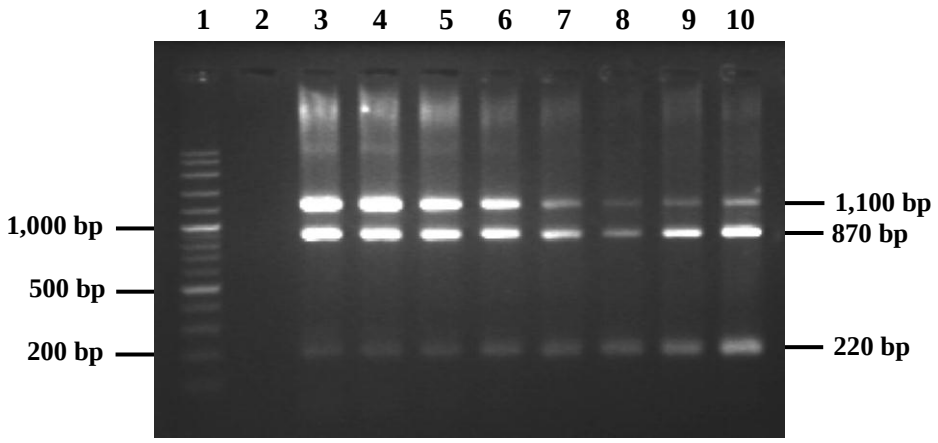

Figure 9. Agarose gel showing 1,100, 870 and 220 bp m-PCR amplification products generated with different annealing temperature using 3 sets of oligonucleotide primers pLG-1/pLG-2, LOX-1/LOX-2 and F1/IMOD, capable of detecting specific sequence of 16S rDNA of *L. garvieae*, *lctO* of *S. iniae* and 16S rRNA of *S. agalactiae*, respectively. Lane 1, 100 bp DNA ladder; Lane 2, negative control (DDW); Lane 3-10, m-PCR products generated with different annealing temperature of 59.0, 58.8, 58.4, 57.9, 57.2, 56.7, 56.2 and 56.0 degree celsius, respectively.

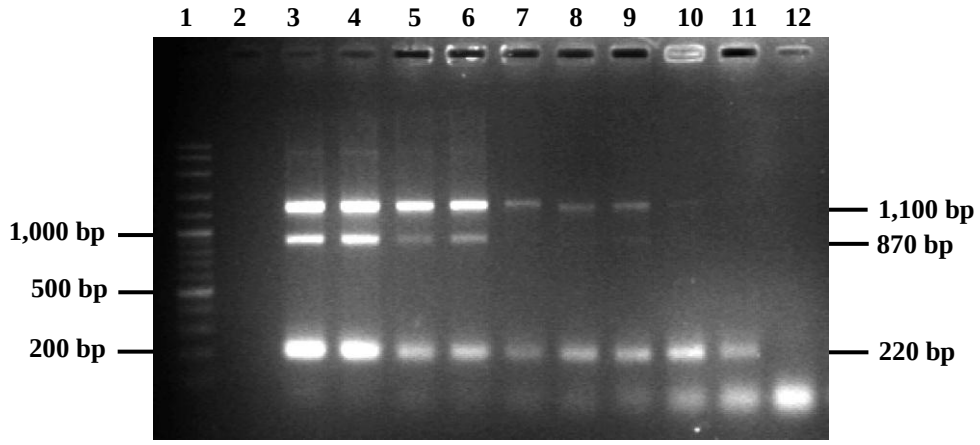

Figure 10. Minimum DNA concentration for detection of *L. garvieae*, *S. iniae* and *S. agalactiae* by m-PCR using 3 sets of oligonucleotide primers pLG-1/pLG-2, LOX-1/LOX-2 and F1/IMOD, capable of detecting specific sequence of 16S rDNA of *L. garvieae*, *lctO* of *S. iniae* and 16S rRNA of *S. agalactiae*, respectively. Lane 1, 100 bp DNA ladder; Lane 2, negative control (DDW); Lane 3-10, m-PCR products generated with DNA concentration of 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098 and 0.049 ng, respectively.

เมื่อปรับสภาวะของวิธีการสำเร็จ ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 3 ชนิดที่นำมาเป็น positive control ด้วยการทำ m-PCR แล้วสกัดดีเอ็นเอจาก m-PCR product เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Genbank พบว่าแบคทีเรีย *L. garvieae* มีลำดับเบสดังแสดงใน Figure 11

```
CATAACAATG AGAATCGC.. .......... .......... ....TGCTTC ACTACTTGAT GATCCCGCGT TGTATTAGCT 80
AGTTGGTAGT GTAAAGGACT ACCAAGGCGA TGATACATAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA 160
CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAATCTTC GGCAATGGGG GCAACCCTGA CCGAGCAACG CCGCGTGAGT 240
GAAGAAGGTT TTCGGATCGT AAAACTCTGT TGTTAGAGAA GAACGTTAAG TAGAGTGGAA AATTACTTAA GTGACGGTAT 320
CTAACCAGAA AGGGACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTCCCAAG CGTTGTCCGG ATTTATTGGG 400
CGTAAAGCGA GCGCAGGTGG TTTCTTAAGT CTGATGTAAA AGGCAGTGGC TCAACCATTG TGTGCATTGG AAACTGGGAG 480
ACTTGAGTGC AGGAGAGGAG AGTGGAATTC CATGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGATATAT GGAGGAACAC CGGAGGCGAA 560
AGCGGCTCTC TGGCCTGTAA CTGACACTGA GGCTCGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG 640
CCGTAAACGA TGAGTGCTAG CTGTAGGGAG CTATAAGTTC TCTGTAGCGC AGCTAACGCA TTAAGCACTC CGCCTGGGGA 720
GTACGACCGC AAGGTTGAAA CTCAAAGGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA 800
CGCGAAGAAC CTTACCAGGT CTTGACATAC TCGTGCTATC CTTAGAGATA AGGAGTTCCT TCGGGACACG GGATACAGGT 880
GGTGCATGGT TGTCGTCAGC TCGTGTCGTG AGATGTTGGG TTAAGTCCCG CACGAGCGCA CCCTTATACT AGTGCATCAT 960
AGTGGGCACT CTAGTGAGAC TGC....... .......... .......... .......... .......... .......... 1040
.......... .......... .......... .......... ....CAACCC GCGAGGGTGC                    1100
```

Figure 11. Patial DNA sequences of *L. garvieae* from m-PCR product. The shaded letters indicate the primers used for sequencing.

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank ปรากฏความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบางส่วนของแบคทีเรีย *L. garvieae* ในฐานข้อมูล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่แยกได้จากปลากระบอกเทา (grey mullet) ในประเทศไต้หวัน (Chen *et al*., 2002) (Accession number AF352163-AF352166)

ส่วนแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่นำมาเป็น positive control ของการทำ m-PCR เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส ได้ผลดัง Figure 12

```
GAGTTTGATC ATGGCTCAG. ..........  .........  .........  .........    60
........AT ACATGCAAGT AGAACGCTGA GGTTTGGTGT TTACACTAGA CTGATGAGTT   120
GCGAACGGGT GAGTAACGCG TAGGTAACCT GCCTCATAGC GGGGGATAAC TATTGGAAAC   180
GATAGCTAAT ACCGCATAAG AGTAATTAAC ACATGTTGGT                        220
```

Figure 12. Patial DNA sequences of *S. agalactiae* from m-PCR product. The shaded letters indicate the primers used for sequencing.

เมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank พบว่ามีลำดับเบสตรงกับบางส่วนของลำดับเบสของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในฐานข้อมูลถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่แยกได้จากปลา Japanese horse mackerel จากประเทศญี่ปุ่น (Accession number AB297817.1)

สำหรับแบคทีเรีย *S. iniae* ที่ใช้เป็น positive control สำหรับทำ m-PCR เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส ได้ผลดัง Figure 13 และเมื่อนำลำดับเบสของแบคทีเรีย *S. iniae* เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank ปรากฏความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบางส่วนของแบคทีเรีย *S. iniae* ในฐานข้อมูล 98 เปอร์เซ็นต์ (Accession number EU 086698 – EU 086704)

```
AAGGGGAAAT CGCAAGTGCC .......... .......... ....ATCTAT ACACCAGTTC    60
TTTATTCAAC AACTGATTTA CCTGAAATTT CACAAACACT TGGTGATTCA CCACATTGGT   120
TCCAATTCTA TTATAGTAAA GATGATGGTA TTAACAGACA CATCATGGAC CGTTTGAAAG   180
CTGAAGGGGT AAAATCAATT CGTCCTAACA GTTGATGCGA CAGTTGGTGG AAACCGTGAA   240
GTTGATAAGC GTAATGGCTT TGTTTTCCCT GTTGGAATGC CAATTCGTTC AAGAGTATCT   300
CCCAAATGGG GCAGGAAAAA CAATGGACTA TGTTTATAAA GCTACTAAAC AAGCCCTATC   360
ACCAAAAGAT GTTGAATACA TTGCACAATA TTCAGGCTTG CCTGTATATG TTAAAGGGCC   420
ACAATGTGCA GAAGATGCCT TTCGTGCTTT AGAAGCTGGA GCTTCAGGAA TTTGGGTAAC   480
GAATCATGGT GGCCGTCAAT TAGATGGTGG TCCAGCAGCC TTTGATTCTC TCCAAGAAGT   540
TGCTGAAGCT GTTGATCGCC GTGTACCAAT TGTCTTTGAT TCTGGTGTGA GACGCGGACA   600
ACATGTCTTT AAAGCCTTAG CATCTGGTGC AGATCTTGTA GCACTTGGGC CGTCCCTGTT   660
ATTTACGGCT TAGCAATGGG TGGTAGCGTA GGAACACGTC AAGTCTTTGA AAAAATTAAT   720
GATGAACTTA AAATGGTTAT GCAATTAGCT GGTACACAAA CCATCGACGA TGTTAAACAT   780
TTTAAATTGC GTCATAACCC ATATGATTCT TCCATTCCAT TTAGCCAAAA TGCTTTAAAA   840
TTAGAAATCT TAGACGGCCC AATCAGATAT                                    870
```

Figure 13. Patial DNA sequences of *S. iniae* from m-PCR product. The shaded letters indicate the primers used for sequencing.

3.2.4. **การตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค** m-PCR

การตรวจสอบตัวอย่างไต และสมองของปลานิลด้วยวิธี m-PCR จาก 4 แหล่ง พบเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในไต และสมองของปลานิลทั้ง 5 ตัวอย่างจากอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และในตัวอย่างไตและสมองของปลานิล 4 ตัวอย่างจากอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนปลานิลจากอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราชถึงแม้พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้ด้วยวิธี m-PCR (Figure 14, 15 และ Table 22)

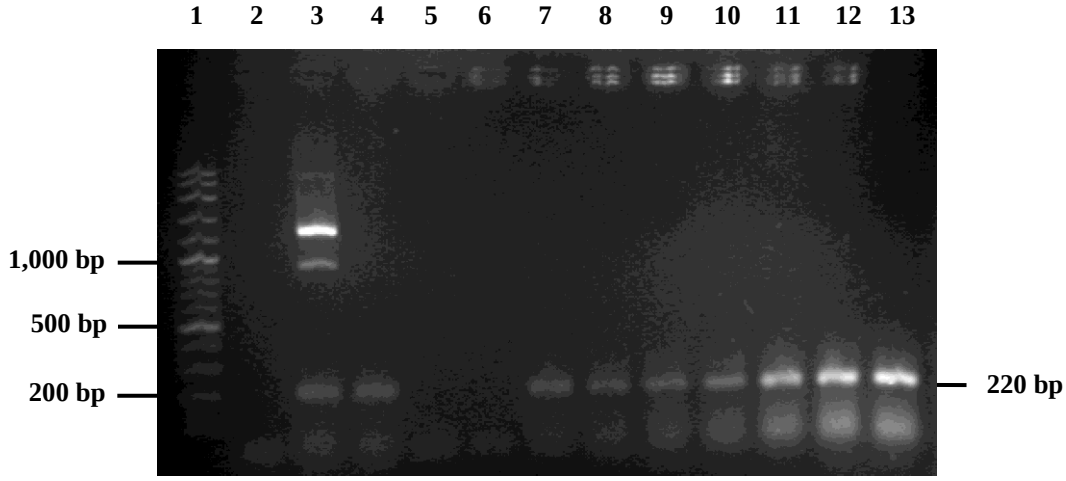

Figure 14. Agarose gel showing m-PCR products of *S. agalactiae* from kidney and brain tissues of tilapia cultured in Bangkeaw, Phatthalung province. Lane 1, 100 bp DNA ladder; Lane 2, negative control (DDW); Lane 3, positive control *L. garvieae* FK 040708 *S. iniae* (provided by Dr. T. Itami) and *S. agalactiae* DMST 17129; Lane 4-8, kidney tissues; Lanes 9-13, brain tissues.

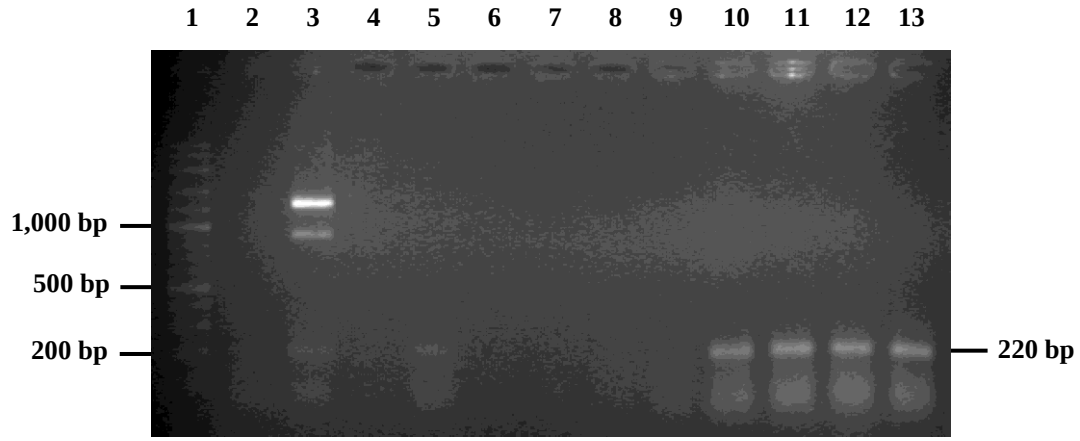

Figure 15. Agarose gel showing m-PCR products of *S. agalactiae* from tilapia cultured in Hua Sai, Nakhon Si Thammarat province. Lane 1, 100 bp DNA ladder; Lane 2, negative control (DDW); Lane 3, positive control *L. garvieae* FK 040708 *S. iniae* (provided by Dr. T. Itami) and *S. agalactiae* DMST 17129; Lane 4-8, kidney tissues; Lane 9-13, brain tissues.

Table 22. Detection of *S. agalactiae*, *S. iniae* and *L. garvieae* in tilapia tissues by m-PCR technique.

Area	Kidney (Total fish)			Brain (Total fish)		
	S. agalactiae	*S. iniae*	*L. garvieae*	*S. agalactiae*	*S. iniae*	*L. garvieae*
Paphayom, Phatthalung	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
Bangkeaw, Phatthalung	3(5)	0(5)	0(5)	5(5)	0(5)	0(5)
Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	1(5)	0(5)	0(5)	4(5)	0(5)	0(5)
Sichon, Nakhon Si Thammarat	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)

เมื่อนำตัวอย่างที่ทราบผลจาก m-PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและสกัดดีเอ็นเอจาก m-PCR วิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Genbank ผลปรากฏว่าแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีลำดับเบสดัง Figure 16

```
GAGTTTGATC ATGGCTCAG. ..........  ..........  ..........  ..........    60
........AT ACATGCAAGT AGAACGCTGA  GGTTTGGTGT  TTACACTAGA  CTGATGAGTT   120
GCGAACGGGT GAGTAACGCG TAGGTAACCT  GCCTCATAGC  GGGGGATAAC  TATTGGAAAC   180
GATAGCTAAT ACCGCATAAG AGTAATTAAC  ACATGTTGGT                         220
```

Figure 16. Patial DNA sequences of *S. agalactiae* from tilapia. The shaded letters indicate the primers used for sequencing.

