

การศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เรื้อยที่คัดแยกได้
จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

Study of antibiotic resistant pattern of bacteria
isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farm



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study of antibiotic resistant pattern of bacteria
isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farm



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก
ฟาร์มเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Study of antibiotic resistant pattern of bacteria isolated
from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farm

ชื่อนักศึกษา

นางสาวกนกวรรณ ล่องลอย รหัสนักศึกษา 57050668
นางสาวนพิษฐา บาริศรี รหัสนักศึกษา 57050707
นางสาวนันท์พร มั่นสวาทะไพบุลย์ รหัสนักศึกษา 57050710

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

คณะ

วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา

2560

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรนนท์กิจ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ ล่องลอย	รหัสนักศึกษา	57050668
	นางสาวนพิชฐา บาริสรี	รหัสนักศึกษา	57050707
	นางสาวนันทชพร มั่นสวาทะไพบุลย์	รหัสนักศึกษา	57050710
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ		

บทคัดย่อ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญ ซึ่งมีการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ ปลานิลเป็นที่นิยมบริโภคเนื่องจากเนื้อปลาที่คุณค่าทางอาหารสูงและรสชาติดี แต่อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลานิลยังประสบปัญหาจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน ในฟาร์มเลี้ยง ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิล ผลการทดลองพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีระดับการดื้อยา Erythromycin และ Cefoxitin สูงที่สุด

คำสำคัญ : การดื้อยา แบคทีเรีย ปลานิล ยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study of antibiotic resistant pattern of bacteria isolated from <i>Oreochromis niloticus</i> farm	
Students	Miss Kanokwan Longloy	Student ID 57050668
	Miss Napittha Barisri	Student ID 57050707
	Miss Nunthouchaporn Mansawathapiboon	Student ID 57050710
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2017	
Advisor	Dr.Karn Wongsariya	

Abstract

Nile tilapia is a freshwater fish with an economic impact and it is gaining the largest portion for freshwater export market of the nation. Nile tilapia is good choice for consumer due to its muscle contain valuable nutrition and good flavor. However, the farmers face the problems of the contamination of antibiotic resistance bacteria, especially Gram negative rod bacteria in their farms. In this experiment, the Gram negative rod bacteria were isolated from Nile tilapia farms and its antibiotic resistance profiles were determined. The results found that the highest resistant level was obtained from Erythromycin and Cefoxitin.

Keywords : Antibiotic , Bacteria , Drug resistance , Nile tilapia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือดูแลเอาใจใส่อย่างดียิ่งของ ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขโครงการ ให้ข้อเสนอแนะ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วรภฤต วรนนท์กิจ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ซึ่งรับเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ในการตรวจสอบโครงการพิเศษนี้ พร้อมทั้งได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาที่ได้อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ขอขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับบิดามารดา และครอบครัวของผู้วิจัย ที่คอยเป็นกำลังใจ และคอยสนับสนุนในทุกๆด้านเป็นอย่างดีมาโดยตลอด คุณค่าและประโยชน์ที่พึงมีจากโครงการพิเศษฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กนกวรรณ

ล่องลอย

นพิษฐา

บาริศรี

นันทพัชร

มันสวาทะไพบุลย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ปลานิล.....	3
2.1.1 ความเป็นมาของปลานิล.....	3
2.1.2 รูปร่าง อุปนิสัย และการสืบพันธุ์ของปลานิล.....	3
2.2 การเพาะพันธุ์ปลานิล.....	4
2.2.1 การเตรียมบ่อ.....	4
2.2.2 การคัดเลือกพ่อแม่ปลานิล.....	4
2.2.3 อัตราส่วนที่ปล่อยพ่อแม่ปลาลงบ่อเพาะพันธุ์.....	4
2.2.4 การให้อาหารและปุ๋ยระหว่างเพาะพันธุ์.....	5
2.2.5 การอนุบาลลูกปลานิล.....	5
2.3 โรคปลานิล.....	5
2.3.1 ปรสิต.....	5
2.3.2 เชื้อรา.....	6
2.3.3 ไวรัส.....	6
2.3.4 แบคทีเรีย.....	6
2.4 ยาปฏิชีวนะ.....	8
2.4.1 ชนิดของยาปฏิชีวนะและกลไกการออกฤทธิ์.....	8
2.5 การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่อนุญาติให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
 2.5.1 กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ..... 11

ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย.....	13
2.6.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test).....	13
2.7 การทดสอบความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ.....	14
2.7.1 Dilution Method.....	15
2.7.2 Diffusion Method.....	16
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	18
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	19
3.3 แผ่นยาปฏิชีวนะ (Antibiotic disc).....	20
3.4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์.....	20
3.5 การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain).....	20
3.6 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	21
3.6.1 ทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล (TSI test).....	21
3.6.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test).....	21
3.6.3 ทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test).....	21
3.6.4 การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย.....	22
3.7 การทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Resistant test).....	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเรียงตัว การติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	23
4.2 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical activity).....	26
4.2.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย.....	26
4.2.2 การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย.....	30
4.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Catalase.....	31
4.2.4 การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย.....	33
4.3 การทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	38
เอกสารอ้างอิง.....	39
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	46
ภาคผนวก ข การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย.....	49
ภาคผนวก ค เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	51
ภาคผนวก ง ตารางแสดงลำดับใน Stock และสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย.....	61



