การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค แอโรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า ด้วยวิธีพีซีอาร์และการย้อมสีแกรม

Detection of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila* by PCR and Gram staining method

อภิชาติ พันชูกลาง[1*], สุรีพร วิจิตรโสภา[2] อวิกา ศิริรัตนากร[3] และณิศรา ปรีชานนท์[3]
Apichart Punchukrang[1*] Sureeporn Wijitsopa[2] Avika Siriratanakorn[3] and Nissara Preechanon[3]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ก่อให้เกิดโรคด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และวิธีการย้อมสีแกรม โดยการนำยีน *Aeromonas hydrophila* cytolytic enterotoxin (*AHCYTOEN*) มาใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบและจำแนกเชื้อ *A. hydrophila* จากการศึกษาพบว่ายีน *AHCYTOEN* สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ เนื่องจากผลผลิตของพีซีอาร์มีขนาดโมเลกุล 232 bp ตรงกับแถบโมเลกุลที่คาดหมายไว้ เช่นเดียวกับการย้อมสีแกรมของเชื้อที่พบว่ามีการติดสีแกรมลบในตัวอย่างของ *A. hydrophila* (A.h3) และ *A. hydrophila* (A.h4) เท่านั้น

คำสำคัญ: แอโรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า, ยีน *AHCYTOEN* ,พีซีอาร์,การย้อมสีแกรม

Abstract

The aim of this study was detecting virulent pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila* using PCR amplification and Gram staining method. The *Aeromonas hydrophila* cytolytic enterotoxin (*AHCYTOEN*) gene was used for identification the virulent bacteria from those sample. The results showed that *AHCYTOEN* gene could be amplified target DNA with expected size of *Aeromonas hydrophila* (232 bp) and Gram-negative bacteria were represented by *A. hydrophila* (A.h3) and *A. hydrophila* (A.h4).

Keyword: *Aeromonas hydrophila*, *AHCYTOEN*, PCR, Gram staining

[1]อาจารย์ โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
[2]นักวิทยาศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
[3]อาจารย์ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
[*]**Corresponding author, E-mail:** punchukrang@gmail.com

บทนำ

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาดความกว้างประมาณ 0.7 -0.8 ไมโครเมตร และยาว 1.0 -1.5 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแส้ (flagellum) ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวล จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobes แบคทีเรียชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำต่างๆ โดยเฉพาะปลา ลักษณะการติดเชื้อในปลาส่วนใหญ่มักเกิดอาการตกเลือด มีบาดแผลบนลำตัว และครีบ ท้องบวมน้ำ ตาโปน กกหูบวม ช่องท้องจะมีน้ำขุ่นสีเลือด ตับชีดจาง ไตบวม อวัยวะภายในทั้งหมดตกเลือด ปลาว่ายน้ำเสียการทรงตัว (ปภาศิริ, 2537 ; วิพรพรรณ์ และคณะ 2555) การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคได้อย่างจำเพาะเจาะจงและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยเฉพาะวิธีการตรวจสอบบริเวณของยีนก่อโรค cytolytic enterotoxin ของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR (Sarkar et al., 2013) วิธีการดังกล่าวถึงแม้จะมีความรวดเร็วและจำเพาะเจาะจง แต่ยังคงเป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการย้อมสีแกรมซึ่งยังคงเป็นวิธีพื้นฐานที่ยังคงมีการใช้งานอยู่ในปัจจุบัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการตรวจสอบเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธี PCR และวิธีการย้อมสีแกรมควบคู่กันเพื่อเป็นการยืนยัน *Aeromonas hydrophila* ว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการใช้เทคนิค PCR ในตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ด้วยยีน cytolytic enterotoxin และวิธีการย้อมสีแกรม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ

เชื้อ *A. hydrophila* ที่ติดเชื้อในปลาดุกลูกผสม (*Clarias batrachus*) และปลากด (*Hemibagrus wyckioides*) ได้รับการคัดแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์โดยหน่วยงาน**ด้าน**วิทยาศาสตร์และสุขภาพสัตว์น้ำในประเทศไทยสองแห่ง (ด้วยข้อจำกัดทางสัญญาบางประการไม่สามารถระบุรายละเอียดได้) จำนวน 5 ตัวอย่าง

2. การศึกษาด้านอณูชีววิทยาระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

นำเชื้อ *A. hydrophila* ที่ได้รับมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว และรวบรวมเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดทดสอบ MasterPure™ DNA Purification Kit ของ epicentre® จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของตำแหน่งยีน cytolytic enterotoxin ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจง ตามรายงานของ (Cagatay and Şen, 2014) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

AHCYTOEN -f 5’-GAGAAGGTGACCACCAAGAACAA-3’

AHCYTOEN -r 5’-AACTGACATCGGCCTTGAACTC-3’

ส่วนประกอบของการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 100 ng/µL DNA template จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10 µM dNTP mix จำนวน 400 ไมโครโมล, 25 mM $MgCl_2$ จำนวน 2 มิลลิโมล, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.4 ไมโครโมลและ 5 U/µL Taq DNA polymerase จำนวน 0.1 ยูนิตในปริมาตรรวมสุทธิ 25 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนตามรายงานของ (Cagatay and Şen, 2014) ดังนี้ Initial denaturation 94 ℃ เวลา 1 นาที Denaturation 94 ℃ เวลา 2 นาที, Annealing 56 ℃ เวลา 2 นาทีและ Extention 72 ℃ เวลา 1 นาทีจำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย Final extention 72 ℃ เวลา 5 นาที ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR บนเจลอะกาโรส 1% ย้อมด้วยสี ethidium bromide จากนั้นนำมาตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน (Gel documentation)