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความตรงกัน 100 เปอร์เซ็นต์กับลำดับเบสบางส่วนของแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในฐานข้อมูลที่พบจากปลา Japanese horse mackerel ในประเทศญี่ปุ่น (Accession number AB297817.1)

การตรวจสอบเพิ่มเติมโดยนำแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ที่ให้ผลการทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเป็นลบจากการเพาะและแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 35 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบด้วยเทคนิค m-PCR พบว่าแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบมีบางตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกต่อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวมาจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิลในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช แสดงผลดัง Figure 17 และ Table 23

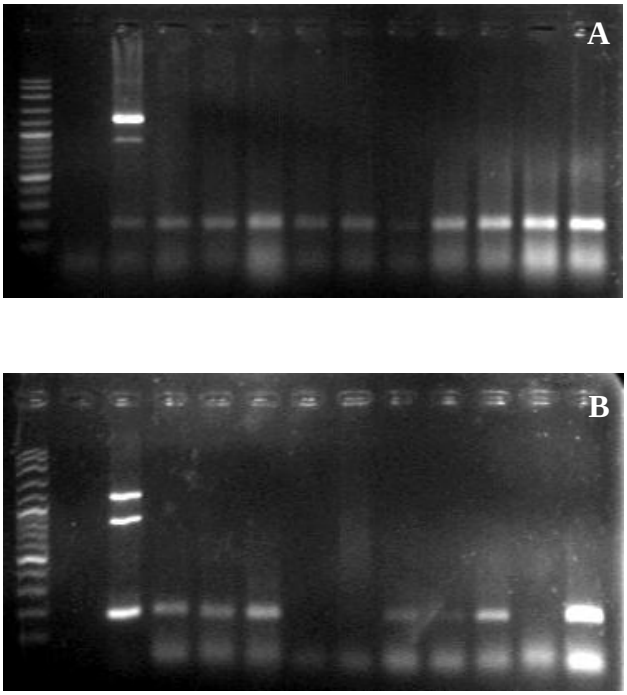

Figure 17. Agarose gel showing m-PCR products of *S. agalactiae* generated by using bacterial DNA isolated from fish. A: Bacterial DNA isolated from tilapia cultured in Hua Sai, Nakhon Si Thammarat province. B: Bacterial DNA isolated from tilapia cultured in Bangkaew, Phatthalung province.

Table 23. The m-PCR results of bacterial DNA isolated from tilapia samples.

Strain	Sampling site	Positive result		
		S. agalactiae	*S. iniae*	*L. garvieae*
TK1-1	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TK1-2	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TK2-1	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TK2-2	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TK2-3	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TB5-1	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TB5-2	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TB5-3	Paphayom, Phatthalung	-	-	-
TK16.1	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TK16.2	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TK16.3	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TB16.3	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TB17.1	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TB18.1	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TB18.2	Sichon, Nakhon Si Thammarat	-	-	-
TE21	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TK21	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TB21	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TL21	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TK22	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TB22	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TL22	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TK23	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TB23	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-
TL23	Hua Sai, Nakhon Si Thammarat	+	-	-

(table cont.)

Table 23. (Continued)

Strain	Sampling site	Positive result		
		S. agalactiae	*S. iniae*	*L. garvieae*
TB26	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TK27	Bangkeaw, Phatthalung	-	-	-
TK28.2	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TB28.1	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TB28.2	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TK29	Bangkeaw, Phatthalung	-	-	-
TK30.1	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TK30.2	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TB30.1	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-
TB30.2	Bangkeaw, Phatthalung	+	-	-

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม 12 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากปลาและตรวจสอบผลทั้งสองวิธีการพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ให้ผลการตรวจสอบตรงกันโดยจำแนกชนิดได้เป็น *S. agalactiae* แสดงดัง Table 24

Table 24. Identification of Gram-positive coccal isolates by conventional method and m-PCR technique.

Species	Conventional method				m-PCR (12 samples)			
	Paphayom	Bangkeaw	Hua Sai	Sichon	Paphayom	Bangkeaw	Hua Sai	Sichon
S. agalactiae		3	3			3	3	
S. iniae								
L. garvieae								
S. equinus				3				
S. dysgalactiae	3							
n of isolates	3	3	3	3	3	3	3	3
n of species identified	1	1	1	1	0	1	1	0

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

การเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงเป็นปัญหาสำคัญต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก ปัจจุบันพบว่ามีแบคทีเรียประมาณ 60-70 ชนิดที่ก่อโรคในสัตว์น้ำได้ (Plumb, 1999) สเตรปโตคอคโคซีสคืออีกโรคหนึ่งที่เป็นอุปสรรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเนื่องจากทำให้ปลาตายได้มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในระบบปิด (Perera *et al*., 1994) การเกิดโรคชนิดนี้ในสัตว์น้ำเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในสหรัฐอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลียและญี่ปุ่น แต่ยังไม่มีข้อมูลชัดเจนมากนักในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Komar *et al*., 2003) การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นสำรวจการแพร่กระจายของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลานิล ปลากะพงขาว ปลากะรัง ปลาเหยื่อ ดินและน้ำในพื้นที่เลี้ยงปลาของจังหวัดกระบี่ จังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลา และจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยวิธีการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อควบคู่กับวิธี m-PCR

การสำรวจแบคทีเรียใน พ.ศ. 2550 สามารถแยกแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมจากไตและสมองของปลานิลที่เลี้ยงในอำเภอบางแก้วและอำเภอศรีบรรพต จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมีการกระจายอยู่ทั่วไปในปลานิลที่เลี้ยงในจังหวัดพัทลุงและจังหวัดสงขลา แต่ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติหรืออาการของโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลานิลที่นำมาแยกเชื้อแต่อย่างใด สำหรับปลากะพงขาวและปลากะรังไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลาที่เลี้ยง ซึ่งปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาสองชนิดนี้เนื่องจากกระชังเลี้ยงปลาสองชนิดนี้ลอยอยู่ในทะเลและก้นกระชังสูงกว่าพื้นน้ำมาก จึงทำให้การไหลผ่านของน้ำเป็นไปอย่างสะดวก สำหรับพื้นที่วางกระชังโดยปกติควรเลือกที่มีลมพัดส่งผลให้เกิดการพัดไหลของน้ำ สำหรับระดับน้ำควรลึกอย่างน้อย 6 ฟุต และก้นกระชังควรสูงกว่าพื้นน้ำอย่างน้อย 2 ฟุต (โชคชัย, 2547) ด้วยเหตุนี้เศษอาหารที่เหลือตกค้างจึงไม่เกิดการหมักหมมที่ก้นกระชังมากเกินไป จึงไม่ส่งผลให้น้ำเน่าเสีย นอกจากนี้ทะเลเป็นพื้นที่เปิด ดังนั้นปัจจัยทางด้านคุณภาพน้ำจึงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ ปลาจึงสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงนี้ได้โดยไม่ส่งผลให้เกิดความเครียดในตัวปลา กิจการ และคณะ (2539) กล่าวว่า คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะเป็นตัวกลางที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำย่อมมีผลกระทบต่อสัตว์น้ำโดยตรง ดังนั้นหากปัจจัยด้านคุณภาพน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและต่างจากเดิมมาก หรือเกิดการเสื่อมลง สุขภาพ