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเรียงตัวและการติดสี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	23
4.2 แสดงความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล จากตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล.....	26
4.3 แสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก ฟาร์มเลี้ยงปลานิลในอาหาร Motility Medium.....	29
4.4 แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรีย ที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล.....	31
4.5 แสดงผลการทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล.....	33
4.6 แสดงการทดสอบการต่ออายุปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้จากฟาร์ม เลี้ยงปลานิล.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นสัตว์น้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ เนื่องจากปลานิลเป็นอาหารโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว นิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลาย และมีการส่งออกมากเป็นอันดับ 1 ของประเทศ (กรมประมง, 2556) ประเทศไทยเราผลิตปลานิลได้เป็นอันดับที่ 5 ของโลก คือ ปีละประมาณ 240,000 ตัน/ปี โดยผลผลิตกว่าร้อยละ 90 ใช้บริโภคภายในประเทศ และร้อยละ 10 ส่งออกไปยังต่างประเทศ (ประพันธ์ศักดิ์, 2556) ทั้งนี้สาเหตุที่ปลานิลไทยไม่ได้รับความนิยมหรือยังมีร้อยละของการส่งออกเพียงร้อยละ 10 เป็นเพราะปลานิลเป็นปลาที่มีกลิ่นโคลนซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (Off Flavor) ของชาวยุโรป จากการรายงานของนิลบลและคณะ (2545) พบว่าตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา การเลี้ยงปลานิลในกระชังทุกพื้นที่ประสบปัญหาการระบาดของโรค ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรอย่างมาก หากไม่มีการควบคุมโรคสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงไว้ก็จะได้รับความเสียหาย อุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลในบางพื้นที่ของประเทศไทยพบว่า โรคระบาดที่เกิดขึ้นกับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลของไทยตอนนี้คือ โรคระบาดที่เกิดขึ้นจากเชื้อแบคทีเรีย (ประพันธ์ศักดิ์, 2556) จึงเป็นเหตุให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในปลามากยิ่งขึ้น ปัจจุบันการใช้สารปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพเพื่อเร่งการเจริญเติบโตและควบคุมเชื้อเป็นวิธีการที่ได้ผลดีโดยยาที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำ คือ Ampicillin Tetracycline และ Sulfonamides (วิษณุ, 2560) แต่การใช้ชนิดของยาปฏิชีวนะและปริมาณยาที่ไม่ถูกต้องเหมาะสมอาจทำให้การควบคุมโรคไม่ได้ผล เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาและการตกค้างไปสู่ผู้บริโภค (สุปราณี, 2545) ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมกำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและกลายเป็นสัญญาณอันตรายและสร้างความกังวลใจอย่างมากทั่วโลก การที่แบคทีเรียด้านทานต่อยาปฏิชีวนะเป็นผลมาจากแบคทีเรียเหล่านี้ได้รับยาปฏิชีวนะที่หลากหลายหลาย ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาตัวเองไปเป็นแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะนั้นๆ (Pathak and Gopal, 2005) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

2) เพื่อตรวจสอบรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลที่เจริญบนอาหารแห้ง และศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงการจัดจำแนกเชื้อเบื้องต้นโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์บอนไดออกไซด์ ความสามารถในการเคลื่อนที่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียและสุดท้ายศึกษารูปแบบการโตของเชื้อ โดยใช้วิธี Disc diffusion

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงแบคทีเรียที่ดีต่อสุขภาพที่มาจากฟาร์มเลี้ยงปลานิล
- 2) ทราบถึงรูปแบบการโตของเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มเลี้ยงปลานิลซึ่งอาจจะใช้เป็นแนวทางการป้องกันและแก้ปัญหาของการเลี้ยงปลานิลได้ในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย โดยพบว่าในปี 2556 ปลานิลรวมถึงปลาที่บดเป็นสัตว์น้ำจืดที่ผลิตได้มากที่สุดถึง 197,595 ตัน หรือร้อยละ 44.34 ของปริมาณการผลิตทั้งหมด คิดเป็นมูลค่า 9,784.9 ล้านบาท (กรมประมง, 2556) โดยปลานิลเป็นปลาที่มีรสชาติดีและนิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางในประเทศไทยแต่ยังไม่ได้รับความนิยมในต่างประเทศเป็นเพราะปลานิลเป็นปลาที่มีกลิ่นโคลนซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (Off Flavor) ของชาวยุโรป (ประพันธ์ศักดิ์, 2556)

2.1.1 ความเป็นมาของปลานิล

ปลานิลได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระอริยวงศาคตญาณสมเด็จพระสังฆราชเจ้าพรหมมุนี เจ้าคณะภาค 9 เสนาบดีกรมมหาดไทย จำนวน 50 ตัว มาจากเมืองกัวลาลัมเปอร์ ภายใต้อาณัติของสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวอานันทมหิดล เมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 ในระยะแรกได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดินเนื้อที่ประมาณ 10 ตารางเมตร บริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต เมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2509 จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลานิลนี้ว่า "ปลานิล" และได้พระราชทานปลานิลจำนวน 10,000 ตัว ให้แก่ กรมประมงนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ ที่แผนกทดลองและเพาะเลี้ยงภายในบริเวณเกษตรกลางบางเขน และที่สถานีประมงต่าง ๆ ทั้งพระราชอาณาจักร รวม 15 แห่ง เพื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ แจกจ่ายให้แก่ราษฎรนำไปเพาะเลี้ยงตามความต้องการต่อไป (นฤชยา, 2553)

2.1.2 รูปร่าง อุปนิสัย และการสืบพันธุ์ของปลานิล

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา มีรูปร่างลักษณะโดยทั่วไปมีดังนี้ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางมีเกล็ดสีเข้ม ที่กระดุกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่งบริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำตัวขวางดูคล้ายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป (นฤชยา, 2553) ปกติแล้วปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ ปลานิลเพศผู้จะแยกออกจากฝูงไปสร้างรัง โดยปลาจะเลือกบริเวณเชิงลาดหรือก้นบ่อที่มีระดับน้ำลึกระหว่าง 0.5-1.0 เมตร พอปลาจะหวนอาณาเขตโดยจะไล่ปลาอื่นให้ออกจากบริเวณนั้น และแสดงพฤติกรรมเกี่ยวกับ

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นเอกสารอ้างอิงเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาเพศเมีย เมื่อเลือกปลาเพศเมียได้ถูกใจแล้วจะแสดงอาการจับคู่กันโดยใช้หางตีและกัดกันเบาๆ และเริ่มการผสมพันธุ์วางไข่โดยปลาเพศผู้ใช้บริเวณหน้าผากดันที่ใต้ท้องปลาเพศเมียเพื่อกระตุ้นให้วางไข่ เมื่อแม่ปลาวางไข่แต่ละครั้งพ่อปลาจะว่ายน้ำไปเหนือไข่พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อลงไปผสมกับไข่ จากนั้นแม่ปลาจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไว้ในปาก โดยจะทำเช่นนั้นจนกว่าการผสมพันธุ์แล้วเสร็จ แม่ปลาจะว่ายน้ำออกจากรังและพ่อปลาจะคอยหาโอกาสเลือกปลาเพศเมียตัวอื่นต่อไป (กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, 2556)

2.2 การเพาะพันธุ์ปลานิล

การเพาะพันธุ์ปลานิล เป็นการเพาะพันธุ์แบบกึ่งควบคุมธรรมชาติโดยจะมีการเลี้ยงใน บ่อดิน บ่อปูนและกระชัง โดยมีวิธีการตามลำดับดังนี้