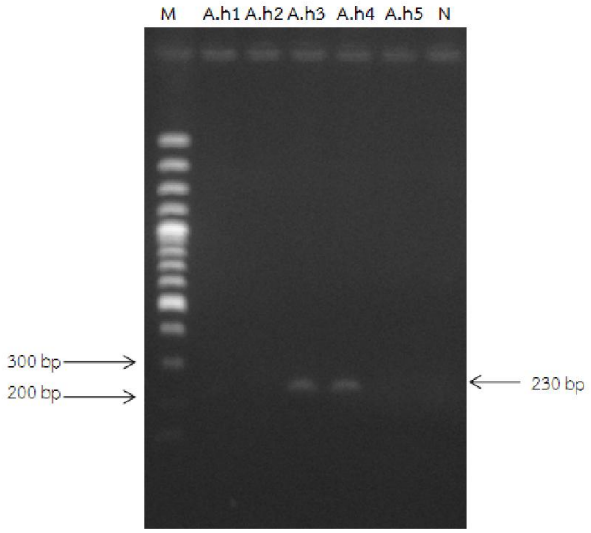
3. การย้อมสีแกรม (Gram’s staining)

ใช้การย้อมสีแกรมเพื่อจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก และมีแกรมลบ ด้วยสีคริสตัลไวโอเลต และสีซาฟรานิน ตามวิธีการของ จุรีย์รัตน์ (2552)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *A. hydrophila* ในตำแหน่งจำเพาะบริเวณยีน cytolytic enterotoxin โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ AHCYTOEN -f และ AHCYTOEN -r พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ A.h3 และ A.h4 ได้โดยมีความยาวประมาณ 230 bp (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sarkar et al. (2013) ที่ได้ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากยีน cytolytic enterotoxin มีขนาดความยาวที่ 232 bp โดยผลที่ได้จากการนำ *A. hydrophila* จำนวน 5 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในส่วนของยีน cytolytic enterotoxin พบว่ามีเพียง 2 ตัวอย่างที่มีขนาดของดีเอ็นเอตรงตามที่ต้องการได้แก่ ตัวอย่างเชื้อ A.h3 และ A.h4 ในขณะที่ 3 ตัวอย่างได้แก่ A.h1, A.h2 และ A.h5 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในยีน cytolytic enterotoxin ได้



ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส : Lane M- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder plus), Lane A.h1- *A. hydrophila* ตัวอย่างที่ 1, Lane A.h2- *A. hydrophila* ตัวอย่างที่ 2, Lane A.h3- *A. hydrophila* ตัวอย่างที่ 3, Lane A.h4- *A. hydrophila* ตัวอย่างที่ 4, Lane A.h5- *A. hydrophila* ตัวอย่างที่ 5, N- Negative Control (น้ำ)

การย้อมสีแกรม

การย้อมสีแบบแกรมเพื่อจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าตัวอย่างของแบคทีเรียที่ A.h3 และ A.h4 เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในขณะที่ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ A.h1, A.h2 และ A.h5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

หมายเลข	การติดสีแกรม	รูปร่าง
A.h1	แกรมบวก	ท่อนยาว
A.h2	แกรมบวก	ท่อนยาว
A.h3	แกรมลบ	ท่อนสั้น
A.h4	แกรมลบ	ท่อนสั้น
A.h5	แกรมบวก	ท่อนสั้น

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะและการติดสีแกรมเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายใต้กำลังขยาย 100x

สรุปผลการวิจัย

ตำแหน่งยีน cytolytic enterotoxin สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบยืนยันเชื้อ *A. hydrophila* ได้อย่างจำเพาะเจาะจงเช่นเดียวกับผลจากการย้อมสีแกรม ซึ่งตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นแบคทีเรีย *A. hydrophila* เพียงสองตัวอย่างคือหมายเลข A.h3 และ A.h4 เท่านั้น

ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการย้อมสีแกรมสามารถนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นของเชื้อ *A. hydrophila* ก่อโรคได้ แต่หากต้องการยืนยันผลการตรวจสอบที่จำเพาะเจาะจงควรใช้วิธีการทำพีซีอาร์

เอกสารอ้างอิง

จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. (2552). **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. (2537). **โรคและพยาธิสัตว์น้ำ**. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก, วัฒนศักดิ์ จำละคร และ อนิรุธ เนื่องเม็ก. (2555). “การแยกเชื้อและความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟิลาที่แยกได้จากปลานิลปกติในกว๊านพะเยา”. **แก่นเกษตร.** 40 ฉบับพิเศษ, 355-361

Cagatay, Ifakat T. and Şen, Evrim B. (2014). Detection of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farms in Turkey. **International Journal of Agriculture & Agricultural.** (2), 435-438.

Sarkar, Agniswar., Saha, Mousumi. and Roy, Pranab. (2013). Detection of 232bp Virulent Gene of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* through PCR Based Technique: (*A Rapid Molecular Diagnostic Approach*). **Advances in Microbiology.** 3, 83-87.