ของสัตว์น้ำก็จะอ่อนแอลงด้วย เชื้อโรคที่มีอยู่ในตัวหรือในน้ำก็สามารถเข้าสู่ตัวสัตว์น้ำ และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดโรคได้ในที่สุด Bromage และ Owens (2009) พบว่าอุณหภูมิของน้ำที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติมากเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ปลากะพงขาวเกิดการตายสูงขึ้น หลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย Ghittino และ Prearo (1992) พบว่าน้ำที่มีอุณหภูมิ 21-22 องศาเซลเซียสส่งผลให้ปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่เลี้ยงในประเทศอิตาลีเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Palacios และคณะ (1993) ที่พบการระบาดของโรคในปลาเรนโบว์เทร้าท์ในประเทศสเปนที่อุณหภูมิน้ำสูงกว่า 17 องศาเซลเซียส แต่ Hudson และ Peters (2005) รายงานว่าโรคนี้สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียสขึ้นไป นอกจากปัจจัยทางด้านอุณหภูมิแล้ว ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงมากเกินไปก็จะส่งผลต่อการรับเชื้อของปลาเช่นกันโดย Perera และคณะ (1997) พบว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 9 นั้นส่งผลให้ปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) ที่ได้รับเชื้อ *S. iniae* มีการตายสูงสุด สำหรับแหล่งน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่เสื่อมลงมักส่งผลต่อสุขภาพปลาโดยจะทำให้ปลาที่เลี้ยงในแหล่งน้ำนั้นเกิดความเครียด และส่งผลให้ปลาเกิดโรคได้ง่ายขึ้น

สำหรับการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลากะพงขาว แม้การศึกษาในครั้งนี้จะไม่พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่ก่อโรคก็ตาม แต่ในช่วงปี พ.ศ. 2546 มีรายงานการติดแบคทีเรีย *S. iniae* ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในสุราษฎร์ธานี โดยปลามีอาการเสียการทรงตัว ตาโปน ผิวคล้ำ ซูบผอมและตกเลือด เมื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงพบว่าน้ำที่ใช้เลี้ยงมีความเค็ม 27 ส่วนในพันส่วน ความเป็นกรด-ด่าง 7.72 และค่าความเป็นด่างของน้ำประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Suanyuk *et al.*, 2010) เห็นได้ว่าการเกิดโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลากะพงขาวยังเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงจำเป็นต้องเฝ้าระวังการระบาดของโรคต่อไป

การเก็บตัวอย่างและศึกษาในปีพ.ศ. 2553 สามารถแยกแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมจากปลานิลได้ในทุกแหล่งเลี้ยงปลา และเมื่อทดสอบคะตาเลสให้ผลทั้งบวกและลบ เมื่อนำแบคทีเรียที่ให้ผลคะตาเลสลบมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20 STREP ปรากฏดังผลทดสอบว่าแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่พบในปลานิลสามารถพบได้ทั้งชนิดที่มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและไม่ก่อให้เกิดโรค เมื่อเปรียบเทียบอาการต่าง ๆ ของปลาพบว่าปลาจากอำเภอหัวไทรและอำเภอบางแก้วมีอาการของโรคสเตรปโตคอคโคซีสชัดเจน และรุนแรงกว่าปลาจากอำเภอป่าพะยอมที่มีอาการป่วยเช่นกัน และพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาในอำเภอหัวไทรและอำเภอบางแก้วนั้นจำแนกชนิดได้เป็น *S. agalactiae* ที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดเป็นกลุ่ม Beta – haemolytic ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ค่า

องค์ประกอบเลือดของปลาลดลงเพราะเม็ดเลือดถูกทำลาย ส่งผลให้สุขภาพของปลาอ่อนแอลงมาก (นเรศ และคณะ, 2548) การตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค m-PCR พบว่าผลการตรวจสอบจากเทคนิคดังกล่าวสอดคล้องกับการตรวจสอบแบคทีเรียโดยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อการจำแนกชนิด พบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในปลานิลที่เลี้ยงในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช แต่เมื่อเปรียบเทียบกันทั้งสองวิธีพบว่าวิธีการเพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลาในการตรวจสอบผลนาน แตกต่างจากการใช้เทคนิค m-PCR ที่มีความไวในการตรวจสอบและความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรียสูงกว่า และใช้เวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าวิธีการเพาะเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ Virolainen และคณะ (1994) ซึ่งเปรียบเทียบการใช้เทคนิค PCR กับการเพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อในการตรวจสอบเชื้อ *S. pneumoniae* ในของเหลวในหูชั้นกลางของเด็กที่เกิดอาการอักเสบบริเวณหูชั้นกลางว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวและจำเพาะต่อการตรวจเชื้อ pneumococci และรวดเร็วแต่วิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการเพาะเชื้อ

การตรวจหาแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในน้ำในบริเวณแหล่งเลี้ยงปลาพบแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำที่เลี้ยงปลานิลในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง ทำให้ทราบว่าในสภาวะปกติของแหล่งน้ำจะมีแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเจริญเติบโตได้ และเมื่อสภาพน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงจนส่งผลให้สุขภาพของปลาอ่อนแอ แบคทีเรียก็สามารถฉวยโอกาสเข้าสู่ตัวปลาและเจริญเติบโตต่อจนทำให้เกิดโรคในปลาได้

การตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลาเหยื่อจากจังหวัดสงขลาและจังหวัดกระบี่ พบแบคทีเรียดังกล่าวในปลาเหยื่อจากอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวปนเปื้อนอยู่ในปลาเหยื่อที่นำมาเลี้ยงปลา ดังนั้นหากนำปลาเหยื่อดังกล่าวมาเลี้ยงปลาจะเป็นอีกเส้นทางหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาที่เลี้ยง และอาจก่อให้เกิดโรคได้เมื่อปลาอ่อนแอเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Streptococcus* จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (Ruoff, 2002) และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *S. agalactiae* ที่มีการติดเชื้อในปลาสามารถทนสภาพเย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสได้นานถึง 9 เดือน (Evans *et al.,* 2004) และหากเกษตรกรนำปลาดังกล่าวมาใช้เลี้ยงปลาก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน

การเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อศึกษาคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาจากแหล่งที่เก็บตัวอย่างปลาแหล่งต่างๆ ระหว่างการเก็บตัวอย่าง พบว่าอุณหภูมิของน้ำในช่วงหน้าร้อนอยู่ในช่วง 30.50 – 33.50 องศาเซลเซียส และช่วงหน้าฝนอยู่ในช่วง 26.00 – 31.00 องศาเซลเซียส ถือว่าอุณหภูมิของ

น้ำที่เลี้ยงปลายังอยู่ในระดับปกติของการเลี้ยงปลาในเขตร้อนที่ต้องการอุณหภูมิระหว่าง 25 – 32 องศาเซลเซียส (ประเทือง, 2534)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำในช่วงเวลาที่ทำการวัด พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 4.0 – 6.8 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับที่คณิต และคณะ (2537 อ้างตาม Boyd, 1979) ได้ระบุไว้ว่า ปริมาณออกซิเจนตั้งแต่ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป จะเหมาะแก่การเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ระหว่าง 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงมาถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัตว์น้ำจะพอทนอาศัยอยู่ได้ แต่การเจริญเติบโตอาจไม่ดีเท่าที่ควร

ความเป็นด่างของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา แหล่งเลี้ยงปลานิลในจังหวัดพัทลุงค่าความเป็นด่างที่วัดได้อยู่ที่ประมาณ 10 – 46 มิลลิกรัมต่อลิตร ถือว่ายังอยู่ในเกณฑ์แต่ค่อนไปทางต่ำเมื่อเทียบกับค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมกับการเลี้ยงปลาอยู่ระหว่าง 20 – 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (สมหมาย, 2539) ส่วนแหล่งเลี้ยงปลาจุดอื่นค่าความเป็นด่างอยู่ที่ระหว่าง 30 – 112 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาที่ได้ระบุไว้ข้างต้น

ค่าความเป็นกรด-ด่างของแหล่งเลี้ยงปลาทั้งหมด ณ ช่วงเวลาที่ออกเก็บตัวอย่าง ค่าอยู่ที่ประมาณ 6.66 – 8.25 สอดคล้องกับที่ประเทือง (2534)ได้ระบุไว้ว่า ระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลาอยู่ที่ 6.5 – 9.0 ซึ่งถือได้ว่าในแหล่งเลี้ยงปลานั้น ๆ คุณภาพน้ำในด้านความเป็นกรด-ด่างมีค่าที่เหมาะสมดี