2.2.1 การเตรียมบ่อ

บ่อเพาะพันธุ์ปลานิลควรเป็นบ่อดินรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นที่ตั้งแต่ 50 – 1,600 ตารางเมตร เก็บน้ำได้ในระดับความลึกเฉลี่ย 1 เมตร มีขนาดกว้าง 1 – 2 เมตร ถ้าเป็นบ่อเก่าควรวิดน้ำและกำจัดศัตรูปลา โรยปูนขาวให้ทั่วบ่อ 1 กิโลกรัม ต่อพื้นที่บ่อ 1 ตารางเมตร ใส่ปุ๋ยคอกแห้ง 300 กิโลกรัมต่อไร่ ตากบ่อทิ้งไว้ประมาณ 2 – 3 วัน จึงปล่อยน้ำเข้าบ่อผ่านฝ้ายกรอง หรือตะแกรงตาถี่ให้มีระดับความลึกประมาณ 1 เมตร (นฤชยา, 2553)

2.2.2 การคัดเลือกพ่อแม่ปลานิล

พ่อแม่ปลานิลสามารถคัดเลือกได้โดยตรงจากปลาในบ่อเลี้ยงขุนเพื่อส่งตลาด คัดเลือกโดยสังเกตจากลักษณะภายนอกของปลาที่สมบูรณ์ ไม่มีบาดแผล แม่ปลาที่พร้อมวางไข่อวัยวะเพศจะมีสีชมพูแดงส่วนพ่อปลาสีบนลำตัว และบริเวณครีบเข็มสดใสมากกว่าปกติ ขนาดของพ่อแม่ปลาที่เหมาะสมมีขนาดยาวตั้งแต่ 15 – 25 เซนติเมตร น้ำหนัก 150 – 200 กรัม (นฤชยา, 2553)

2.2.3 อัตราส่วนที่ปล่อยพ่อแม่ปลาลงบ่อเพาะพันธุ์

ปริมาณพ่อแม่ปลาที่จะนำไปปล่อยในบ่อเพาะ 1 ตัว / 4 ตารางเมตร หรือไร่ละ 400 ตัว ควรปล่อยในอัตราส่วนพ่อปลา 1 ตัว แม่ปลา 2 ตัว การเพาะปลานิลแต่ละรุ่นใช้เวลาประมาณ 2 เดือน จึงเปลี่ยนพ่อแม่ปลาชุดใหม่ (นฤชยา, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การให้อาหารและปุ๋ยระหว่างเพาะพันธุ์

ให้อาหารสมทบซึ่งมีส่วนผสมของ ปลาขี้ขาว สาหร่าย หรือพืชผัก รำละเอียด ในอัตราส่วน 1 : 2 : 3 โดยให้ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของ น้ำหนักตัว วันละ 1 ครั้ง ส่วนปุ๋ยคอกแห้ง ต้องใส่ในอัตราส่วนประมาณ 100–200 กิโลกรัมต่อไร่ต่อเดือน เพื่อให้เกิดแพลงก์ตอน (Plankton) หรือพืชน้ำ ไร่น้ำขนาดเล็ก อันเป็นประโยชน์ต่อลูกปลานิลวัยอ่อนก่อนย้ายลงในบ่ออนุบาล (นฤชยา, 2553)

2.2.5 การอนุบาลลูกปลานิล

ทำโดยรวบรวมลูกปลานิลจากบ่อเพาะพันธุ์ภายหลังการปล่อยพ่อแม่ปลาครั้งแรก ประมาณ 3 – 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นรวบรวมลูกปลา 2 – 3 สัปดาห์ต่อครั้ง โดยใช้วนหรือตะแกรง ตาถี่รวบรวมปล่อยในบ่ออนุบาลซึ่งมีพื้นที่ประมาณ 200 ตารางเมตร ระดับน้ำลึก 1 เมตร บ่ออนุบาลดังกล่าวลูกปลาขนาด 1 – 2 เซนติเมตร ได้ครั้งละ 50,000 ตัว ให้อาหารสมทบ เช่น รำละเอียด กากถั่ว วันละ 2 ครั้ง จนลูกปลามีขนาด 3 – 5 เซนติเมตร จึงจับปลาลงบ่อเลี้ยงหรือขายต่อไป (นฤชยา, 2553)

2.3 โรคปลานิล

2.3.1 ปรสิต

ปรสิตพบได้ทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณเหงือกและผิวหนัง ปลาจะมีเมือกมากผิดปกติ เพื่อพยายามจะกำจัดปรสิตให้หลุดออกไป อาจสังเกตเห็นแผลตามลำตัว ปรสิตบางชนิด ก่อให้เกิดจุดขาวๆ บนลำตัว สีของลำตัวปลาที่มีปรสิตเกาะอาจจะซีดหรือเข้มผิดปกติ วัยน้ำทึบทราย ทำให้ปลากระคายเคือง น้ำหนักลด ตัวอย่างของปรสิตที่พบในปลานิล ได้แก่

2.3.1.1 เห็บระฆัง (*Trichodina* sp.)

มีลักษณะคล้ายระฆังคว่ำ มีขนาดเล็ก ๆ รอบตัว (cilia) บริเวณผิวหนังด้านล่างมีอวัยวะยึดเกาะตัวปลาคล้ายกงจักร ปรสิตนี้พบในเหงือกและผิวหนังปลานิลเกือบทุกตัว ปลาที่มีปรสิตพวกนี้เกาะมาก ๆ จะไม่ค่อยกินอาหาร วัยน้ำกระวนกระวาย พลิกตัวไปมา มีการใช้ลำตัวสีผนังบ่อเพื่อให้ปรสิตหลุดออกและอาจทำให้ลูกปลาตายในปริมาณมากได้ พบระบาดในบ่อที่มีการเลี้ยงปลาหนาแน่นสูงและมีสารอินทรีย์สูง การป้องกันดีกว่ารักษาเพราะปรสิตนี้แพร่ได้รวดเร็ว การป้องกันทำโดยตรวจปลาก่อนที่จะนำมาเลี้ยง หากปลาที่มีปรสิตติดมาต้องกำจัดโดยการใส่ฟอร์มาลิน 25-50 ซีซี ต่อน้ำ 1,000 ลิตร (ชนกันต์, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.2 ปลิงใส (monogenes)