ความเค็มของน้ำจากแหล่งเลี้ยงปลาเป็นอีกปัจจัยที่ได้มีการตรวจวัด พบว่าระดับความเค็มของแหล่งน้ำที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาว และปลากะรัง อยู่ในระดับปกติทั้งนี้เนื่องจากแหล่งที่ทำการเลี้ยงปลาทั้งสองชนิด ได้ผูกกระชังไว้ในบริเวณทะเล จึงทำให้ระดับความเค็มของน้ำไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว จนส่งผลต่อการเลี้ยงปลา ในส่วนของปลานิลพบว่ามีแหล่งเลี้ยงปลานิลที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดสงขลา มีระดับความเค็มมากกว่า 0 ส่วนในพันส่วน ทั้งนี้เนื่องจากจุดที่เก็บมีทางเชื่อมผ่านถึงทะเล แต่ระดับความเค็มดังกล่าว ไม่มีผลต่อสุขภาพของปลาที่เลี้ยง เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่สามารถปรับตัวให้อยู่ในน้ำที่มีความเค็มกว้าง (Prunet and Bornancin, 1989)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถพบได้ในสัตว์น้ำ รวมถึงดิน น้ำและอาหารที่ใช้เลี้ยง แต่มีเพียง *S. agalactiae* ที่พบว่าสามารถทำให้เกิดการตายของปลาได้ และเมื่อปัจจัยต่าง ๆ ส่งผลให้ปลาเกิดความอ่อนแอแล้วแบคทีเรียก็จะฉวยโอกาสเข้าไปก่อโรคในปลา ดังนั้นเกษตรกรจึงควรเฝ้า

ระวังปัจจัยต่าง ๆ จากการเลี้ยงไม่ว่าจะเป็นคุณภาพน้ำ อาหารที่ใช้เลี้ยง และปัจจัยอื่น ๆ ที่จะส่งผลให้ปลาเกิดอาการเครียดและทำให้ปลาอ่อนแอลงจนเกิดโรค

โรคสเตรปโตคอคโคซีสเป็นโรคที่พบได้อย่างต่อเนื่อง และทำความเสียหายให้กับผู้เลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบการรายงานการเกิดโรค ได้แก่ *S. agalactiae* และ *S. iniae* อีกทั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบการเกิดโรคในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น วัว กบ หรือแม้กระทั่งคน (Evans *et al*., 2009; Ip *et al*., 2006; Persson *et al*., 2004) รวมถึงแบคทีเรีย *L. garvieae* ที่มีรายงานในปลา และกุ้งก้ามกราม (Chen *et al.,* 2001; Eldar *et al.,* 1999) ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในประเทศไทย และแบคทีเรียชนิดนี้ยังพบรายงานการติดต่อสู่คนด้วย (Wang *et al.,* 2007) จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่เลือกแบคทีเรียเหล่านี้มาศึกษาด้วยเทคนิค m-PCR เพื่อใช้เป็นวิธีการในการตรวจสอบการเกิดโรคกลุ่มนี้ทั้งในสัตว์น้ำ สัตว์บก รวมไปถึงคนด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

การตรวจหาแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลาเศรษฐกิจที่เลี้ยงในจังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลาและจังหวัดกระบี่ ในปีพ.ศ. 2550 ด้วยการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในปลานิลที่เลี้ยงในอำเภอบางแก้วและอำเภอศรีบรรพต จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา แต่ไม่พบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมในปลากะพงขาวและปลากะรัง นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำที่เลี้ยงปลานิลในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และในปลาเหยื่อจากอำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา ผลการสำรวจครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในตัวปลา น้ำเลี้ยงปลา รวมทั้งปลาเหยื่อที่ใช้ในการเลี้ยงปลา

การพัฒนาเทคนิค m-PCR ในครั้งนี้สามารถตรวจสอบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม 3 ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคสเตรปโตคอคโคซีสได้แก่ *S. agalactiae*, *S. iniae* และ *L. garvieae* เทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ต่ำสุดที่ 9.76, 39.06 และ 19.53 พิโคกรัมตามลำดับ

ตัวอย่างปลานิลปกติและปลานิลป่วยจากอำเภอป่าพะยอม อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิชล อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช ช่วงเดือนเมษายนและพฤษภาคม พ.ศ. 2553 ที่นำมาตรวจสอบโรคสเตรปโตคอคโคซีสด้วยเทคนิค m-PCR ควบคู่กับการตรวจสอบด้วยการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทคนิค m-PCR สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในตัวอย่างปลาจากอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราชและไม่พบแบคทีเรียทั้งสามชนิดในตัวอย่างปลานิลจากอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง และอำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช ผลการตรวจสอบครั้งนี้สอดคล้องกับการเพาะแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกชนิดด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียด้วยวิธีการพื้นฐานและการใช้ชุดทดสอบ API 20 STREP ที่พบแบคทีเรีย *S. agalactiae* จากตัวอย่างปลานิลในอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าในสภาวะปกติ แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมกลุ่มนี้ สามารถตรวจพบได้ ทั้งในปลาที่เลี้ยง ในน้ำ รวมถึงปลาเหยื่อ ดังนั้นรูปแบบและสภาพการเลี้ยงจึงมีส่วนสำคัญมากที่ช่วยป้องกันไม่ให้ปลาที่เลี้ยงเกิดสภาวะเครียดจนอ่อนแอ นำไปสู่การ

ฉวยโอกาสของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่จะก่อให้เกิดโรคกับปลาที่เลี้ยงได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค m-PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคสเตรปโตคอคโคซีสที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *S. agalactiae*, *S. iniae* และ *L. garvieae* นับเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถหาแนวทางสำหรับการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นได้อย่างทันท่วงที

เอกสารอ้างอิง

กมลพร ทองอุไร. 2539. โรคปลานิล. เอกสารวิชาการฉบับที่ 176. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมประมง. 2536. การเลี้ยงปลาน้ำกร่อย. กรุงเทพมหานคร: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมประมง. 2544. การเลี้ยงปลาน้ำกร่อย. กรุงเทพมหานคร: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กิจการ ศุภมาตย์, สาวิตรี ศิลาเกษ, วุฒิพร พรหมขุนทอง และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. เอกสารคำสอนวิชา 530-331 โรคและพยาธิปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 209 หน้า.

คณิต ไชยาคำ, สิริ ทุกข์วินาศ, ยงยุทธ์ ปรีดาลัมพะบุตร, พุทธ ส่องแสงจินดา และ ดุสิต ตันวิไลย. 2537. คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ความรู้เบื้องต้นและวิธีวิเคราะห์. กลุ่มสิ่งแวดล้อมแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง. สงขลา. 110 หน้า.

จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุณยรัตผลิน และกิจการ ศุภมาตย์. 2529. *Streptococcus* sp. กับโรคในปลาบู่ทราย. ว.สงขลานครินทร์ 8: 329-332.

เฉลิม หวันหมาน, ธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง และกิจการ ศุภมาตย์. 2548. โรคสเตรฟโตคอคโคซีสในปลากะพงขาว. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27: 291-305.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. 2547. หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 490 หน้า.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นเรศ ซ่วนยุก, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร คงประดิษฐ์ และกิจการ ศุภมาตย์. 2548. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27: 307-319.

นพดล ศุกระกาญจน์, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, กิจการ ศุภมาตย์ และจรีพร เรืองศรี. 2549. รายงานการวิจัย การศึกษาปัจจัยการเกิดโรค Streptococcosis และพยาธิสภาพของการติดเชื้อ

Streptococcus sp. ในปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus*). มหาวิทยาลัยทักษิณ. 41 หน้า.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นิสราภรณ์ เพ็ชร์สุทธิ์. ไม่ปรากฏปีพิมพ์. การผลิตสัตว์น้ำ: การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 189 หน้า.

บริษัท กิบไทย จำกัด. 2003. Basic techniques in nucleic acid analysis เอกสารการอบรมเชิงปฏิบัติการ. บริษัท กิบไทย จำกัด.

ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2534. การเลี้ยงปลาในกระชัง. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประเทือง เชาว์วันกลาง. 2534. คุณภาพน้ำทางการประมง. กรุงเทพฯ: ฟิสิกส์เซ็นเตอร์. 87 หน้า.

โปรแกรมวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต และ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2549. คู่มืออบรมการเลี้ยงปลาเก๋าในกระชังสำหรับผู้ประกอบการขนาดเล็ก. จดหมายข่าวทางเทคนิค ฉบับที่ 1-2 ของโครงการ 7396/TDH/THAI. โครงการ 7396/TDH/THAI “Children of the sea”. 114 หน้า.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. 2543. สภาวะการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. ว. แก่นเกษตร 28: 173-181.

ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และดุสิต ตันวิไล. 2530. ชนิดของปลากะรังที่พบในน่านน้ำไทยระหว่างปี 2524-2530. รายงานผลการประชุมทบทวนผลงานวิจัยการเพาะเลี้ยงปลากะรัง ณ สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.สงขลา. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 17-40.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์. 2544. โรคติดเชื้อที่สำคัญในปลาน้ำจืด. เอกสารแนะนำ กรมประมง. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์. 2539. ปลานิลเพาะเลี้ยงง่ายไร้โรคจริงหรือ. ว. การประมง 49: 529-536.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์ และพันธ์ศักดิ์ ใครบุตร. 2543. การเลี้ยงปลานิล. เอกสารคำแนะนำ กรมประมง. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เยาวนิตย์ ดนยดล, สถาพร ดิเรกบุษราคม และเพ็ญศรี เมืองเยาว์. 2543. คุณสมบัติของเชื้อและการเกิดโรคจากเชื้อ β – hemolytic *Streptococcus* sp. ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในจังหวัดปัตตานี และจังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2543. สงขลา:

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2548. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2546. เอกสารฉบับที่ 6/2548. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2553. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2551. เอกสารฉบับที่ 12/2553. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2548. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ ใน สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์. หน้า 7-1 – 7-9. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ. 2539. เอกสารคำสอน วิชา 530-441 การจัดการคุณภาพน้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. 2550. ปลากะรัง: การเพาะเลี้ยงปลากะรังหรือปลาเก๋า. เข้าถึงได้จาก http://www.coastalaqua.com/index.php?option=com_content&task=view&id=135&Itemid=2 เข้าถึงเมื่อ 17 สิงหาคม 2552.

Alcaide, E., Sanjuan, E., Gandara, F. D. L. and Garcia-Gomez, A. 2000. Susceptibility of amberjack (*Seriola dumerili*) to bacterial fish pathogens. Bull.Eur. Assoc. Fish Pathol. 20: 153-156.

Al-Harbi, A. H.1994. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. Aquaculture 128: 195 – 201.

Altinok, I., Capkin, E. and Kayis, S. 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of fish bacterial fish pathogens. Vet. Microbiol. 131: 332-338.

Austin, B. and Austin, D. A. 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingsston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Short protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Barnes, A. C., Guyot, C., Hansen, B. G., Mackenzie, K., Horne, M. T. and Ellis, A. E. 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the

abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). Fish and Shellfish Immunol. 12: 155-168.

Boyd, C. E. and Tucker. C. S. 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama.

Bromage, E. and Owens, L. 2009. Environmental factors affecting the susceptibility of barramundi to *Streptococcus iniae*. Aquaculture 290: 224-228.

Bromage, E. S., Thomas, A. and Owens, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Org. 36: 177-181.

Buller, N. B. 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual.Oxfordshire: CABI publishing.

Centers for Disease Control and Prevention. 1996. Invasive infection due to *Streptococcus iniae*—Ontario, 1995–1996. Morbid Mortal Weekly Rep. 45: 650–653.

Center for Food Security and Public Health. 2005. Streptococcosis. College of Veterinary Medicine, Iowa State University. 11 p.

Chang, P. H. and Plumb, J. A. 1996. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Appl. Aquacult. 6: 39-45.

Chen, S. C, Liaw, L. L., Su, H. Y., Ko, S. C., Wu, C. Y., Chaung, H. C., Tsai, Y. H., Yang, K. L., Chen, Y. C., Chen, T. H., Lin, G. R., Cheng, S. Y., Lin, Y. D., Lee, J. L., Lai, C. C., Weng, Y. J. and Chu, S. Y. 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. J. Fish Dis. 25: 727-732.

Chen. S. C., Lin, Y. D., Liaw, L. L. and Wang, P. C. 2001. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobranchium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis. Aquat. Org. 45: 45-52.

Chomdej, W. 1986. Technical Manual for Seed Production of Seabass. Songkhla: National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, The Ministry of Agricultural and Coopertive.

Collins, C. H., Lyne, P. M. and Grange, J. M. 1989. Microbiological Methods. 6th ed. London: Butterworths.

Doménech, A., Fernandez-Garayzabal, J. F., Pascual, C., Garcia, J. A., Cutul, M. T., Moreno, M. A., Collins, M. D. and Dominguez, L. 1996. *Streptococcus* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J. Fish Dis. 19: 33 - 38.

Duremdez, R., Al-Marzouk, A., Qasem, J. A., Al-Harbi, A. and Gharabally, H. 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. J. Fish Dis. 27: 307-310.

Eldar, A., Bejerrano, Y. and Bercovier, H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: Two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Curr. Microbiol. 28: 139-143.

Eldar, A. and Ghittino, C. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org. 36: 227-231.

Eldar, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine againt *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol. 56: 175-183.

Eldar, A., Perl, S., Frelier, P. F. and Bercovier, H. 1999. Red drum, *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. Dis. Aquat. Org. 36: 121-127.

Evans, J. J., Klesius, P. H., Gilbert, P. M., Shoemaker, C. A., Al-Sarawi, M. A., Landsberg, J., Duremdiz, R., Al-Marzouk, A. and Al-Zennki, S. 2002. Characterization of β-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Lisa klunzingeri* (Day) in Kuwait. J. Fish Dis. 25: 505-513.

Evans, J. J., Klesius, P. H., Pasnik, D. J. and Bohnsack, J. F. 2009. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Emerg. Infect. Dis. 15: 774-776.

Evans, J. J., Shoemaker, C. A. and Klesius, P. H. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *M. saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nare inoculation. Aquaculture 189: 197-210.

Evans, J. J., Wiedenmayer, A. A., Klesius, P. H. and Shoemaker, C. A. 2004. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. Aquaculture 233: 15-21.

Facklam, R. 2002. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. 15: 613-630.

Foo, J. T. W., Ho, B. and Lam, T. J. 1985. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to Streptococcal infection. Aquaculture 49: 185-195.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2002. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. Missouri: Mosby, Inc.

Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panzieri, C., Lauro, L., Ciappelloni, R. and Petracca, G. 2003. Emerging pathologies in aquaculture: Effects on production and food safety. Vet. Res. Commun. 27: 471–479.

Ghittino, P. and Prearo, M. 1992. Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: Preliminary note. Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica. 8: 4–9.

Hawke, J. P. 2000. Bacteial disease agaents. *In* Encyclopedia of Aquaculture. Strickney, R.R. (ed.). p. 69-97. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Hudson, C. and Peters, K. 2005. Survey of specific fish pathogens in free-ranging fish from Devils Lake, North Dakota. U.S. Fish and Wildlife Service, Bozeman Fish Health Center Tech. Rept. 05-02. 20 pp.

Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R. 1993. Bacterial Disease of Fish. New York: Academic Press.

Ip, M., Cheuk, E. S. C., Tsui, M. H. Y., Kong, F., Leung, T. N. and Gilbert, G. L. 2006. Identification of *Streptococcus agalactiae* serotype III suptype 4 clone in association with adult invasive disease in Hong Kong. J. Clin. Microbiol. 44: 4252-4254.

Kang, S. H., Shin, G. W., Shin, Y. S., Palaksha, K. J., Kim, Y. R., Yang, H. H., Lee, E. Y., Lee, E. G., Huh, N. E., Ju, O. M. and Jung, T. S. 2004. Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). J. Vet. Sci. 5: 387-390.

Kawahara, E. and Kusuda, R. 1987. Direct fluorescent antibody technique for differentiation between alpha and beta – hemolytic *Streptococcus* sp. Fish Pathol. 22: 77.

Kawahara, E., Sako, H., Nomura, S. and Kusuda, R. 1984. Hemolysin production by beta-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Fish Pathol. 24: 219-223.