ส่วนใหญ่พบเกาะอยู่ตามซีเหงือกและบริเวณผิวหนัง ที่พบบ่อยในปลาน้ำจืด คือ ไจโรแดคทิลัส (*Gyrodactylus* sp.) และแดคทีโรไจรัส (*Dactyrogyrus* sp.) ส่วนปลิงใสที่มักพบในปลานิล ชื่อว่าซิคลิโดไจรัส (*Cichlidogyrus* sp.) ปลาที่มีปรสิตพวกนี้เกาะอาจจะมีสีตัวเข้มกว่าปกติ กินอาหารน้อยลง หากมีเกาะบริเวณซีเหงือกในปริมาณมาก ทำให้เหงือกบวม อักเสบและการแลกเปลี่ยนอากาศของปลาลดลง มีผลให้ปลาตายได้เช่นกัน พบปรสิตกลุ่มนี้ในปลาเกือบทุกชนิด วิธีการรักษาเช่นเดียวกับเห็บประมง คือ ใช้ฟอร์มาลิน 25-50 ซีซีต่อน้ำ 1,000 ลิตร (ชนกันต์, 2556)

2.3.2 เชื้อรา

เชื้อราที่พบเป็นกลุ่ม *Achly* sp. หรือ *Saprolegnia* sp. โดยพบสปอร์ของเชื้อราอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำ ส่วนใหญ่จะติดเชื้อในไซที่มีการฟักที่ไม่ดีมักเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อน (secondary infection) คือมีปรสิตภายนอกหรือเชื้อแบคทีเรียเช่น *Aeromonas* sp. เข้าทำอันตรายผิวหนังปลา ก่อน (สุดาและคณะ, 2554) หรือเมื่อปลาเกิดบาดแผลจากการจับและบอบช้ำจากการขนส่ง เชื้อราสามารถที่จะไปเจริญบนบาดแผลดังกล่าว ทำให้เห็นเป็นปุยสีขาวหรือสีน้ำตาลปรากฏอยู่สารเคมีใช้ในการรักษา คือฟอร์มาลินและด่างทับทิมเนื่องจากส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อจะเกิดขึ้นมาจากสาเหตุอื่นเหนี่ยวนำมาก่อน ดังนั้นควรตรวจหาสาเหตุเบื้องต้นว่า ทำไมปลาจึงติดเชื้อราเพื่อจะได้แก้ไขที่ต้นเหตุ (ชนกันต์, 2556)

2.3.3 ไวรัส

สำหรับปลานิลในประเทศไทยมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อไวรัสที่มีลักษณะคล้ายรีโอไวรัส (Reo-like virus) จากปลานิลที่ตายด้วยโรคระบาดโดยสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืดในช่วงปี พ.ศ. 2551 ปลานิลป่วยจะมีอาการซึมมีจุดเลือดตามลำตัวเหงือกและตับมีสีซีดลง อย่างไรก็ตามปลานิลที่ติดเชื้อไวรัสนี้มักมีการติดเชื้อแบคทีเรียและปรสิตร่วมด้วยจึงทำให้ปลาที่ป่วยมีอัตราการตายสูง (สุดาและคณะ, 2554)

2.3.4 แบคทีเรีย

2.3.4.1 โรคติดเชื้อจาก *Aeromonas hydrophila*

เป็นโรคที่มีก่อให้เกิดความเสียหาย ทางเศรษฐกิจมากในการเลี้ยงปลาทุกปลานิล กบและปลาน้ำจืดอื่น ๆ ซึ่งพบบ่อยในบ่อเลี้ยงโดยให้อาหารสด เชื้อตัวนี้จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำอยู่แล้วโดยเฉพาะแหล่งที่มีสารอินทรีย์ปริมาณสูง ความเครียดไม่ว่าจะเป็นการขนส่ง การเคลื่อนย้ายปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารที่ไม่ดีและการมีปรสิตเกาะเยอะ ๆ ล้วนแต่เป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ ปลาติดเชื้อจะว่ายน้ำเฉื่อยช้า ไม่กินอาหาร ครีบกร่อน มีการตกเลือดไม่ช้าก็เร็ว ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดบาดแผลเป็นหลุมลึกท้องบวม ตับเหลือง มีการตกเลือดบริเวณลำไส้ (ชนกันต์, 2556) เชื้อ *Aeromonas hydrophila* สามารถติดต่อกันได้โดยทำให้เกิดอาการต่างๆ ในคนได้แก่ เซลล์เนื้อเยื่ออักเสบ (cellulitis) และ ecthyma gangrenosum (ชาญณรงค์, 2552)

2.3.4.2 โรค Columnaris

เกิดจากเชื้อ *Flexibacter columnaris* ปลาจะติดเชื้อง่ายเมื่อเกิดจากการขนส่งโดยเฉพาะในช่วงหน้าร้อน และช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงอากาศกะทันหัน ปลาจะมีตัวสีต่างๆ ซีดเป็นแถบ ๆ มีเมือกมากผิดปกติครีบกร่อน เหงือกกร่อน และอาจมีการสร้างสารสีเหลืองเกิดขึ้นบริเวณบาดแผล (ชนกันต์, 2556)