Khawsak, P., Deesukon, W., Chaivisuthangkura, P. and Sukhumsirichart, W. 2008. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp. Mol. Cell. Probes 22: 177-183.

Kitao, T., Aoki, T. and Sakoh, R. 1981. Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. Fish Pathol. 19: 173-180.

Komar, C., Tan, Z., Bolland, A. and Grisez, L. 2003. The Prevalence of *Streptococcus iniae* Infection in Cultured Fish of South East Asia. *In* Proceeding on "Quality: The Focus of Asian Aquaculture" Thailand. 22-25 September 2003. pp. 121.

Lahav, D., Eyngor, M., Hurvitz, A., Ghittino, C., Lublin, A. and Eldar, A. 2004. *Streptococcus iniae* type II infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 62: 177–80.

Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Luk, W. K., Fung, A. M. Y., Hui, W. T., Fong, A. H. C., Chow, C. W., Wong, S. S. Y. and Yuen, K. Y. 20006. Clinical isolates of

Streptococcus iniae from Asia are more mucoid and β-hemolytic than those from North America. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 54: 177-181.

Martinez, G., Harel, J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D. and Gottschalk, M. 2000. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 38: 71-78.

Martinez, G., Harel, J. and Gottschalk, M. 2001. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. Can. J. Vet. Res. 65: 68-72.

Mata, A. I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M. M., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J. F. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3183-3187.

McNulty, S. T., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J. 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture 220: 165-173.

Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S. and Kashi, Y. 2002. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. J. Dairy Sci. 85: 1717-1723.

Nguyen, H. T., Kanai, K. and Yoshikoshi, K. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. Aquaculture 205: 7-17.

Nho, S. W., Shin, G. W., Park, S. B., Jang, H. B., Cha, I. S., Ha, M. A., Kim, Y. R., Park, Y. K., Dalvi, R. S., Kang, B. J., Joh, S. J. and Jung, T. S. 2009. Phenotypic characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). FEMS Microbiol. Let. 293: 20-27.

Nomoto, R., Munasinghe, L. I., Jin, D. H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T. and Yoshida, T. 2004. Lancefield group C

Streptococcus dysgalactiae infection responsible for fish mortalities in Japan. J. Fish Dis. 27: 679-686.

Palacios, M. A., Zamora, M. J., Velazquez, J., Zamora, E. and Duran, A. 1993. Vaccination against *Streptococcus* spp.: Laboratory and field trials results. Bull. Soc. Ital. Patol. Ittica. 5: 7-10.

Perera, R. P., Johnson, S. K., Collins, M. D. and Lewis, D. H., 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. J. Aquat. Anim. Health 6: 335 - 340.

Perera, R. P., Johnson, S. K., and Lewis, D. H., 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture 152: 25 - 33.

Persson, E., Berg, S., Trollfors, B., Larsson, P., Ek, E., Claesson, B. E. B., Jonsson, L., Rådberg, G., Ripa, T. and Johansson, S. 2004. Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001. Clin. Microbiol. Infect. 10: 791-796.

Pier, G. B. and Madin, S. H. 1976. *Streptococcus iniae* sp. Nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol. 26: 545-553.

Plumb, J. A. 1994. Health Maintenance of Cultured Fish: Principal Microbial Disease. Florida: CRC Press, Inc.

Plumb, J. A. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa: Iowa State University Press.

Plumb, J. A., Schachte, J. H., Gaines, J. I. Peltier, W. and Carroll, B. 1974. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and north west Florida coast of the Gulf of Mexico. Trans. Am. Fish Soc. 103: 358-361.

Prunet, P. and Bornancin, M. 1989. Physiology of salinity tolerance in tilapia: an update of basic and applied aspects. Aquat. Living Resour. 2: 91-97.

Rabanal, H. R. and Soesanto, V. 1982. Introduction to the taxonomy, biology and fishery of the giant seaperch or seabass, *Lates calcarifer*, pp. 2-8. *In* South China Sea Fisheries Development and Coordination Programe Report of Training

Course on Seabass Spawning and Larval Rearing, Songkhla, Thailand, 1-20 June 1982. SCS/GEN/82/39.

Rasheed, V. and Plumb, J. A. 1984. Pathogenecity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish (*Fundulus grandis*, Baird Girard). Aquaculture 37: 97-105.

Rodina, A. G. 1972. Methods in Aquatic Microbiology. Baltimore: University Park Press.

Rotta, J. 1986. Pyogenic Hemolytic Streptococci. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G., eds.). p. 1047-1054. Baltimore: Williams & Wilkins.

Ruoff, K. L. 2002. Miscellaneous catalase-negative, Gram-positive cocci: Emerging Opportunists. J. Clin. Microbiol. 40:1129-1133.

Sano, T. and Fukuda, H. 1987. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. Aquaculture 67: 59-69.

Schleifer, K. H. 1986. Gram-positive cocci. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G., eds.). p. 999-1002. Baltimore: Williams & Wilkins.

Schuhardt, V. T. 1987. Pathogenic Microbiology. New York: J.B. Lippincott Company.

Shima, T., Kodama, H., Iwasaki, T., Watarai, S. and Asagi, M. 2006. Adherence of *Lactococcus garvieae* to the yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminch and Schlegel. J. Fish Dis. 29: 249-253.

Shoemaker, C. A., Evans, J. J. and Klesius, P. H. 2000. Density and dose: Factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 155: 229-235.

Stokes, E. J. and Ridgwar, G. L. 1987. Clinical Microbiology. London: Butler & Tanner Ltd.

Suanyuk, N. 2009. Streptococcosis of cultured fish in Thailand and vaccine development against the disease. Ph.D. Biotechnology. Prince of Songkla University.

Suanyuk, N., Fanrong, K., Ko, D., Gilbert, G. L. and Supamattaya, K. 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand-Relationship to human isolates? Aquaculture 284: 35-40.

Suanyuk, N., Sukkasame, N., Tanmark, N., Yoshida, T., Itami, T., Thune R. L., Tantikitti, C. and Supamattaya, K. 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 32: 341-348.

Toranzo, A. E., Magariños, B. and Romalde, J. L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246: 37-61.

Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. and Múzquiz, J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 29: 177-198.

Virolainen, A., Salo, P., Jero, J., Karma, P., Eskola, J. and Leinonen, M. 1994. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumonia* in middle ear fluid of children with acute otitis media. J. Clin. Microbiol. 32: 2667-2670.

Wang, C. YC., Shie, H. S., Chen, S. C., Huang, J. P., Hsieh, I. C., Wen, M. S., Lin, F. C. and Wu, D. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: Possible association with aquaculture outbreaks. Int. J. Clin. Pract. 61: 68–73.

Weinstein, M. R., Litt, M., Kertesz, D. A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., McGeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B. M., Borczyk, A. and Low, D. E. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. N. Engl. J. Med. 337: 589–594.

Yanong, R. P. E. and Francis-floyd, R. 2002. Streptococcal infections of fish. *In* Circular 57. The Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, University of Florida.

Yuasa, K., Kitancharoen, N., Kataoka, Y. and Al-Murbaty, F. A. 1999. *Streptococcus iniae* the causative agent of mass mortality in rabbitfish, *Siganus canaliculatus* in Bahrain. J. Aquat. Anim. Health 11: 87-93.