2.3.4.3 โรค Streptococcosis

เกิดจากเชื้อ *Streptococcus iniae* หรือ *Streptococcus agalactiae* เป็นอาการของโรคจากการที่มีภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด ส่วนใหญ่จะพบอาการของระบบประสาท (central nervous system) เนื่องจากเป็นบริเวณที่เชื้อเข้าไปรุกราน โดยส่วนใหญ่อาการเฉียบพลัน (Acute) ของการติดเชื้อในกระแสเลือดได้แก่ การมีจุดหรือปื้นเลือดออกที่ครีบต่าง ๆ ผิวหนัง และบางครั้งอาจพบแผลหลุม สามารถทำให้ปลาตายจำนวนมากในเวลาอันสั้นหากมีการติดเชื้อรุนแรง มีรายงานว่า *Streptococcus* spp. สามารถติดต่อไปถึงคนได้ โดยในคนจะพบอาการเซลล์เนื้อเยื่ออักเสบ (cellulitis) ที่มือ และในกรณีที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดจะพบลักษณะเยื่อหัวใจอักเสบ (endocarditis) ได้ (ชาญณรงค์, 2552) เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลส่วนใหญ่มักประสบปัญหาการตายของปลาที่รุนแรงในปลาขนาดใหญ่อายุตั้งแต่ 3 – 4 เดือน หรือขนาดตั้งแต่ 200 – 800 กรัม ซึ่งการตายของปลามักจะเกิดในช่วงหน้าร้อนไปจนถึงต้นฤดูฝน นับตั้งแต่เดือนกรกฎาคมของทุกปีลักษณะอาการของปลาที่เริ่มแสดงความผิดปกติจะกินอาหารน้อยลง เมื่อเวลาผ่านไป 3-4 วัน ปลาบางส่วนจะเริ่มว่ายน้ำเชื่องช้าที่ผิวน้ำ ลำตัวอาจมีสีคล้ำหรือมีบาดแผลตามผิวน้ำ ท้องบวม น้ำ บางตัวแสดงตาโปนหรือตาขุ่นออกมา บางครั้งจะพบร่วมกับการว่ายน้ำแบบสว่านไร้ทิศทางที่บริเวณผิวน้ำ จากนั้นจะเริ่มทยอยตาย เมื่อนำไปตรวจวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการพบว่าได้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีสีขาวครีม ขอบเรียบ จำนวนมากเมื่อนำแบคทีเรียไปทำการย้อมแกรมพบว่าแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ในอาหารทดสอบ เมื่อเลี้ยงใน Blood agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่ามีความสัมพันธ์ตรงกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. นอกจากนี้ภายหลังยังทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะแล้วพบว่าเชื้อมีความไวต่อยา Enrofloxacin Oxytetracycline Salfamethoxazole และยาอื่นอีกหลายชนิด เกษตรกรส่วนใหญ่พยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิดแต่ไม่สามารถหยุดยั้งการตายของปลานิลได้ โดยปลายังแสดงอาการตายต่อเนื่องและรุนแรงจนเกษตรกรประสบภาวะขาดทุนอย่างหนัก อย่างไรก็ตามในปี 2551 ไม่มีการณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุการณ์ปลาตายอย่างหนักได้ เกิดขึ้นเช่นเดียวกับปีที่ผ่านมาแต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การตายของปลา จะแสดงอาการของของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus* spp. น้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาการตา โปนหรือตาขาวขุ่น แต่กลับพบว่าปลาที่ป่วยส่วนใหญ่จะมีบาดแผลเป็นวงต่างตามผิวหนัง ลำตัว ท้อง ครีบหาง ครีบหู และครีบท้อง บางรายพบแผล หลุมลึกเข้าไปในชั้นกล้ามเนื้อ เมื่อตรวจสอบปรสิต ภายนอก พบเชื้อแบคทีเรียท่อนยาวอยู่เป็นกลุ่มใหญ่ เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และยังพบ ปลิงใส เห็บ ระฆัง หนอนสมอหรือบางครั้งมีการระบาดร่วมกับสัตว์ในกลุ่มเห็บปลา (Isopod) โดยเฉพาะบริเวณ เหงือก ลำตัว ซึ่งสามารถพบอาการดังกล่าวได้ อย่างกว้างขวางในทุกพื้นที่ของประเทศ รวมถึงพื้นที่ การเลี้ยงของประเทศใกล้เคียง เช่น ประเทศลาวบริเวณแม่น้ำโขงและแม่น้ำจิม ซึ่งขณะนี้โรคดังกล่าว กำลังอยู่ระหว่างการตรวจหาสาเหตุที่แน่ชัดในห้องปฏิบัติการ (ประพันธ์ศักดิ์และนนทวิทย์, 2552)

2.4 ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) คือสารประกอบเคมีที่ผลิตขึ้นหรือสร้างขึ้นโดยจุลชีพชนิดใดชนิด หนึ่ง ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งหรือขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลชีพอีกกลุ่มหนึ่ง หรือมีฤทธิ์ไปทำลายจุลชีพอื่น (วุฒินันท์, 2549)

2.4.1 ชนิดของยาปฏิชีวนะและกลไกการออกฤทธิ์

ชนิดของยาปฏิชีวนะที่ถูกค้นพบมีอยู่หลายร้อยชนิดและกำลังถูกนำมาใช้ในการรักษา โรคติดเชื้อในปัจจุบันหากแบ่งตามสูตรโครงสร้างทางเคมีของยา (Classification on chemical structure) จำแนกได้เป็น 9 กลุ่มหลัก ดังนี้ (จารุวรรณ, 2560)

2.4.1.1 กลุ่มยาเพนิซิลลิน(Penicillins)

เป็นยาปฏิชีวนะที่สกัดได้จากเชื้อรา *Penicillium* spp. ตัวอย่างของ ยากลุ่ม นี้ได้แก่ PenicillinV Ampicillin และ Amoxicillin เป็นต้น โดยตัวยายับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรีย โดยจะเข้าไปยับยั้งการสร้างสาร peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ทำให้การสร้างผนังเซลล์ในแบคทีเรียหยุดชะงัก ไม่สามารถเจริญเติบโตหรือแพร่พันธุ์ได้และทำให้ แบคทีเรียตายลงในที่สุด (อภัย, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.2 กลุ่มเซฟาโลสปอริน (Cephalosporins)

ยาในกลุ่มนี้ มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเพนิซิลลินแต่ยาในกลุ่มนี้สามารถทนต่อเอนไซม์เพนิซิลลินเนสที่เชื้อสร้างขึ้นได้ โดยตัวยายจะรบกวนการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ในแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ยาในกลุ่มนี้นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ต่ออายุเพนิซิลลิน (อภิย, 2557)

2.4.1.3 กลุ่มเตตราซัยคลิน (Tetracyclines)

เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างขวาง ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Tetracycline และ Doxycycline เป็นต้น ตัวยายจะออกฤทธิ์ต่อวงจรในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียขยายพันธุ์ไม่ได้ ขณะเดียวกันร่างกายก็จะขจัดเชื้อเหล่านั้นลงเอง จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (อภิย, 2557)

2.4.1.4 กลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ (Aminoglycosides)

เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างขวาง ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Streptomycin Kanamycin Neomycin และ Gentamicin ตัวยายจะออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของสารพันธุกรรมในแบคทีเรียที่เรียกว่า อาร์เอ็นเอ (RNA) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถจำลองหรือสร้างสารพันธุกรรมขึ้นมาใหม่ได้ จึงเป็นเหตุให้ตัวแบคทีเรียตายลงและหยุดการแพร่พันธุ์ในที่สุด (อภิย, 2557)

2.4.1.5 กลุ่มคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenecols)

เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด จะมีกลไกการออกฤทธิ์โดยการเข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นตัวตั้งต้นของสารพันธุกรรมที่เรียกว่า ไรโบโซม (Ribosome) นอกจากนี้ตัวยายังช่วยป้องกันการเชื่อมโยงของโปรตีนที่มีการสังเคราะห์ไว้แล้ว ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายลงในที่สุด (สุรเกียรติ, 2553)

2.4.1.6 กลุ่มมาโครไลด์ (Macrolides)

เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้มาจากเชื้อรา ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Erythromycin Lincomycin และ Spiramycin เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้ไม่ค่อยมีอาการเป็นพิษรุนแรงปรากฏ แต่ถ้าใช้ในขนาดที่เกิน 0.5 กรัม อาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงได้ (บุปผา, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวยาคจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียที่ตอบสนองกับยาในกลุ่มนี้ อีกทั้งยังยับยั้งการเปลี่ยนถ่ายและสลายการเชื่อมกันของสารพันธุกรรมชนิดที่เรียกว่า ไรโบโซม (Ribosome) ในตัวแบคทีเรีย (อกภัย, 2557)

2.4.1.7 กลุ่มโพลีเปปไทด์ (Polypeptide)

ที่ใช้อยู่จะมี 2 ตัว คือ Polymyxin B และ Colistins โดยตัวยาคจะยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ โดยจับกับ C₅₅-isoprenyl pyrophosphate ซึ่งเป็นตัวขนส่ง ในการส่ง polysaccharides peptidoglycans และ lipopolysaccharides ให้แก่ผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังรบกวนกระบวนการ dephosphorylation (การเอา phosphate group ออกจาก lipid carrier) และ recycling (การนำ lipid carrier กลับมาใช้ใหม่) ของ phospholipid cycle ซึ่งจะออกออกฤทธิ์ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Staphylocococcus sp.* (บุปผา, 2540)

2.4.1.8 กลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide)

ยาซัลฟาหรือเป็นกลุ่มยาที่มีชื่อเรียกอย่างเป็นทางการว่า ซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide) ถูกสังเคราะห์เพื่อนำมากำจัดเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial agent) และนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น เบาหวาน ยาขับปัสสาวะ และยารักษาโรคลมชัก เป็นต้น (อกภัย, 2557) ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะทำการสังเคราะห์กรดโฟลิกโดยตัวยาคจะแย่งจับกับเอนไซม์ dihydropteroic acid synthetase ทำให้การสังเคราะห์กรดโฟลิกไม่เกิดขึ้น (สุวณีและมาลัย, 2540)

2.4.1.9 กลุ่มควิโนโลน (Quinolones)

ยาในกลุ่มนี้ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น ตัวยาคจะออกฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาโมโนเมอร์ของ DNA gyrase ทำให้โครโมโซมของแบคทีเรียขดเล็กลงไม่ได้ ซึ่งมีความสำคัญในการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้เช่น Norfloxacin Ofloxacin และ Enoxacin เป็นต้น (สมศักดิ์, 2530)

2.5 การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อดื้อยา คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการพัฒนาตัวเองจนมีคุณสมบัติในการต่อต้านยาที่เราใช้ในการควบคุมเชื่อนั้นๆ ส่งผลให้ยาที่เราเคยใช้ได้ผลในการรักษาทำให้ใช้ไม่ได้ผลอีกต่อไป ยาด้านจุลชีพ และยาปฏิชีวนะเป็นยาที่มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ เช่น ไวรัส แบคทีเรียและเชื้อรา โดยมีทั้งสารสังเคราะห์ กึ่งสังเคราะห์ และสารที่ได้มาจากธรรมชาติที่ผลิตขึ้นโดยจุลชีพ โดยแบคทีเรียต่างชนิดกันจะไวต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน การนำยาด้านจุลชีพมาใช้ก่อให้เกิด

เอกสารปฏิชีวนะมากมายต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ ทำให้มนุษย์มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นอย่างมาก และทำให้สัตว์มีอายุยืนยาวขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมและใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่จำเป็นทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลให้การรักษาโรคต่างๆ ทำได้ยากขึ้น และอาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้

สวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare) ที่ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะก็ก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อต่อยามา (กมลสิริและคณะ, 2560) ในการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะให้คงอยู่ และเพิ่มจำนวนขึ้นจนกลายเป็นกลุ่มประชากรหลัก (canton and Ruiz-Garbajosa, 2011; Gullberg et al., 2011) ซึ่งสามารถถ่ายทอดการดื้อยານี้ผ่านทางพลาสมิดไปยังเชื้อแบคทีเรียอื่นที่อยู่ข้างเคียงได้ (Palmer et al., 2010; Djordjevic et al., 2013) นอกจากนี้ยังสามารถกระจายโดยทางตรงและทางอ้อมไปยังมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างถูกต้อง เหมาะสม และใช้เท่าที่จำเป็น จึงมีความสำคัญมากในการชะลอปัญหา (กมลสิริและคณะ, 2556)

2.5.1 กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ

2.5.1.1 กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพที่พบได้ทั่วไป

1. การสร้างเอนไซม์มาื่อยสลายยา (Enzymatic inhibition) เป็นกลไกที่พบมากที่สุด เกิดจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะ เช่น penicillinases beta - lactamases และ cephalosporinases เป็นต้น (วีระวรรณ, 2549)

2. การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ (Target alteration) ซึ่งยาปฏิชีวนะสามารถผ่านเข้าไปถึงผนังเซลล์เป้าหมายได้แต่ไม่สามารถจับกับเป้าหมายได้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของเป้าหมายทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (วีระวรรณ, 2549)

2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin binding protein (PBP) ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา Penicillins Cephalosporins หรือยาอื่นๆในกลุ่ม beta-lactam ในแบคทีเรีย เช่น Methicilin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* และ *Neisseria meningitides* เป็นต้น (Wright, 2005)

2.2 การที่เซลล์สร้างตัวรับเป้าหมายใหม่ที่มีลักษณะคล้ายกับเดิม ทำให้ยาไปจับ ตัวรับใหม่ทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปทำลายเซลล์ได้ เช่น โปรตีน Penicillin binding protein ชนิด 2a (PBP2a) ที่เชื่อมสายเปปติโดไกลแคน ในกรณี MRSA (วีระวรรณ, 2549)

3. การลดการนำยาเข้าเซลล์ของเชื้อก่อโรค (Decrease uptake)

แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปในเซลล์หรือมีการใช้ energy-requiring membrane efflux pump นำยาออกไป ตัวอย่างเช่น ยา imipenam จำเป็นต้องอาศัย porin เฉพาะในการที่จะเข้าเซลล์ได้เมื่อ *Pseudomonas aeruginosa* พัฒนาให้ไม่มี porin ชนิดก็จะสามารถดื้อต่อ imipenam ได้หรือใน *Salmonella typhi* มีการเพิ่ม expression ของยีนที่สร้าง multidrug efflux pump จึงทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดตามมา (Pidcock LJV et.al, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะในภายหลัง (Acquired resistance)