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 36: 983-985.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. สารเคมีสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

1.1 สีย้อมแกรม ตามวิธี Haucker modification of gram method (Rodina, 1972)

การเตรียมสารละลาย

1.1.1. Crystal violet

A - crystal violet	2.0	กรัม
- ethyl alcohol (95% alcohol)	20.0	มิลลิลิตร
B - ammonium oxalate	0.8	กรัม
- distilled water	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้งาน ควรเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันการโดนแสงและสามารถเก็บรักษาสารละลายนี้ได้เป็นเดือน

1.1.2. Lugal solution

- crystalline iodine	1	กรัม
- potassium iodine	2	กรัม
- distilled water	300	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน คนให้ละลาย เก็บในขวดสีชา

1.1.3. Safranin

เตรียม stock safranin 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ 95% ethyl alcohol เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 ก่อนจะนำไปใช้

วิธีการย้อมแกรม

เกลี่ยเชื้อบาง ๆ ลงบนสไลด์ ทิ้งให้แห้ง นำไปอังไฟพออุ่น (fixed) หยด crystal violet ให้ท่วม วางทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 2 วินาที หยด lugal solution ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออก (decolorized) ด้วย 95% ethyl alcohol 30 วินาที แล้วรีบล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด safranin ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 X

ผลที่ได้ แบคทีเรียแกรมบวก : ติดสีม่วงน้ำเงิน

แบคทีเรียแกรมลบ : ติดสีแดง

1.2 หลักการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ดวงพร, 2537; นันทนา, 2537)

1.2.1. การทดสอบคะตาเลส

การทดสอบเอนไซม์คะตาเลสใช้ในการแยกแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ออกจาก Streptococci และใช้ในการแยกแบคทีเรียอื่น ๆ ด้วย

กลไกในการทำงานของคะตาเลส

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

โดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสเพื่อไปย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกเป็นแก๊สออกซิเจนและน้ำได้

วิธีการทดสอบ

หยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและแห้ง เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงแตะลงในหยดของ H_2O_2 ผสมให้เข้ากัน

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่เกิดฟอง

* เชื้อ Streptococci จะเป็น catalase –

2. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992)

2.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity)

สารเคมี

1. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์

เมทิลออเรนจ์	0.5	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	100	มิลลิลิตร

ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์

เมทิลเรด	0.5	กรัม
น้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน	100	มิลลิลิตร

ละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล

กรดซัลฟูริกเข้มข้น	6	มิลลิลิตร

ค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ ๆ แล้วปิดฝา ทิ้งไว้ให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล

โซเดียมคาร์บอเนต	10.6	กรัม

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ ๆ วางไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมดสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไป จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น(นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หยดเมทิลออเรนจ์ 4-8 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง
3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$$\text{ค่าความเป็นด่าง} = \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง}}$$

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO)

สารเคมี

1. สารละลาย manganous sulfate

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	480	กรัม หรือ
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	400	กรัม หรือ
$MnSO_4 \cdot H_2O$	364	กรัม

ละลาย $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 364 กรัม ในน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรอง แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

2. สารละลาย alkali-iodide-azide (AIA)

NaOH	500	กรัม
NaI	135	กรัม
หรือ		
KOH	700	กรัม
KI	150	กรัม
NaN_3	10	กรัม

ละลาย NaOH 500 กรัม และ NaI 135 กรัม หรือใช้ KOH 700 กรัม และ KI 150 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จากนั้นละลาย NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย NaN_3 ผสมกับสารละลาย NaOH- NaI ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

3. น้ำแป้ง

soluble starch	2	กรัม
salicylic acid	0.2	กรัม

เติม soluble starch 2 กรัม และ salicylic acid 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มจนสารละลายใส

4. กรดกำมะถัน (H_2SO_4) เข้มข้น

5. สารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate

$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	6.205	กรัม
NaOH	0.4	กรัม

ละลาย $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 6.205 กรัม และ NaOH 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จากนั้นหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมโดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน potassium dichromate

6. สารละลายมาตรฐาน potassium dichromate 0.025 นอร์มอล

$K_2Cr_2O_7$ 0.6129 กรัม

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 0.6129 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

7. สารละลาย potassium iodide

KI 2 กรัม

ละลาย KI 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างน้ำให้เต็มขวด BOD (พยายามอย่าให้เกิดฟอง) เติม $MnSO_4$ 1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย AIA 1 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาขวดผสมสารละลายให้เข้ากันโดยพลิกขวดกลับหัวไปมา 20 ครั้ง จากนั้นปล่อยให้ตะกอนนอนก้น

2. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดและพลิกขวดกลับหัวเพื่อให้กรดละลายตะกอนจนหมด

3. ตวงน้ำตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร ไปไตเตรทกับสารละลาย sodium thiosulfate จนสารละลายเป็นสีเหลืองอ่อน

4. เติมน้ำแป้งลงไป 8 หยด ไตเตรทต่อจนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี แสดงว่าถึงจุดยุติ

การหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate

เติมสารละลาย potassium dichromate 0.025 นอร์มอล 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่บรรจุสารละลาย potassium iodide 100 มิลลิลิตร และกรดกำมะถันเข้มข้น 2-3 หยด แล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมประมาณ 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate เช่นเดียวกับการไตเตรทหาความเข้มข้นของ DO ในน้ำตัวอย่าง และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

การคำนวณหาปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัม/ลิตร)

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

$$= \frac{\text{ปริมาตรของ } Na_2S_2O_3\text{ที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของ } Na_2S_2O_3 \times 8 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง}}$$

3. การทดสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค m-PCR

3.1 สารเคมีสำหรับสกัด bacterial DNAจากเนื้อเยื่อสัตว์

1. Tris-HCl (1 M, pH 8.0)

Tris base 1.211 กรัม

เติม Tris base ในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น รอให้สารเย็นตัวแล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. TE buffer pH 8.0 (100 มิลลิลิตร)

Tris-HCl (1 M, pH 8.0) 1.0 มิลลิลิตร

EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 0.0372 กรัม

เติม Tris-HCl (1 M, pH 8.0) ลงในน้ำกลั่น (DDW) ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ครบ 100 มิลลิลิตร เติม EDTA ลงไปละลายให้เข้ากันทำการฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10.0 กรัม

เติม sodium dodecyl sulfate ทีละเล็กน้อย ลงในน้ำกลั่น (DDW) 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนประมาณ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารละลายได้ดีขึ้น

4. 5M NaCl

Sodiumchloride(NaCl) 29.44 กรัม

เติม sodiumchloride ในน้ำกลั่น (DDW) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมจนละลายหมด ทำการฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลาย CTAB/NaCl

NaCl	4.1	กรัม
Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	10.0	กรัม

เติม NaCl ลงในน้ำกลั่น (DDW) 80 มิลลิลิตร เติม CTAB ลงไปอย่างช้า ๆ ผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนประมาณ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารละลายได้ดีขึ้น เมื่อละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. TBE electrophoresis buffer (10X Stock solution)

Tris base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	40	มิลลิลิตร
น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1	ลิตร

เติม tris base ลงในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนจนละลายหมดแล้วเติม boric acid คนจนสารละลายหมดแล้วเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ลงไป ผสมสารให้เข้ากันแล้วจึงเติมน้ำลงไปพอประมาณ นำสารที่ได้ไปทำการปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วจึงเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. EDTA pH 8.0 ความเข้มข้น 0.5 M

EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)	186.1	กรัม

เติม EDTA ลงในน้ำปริมาตร 700 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 10 M NaOH ให้ได้ pH 8.0 (ประมาณ 50 มิลลิลิตร) แล้วจึงปรับปริมาตรสารให้ครบ 1 ลิตร

8. 6X Loadind buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Bromphenol blue	0.025	กรัม
Xylene cyanol	0.025	กรัม
Glycerol	3	มิลลิลิตร
Absolute ethanol	2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

เติม bromphenol blue ลงใน absolute ethanol ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เติม xylene cyanol ละลายให้สารเข้ากัน เติม glycerol แล้วคนสารให้เข้ากันทั้งหมด กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. Ethidium bromide solution 1000X stock solution, 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Ethidium bromide	50	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เติม ethidium bromide ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

เตรียม working solution 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เจือจาง 1000X stock ethidium bromide solution อัตรา 1:1,000 เพื่อใช้งาน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายอัครวิทย์ อิสสะโร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4842084

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Poster presentations:

Itsaro, A., Suanyuk, N. and Tantikitti, C. 2010. Detection of pathogenic gram-positive cocci bacteria in economic fish. The 7th IMT-GT UNINET and The 3rd Joint International PSU-UNS Conferences. 7-8 October 2010. Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

รางวัล

รางวัลระดับยอดเยี่ยม ประเภทโปสเตอร์ เรื่อง Detection of pathogenic gram-positive cocci bacteria in economic fish จากงานประชุมวิชาการนานาชาติ “The 7th IMT-GT UNINET The 3rd Joint International PSU-UNS Conferences”