1. Chromosomal mediated resistance การเกิด gene mutation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ค่อนข้างยากและเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในทุกครั้งที่เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยส่วนใหญ่จะไม่เกี่ยวข้องกับยาด้านจุลชีพการดื้อยาในรูปแบบนี้มักจะมีอยู่จำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อที่ไวต่อยา นอกจากนี้เชื้อที่เกิดการดื้อยาในรูปแบบนี้มักจะอ่อนแอกว่าเชื้อที่ไวต่อยาจึงไม่ค่อยก่อให้เกิดปัญหามากนักยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาด้านจุลชีพทำลายเชื้อที่ไวต่อยาไปมาก เชื้อที่ดื้อต่อยาเหล่านี้ก็จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นและก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาตามมา การเกิด gene mutation ดังกล่าวอาจส่งผลให้เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อเซลล์หรือผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะในส่วนที่ยาไปออกฤทธิ์ทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้หรืออาจทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ต่างๆออกมาทำลายยา (ศิริลักษณ์, 2549)

2. Plasmid mediated resistance เป็นวิธีการสำคัญที่สุดที่ก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรคอย่างรวดเร็วและแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง สาเหตุของการดื้อยาแบบนี้เกิดจากการถ่ายทอด resistance plasmids (R-plasmids) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมในเซลล์ของแบคทีเรีย (extrachromosomal genetic elements) ที่บรรจุ resistance genes (R-genes) ของการดื้อยาไว้ การดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะทำให้เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดและสามารถถ่ายทอดได้ทั้งในสปีชีส์เดียวกันและข้ามสปีชีส์ นอกจากควบคุมการทนของเชื้อต่อยาด้านจุลชีพแล้ว plasmids ยังมีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของเชื้อก่อโรคตามสภาวะแวดล้อมต่างๆ เพื่อการอยู่รอด ควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ความสามารถในการก่อโรค ภาวะเมตาบอลิซึมและการทนต่อสารต่างๆ ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเชื้อก่อโรค plasmids ยังมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง (self-replication) การส่งผ่าน R-plasmids ไปยังเชื้อก่อโรคอื่นๆ ส่วนใหญ่อาศัยวิธีที่เรียกว่า conjugation ซึ่งเป็นวิธีการส่งผ่าน R-plasmids โดยตรงจากเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่มี R-plasmids ไปยังเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ไม่มี R-plasmids การส่งผ่าน R-plasmids โดยวิธีนี้จำเป็นต้องมี genes อีกชนิดหนึ่งเพิ่มเติมโดยจะเป็นตัวกำหนดให้มีการเริ่มต้นกระบวนการถ่ายทอดถ่ายทอด plasmids นอกจากนี้แล้วการส่งผ่าน R-plasmids ยังทำได้โดยวิธี transduction ซึ่งจำเป็นต้องอาศัย bacteriophage เป็นพาหะส่งผ่านไป (ศิริลักษณ์, 2549)

3. Transposon mediated resistance ซึ่งนอกจาก plasmids แล้ว ยังมี transposons ที่จัดเป็น extrachromosomal genetic elements อีกชนิดหนึ่งที่สามารถส่งผ่าน R-genes ได้ โดยเป็นการส่งผ่าน R-genes จาก plasmid หนึ่งไปยัง plasmid , chromosome หรือ bacteriophage อื่น ข้อแตกต่างจาก plasmids คือ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ transposons ขึ้นกับการแบ่งตัวของ chromosome , bacteriophage หรือ plasmid ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง โดยทั่วไปการส่งผ่าน transposons จากโครโมโซมของแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง ต้องมีการสอดแทรกของ transposons เข้าไปใน plasmids หรือ bacteriophage และอาศัยการ

เอกสารฉบับนี้เผยแพร่โดยกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ มีอยู่จุดประสงค์เพื่อเป็นเอกสารความรู้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งผ่าน plasmids หรือ bacteriophage อีกที่ อย่างไรก็ตามมีการค้นพบ transposons ที่ไม่จำเป็นต้องอาศัย plasmids หรือ bacteriophage เรียก transposons ชนิดนี้ว่า conjugative transposons ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ transposons ยังมีส่วนสำคัญอย่างมากต่อองค์ประกอบที่เป็นตัวกำหนดให้เกิดการดื้อยาหลายขนานใน R-plasmids (ศิริลักษณ์, 2549)

2.6 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียมีหลายสายพันธุ์ บางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ ในขณะที่เดียวกันก็มีแบคทีเรียบางชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ (พนัส, 2557) ซึ่งสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยจัดจำแนกตามพื้นฐานความเหมือนกันหรือความสัมพันธ์ของแบคทีเรีย จะต้องอาศัยลักษณะเฉพาะที่ปรากฏทั้งฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ลักษณะทางสรีระวิทยา ลักษณะภูมิคุ้มกันวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางชีวเคมี ลักษณะความสามารถในการทำให้เกิดโรค และลักษณะนิเวศวิทยา เป็นต้น โดยการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นสามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

2.6.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)

2.6.1.1 TSI test (Triple Sugar Iron Agar)

การทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร TSI test (Triple sugar iron agar) ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาล 3 ชนิดคือ กลูโคส 1 ส่วน แลคโตส 10 ส่วน ซูโครส 10 ส่วน และมีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้น ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการเพอร์เมนเตชันได้จะมีการเจริญเติบโตที่ก้นหลอดและถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลในกระบวนการออกซิเดชันได้ จะมีการเจริญเติบโตบนผิวเอียงของอาหาร แบคทีเรียที่สามารถใช้กลูโคสในกระบวนการเพอร์เมนเตชันได้เพียงชนิดเดียวจะทำให้เกิดกรดปริมาณน้อย จึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอดแค่นั้น ส่วนบริเวณผิวเอียงของอาหารจะมีสีน้ำตาลแดง แต่ถ้าแบคทีเรียใช้ แลคโตสและซูโครสได้ด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวเอียงของอาหารด้วย เพราะมีการเกิดชั้นปริมาณมากหากไม่มีการเปลี่ยนสีเลยแสดงว่าเชื้อมีการสร้างกรดแต่ไม่มากพอที่จะทำให้เปลี่ยนพีเอชของอาหารได้ และถ้ามีการสร้างก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาลฟองก๊าซจะแทรกอยู่ในอาหาร ทำให้อาหารแตกและมีช่องว่างเกิดขึ้นในอาหาร นอกจากนั้นอาหาร TSI ยังสามารถทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเป็นก๊าซที่ไม่มีสีแต่ในอาหาร TSI จะมีเฟอร์รัสซัลเฟตซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนซัลไฟด์และเกิดเป็นเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีลักษณะตะกอนสีดำ แบคทีเรียที่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะทำให้เกิดตะกอนสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ในอาหาร (ธีรชัย, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.2 Motility test

เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ เนื่องมาจากการที่เชื้อมีแฟลกเจลลา (flagella) เชื้อจะสามารถเคลื่อนที่ออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญและแบ่งตัวยังบริเวณนั้นต่อไป ดังนั้น ถ้าต้องการทดสอบเพื่อให้เห็นลักษณะการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหาร Motility medium ในการทดสอบ ถ้าสังเกตเห็นเชื้อเจริญอยู่นอกรอยเข็มที่แทงลงไป แสดงว่าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ (นันทนา, 2537)

2.6.1.3 Catalase test

เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสโดยปกติในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ ดังสมการ



ดังนั้น การทดสอบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้หรือไม่ทำได้โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วสังเกต ถ้าเกิดก๊าซจะให้ผลเป็นบวม แสดงว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (นันทนา, 2537)

2.7 การทดสอบความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ยาบางกลุ่มมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในวงกว้าง แต่ยาบางชนิดจะมีลักษณะจำเพาะในการยับยั้งเชื้อบางชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะก่อนนำไปใช้จริงหรือที่เรียกว่า Antimicrobial susceptibility test หรือ Disc diffusion test ซึ่งเป็นวิธีการทางคุณภาพ (qualitative test) โดยจะใช้ paper disc วางลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ใช้ไม้ปั่นสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื้อขึ้นมา swab ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร เพื่อทำการทดสอบหาเชื้อที่มีความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จากการวัดบริเวณใส (clear zone) หรือบริเวณที่ยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้น (zone of inhibition) วิธีนี้สามารถตรวจสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน ซึ่งขนาดของบริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยา ปริมาณเชื้อ และการเจริญของเชื้อบนอาหาร (Vorachit, 2006)

The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) เป็นบริษัทผู้ให้บริการในด้านมาตรฐานสุขอนามัยประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดวิธีการทดสอบความดื้อของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะเป็นวิธีมาตรฐานไว้โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ (รวมถึงเชื้อดื้อยาที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติเห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ปัญหา) อาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่มเพาะเชื้อ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตลอดจนการอ่านและแปลผล ดังนั้นห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามแบบแผนอย่างถูกต้องทุกขั้นตอน จึงจะทำให้ผลการทดสอบความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เชื่อถือได้และทำให้การอ่านและแปลผลได้ถูกต้อง (ประสาทร, 2551) ซึ่งวิธีการทดสอบความดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีหลายวิธี หากเชื่อที่ทดสอบเป็นแบบที่เรียสามารถทำได้ทั้งได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) และอาหารชนิดเหลว (broth medium) โดยมีวิธีหลักที่นิยมใช้ดังนี้ คือ

2.7.1 Dilution Method

เป็นการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นที่ต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาที่มีความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ มาทดสอบกับเชื้อ วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือการเจือจางยาในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution method) (ประสาทร, 2551)

2.7.1.1 Broth dilution method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพโดยเจือจางสารที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นต่างกัน ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำเชื้อจุลชีพเพาะเลี้ยงลงไป สังเกตการเจริญของเชื้อจุลชีพวิธีนี้ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) (ชลิตา, 2558)

2.7.1.2 Agar dilution method

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น โดยจะทดสอบในอาหารร่วน ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทำการทดสอบกับเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้ค่าความเข้มข้นของสารน้อยสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่า MIC (ประสาทร, 2551)

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) เป็นการทดสอบหาความไวของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ละเอียดวิธีหนึ่ง หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมียาปฏิชีวนะในปริมาณต่างกันผสมอยู่ และสังเกตการณ์เจริญของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ (อรพินและคณะ, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (Minimum bactericidal concentration, MBC) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด โดยยาด้านจุลชีพที่มีการออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อจะมีค่า MIC และ MBC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน (ประสาทร, 2551)

2.7.2 Diffusion Method

เป็นการทดสอบโดยทำให้ตัวยาจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจใช้แผ่นยาเป็นกระดาษกรอง หรือเป็นเม็ดยา หรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่ยาลงไป เพื่อให้ยาซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่มีความเข้มข้นต่ำ อ่านผลการทดสอบโดยดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (clear zone หรือ inhibition zone) วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของยาโดยตรงได้ แต่ก็เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก ทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (disc diffusion method) (ประสาทร, 2551)

2.7.2.1 Agar diffusion

การทดสอบโดยการให้สารต้านจุลชีพซึมเข้าไปในเนื้อวุ้นแล้วดูการยับยั้ง เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบน paper disc ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ โดยจะแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสารจะลดลง ทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่างๆกันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะที่จุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใดๆ ก็จะมีเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใสขึ้น อัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งผลการต้านจุลชีพสามารถวัดได้จากขนาดของวงใส (ชลิตา, 2558)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Miranda และคณะ.(2001) แบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะจากปลาเขตร้อนและปลาทะเลที่จับได้ในอ่าว Concepcion ในประเทศชิลี พบแบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากเหงือกและลำไส้ของปลาพบว่าทนต่อ Ampicillin Streptomycin และ Tetracycline สูงในขณะที่มีการติดต่อยา Chloramphenicol ค่อนข้างต่ำ สายพันธุ์แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในตระกูล Vibrionaceae และ Enterobacteriaceae ปลาในเขตร้อนจะมีการติดต่อยาปฏิชีวนะ 8-10 ชนิด ในขณะที่ปลาทะเลเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนักวาดเห็นาไปไซประเษยนดานการค้ำมีความต้านต่อ 7 ชนิดหรือน้อยกว่า ผลการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าปลาที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ของชิลีที่ไม่วางารณใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ใกล้กับการทิ้งขยะในเขตเมือง ซึ่งทำให้แบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะเกิดขึ้นทำให้เกิดการกระตุ้นความเสี่ยงต่อสุขภาพของประชาชนผู้บริโภคปลา

จากงานวิจัยของ Wamala และคณะ (2018) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของปลานิลและปลาดุกแอฟริกาในประเทศยูกันดา จากตัวอย่างปลาจำนวน 288 ตัว จากทั้งหมด 40 ฟาร์ม โดยมีการเลี้ยงในระบบนิเวศที่แตกต่างกัน คือ กระชัง ฟาร์ม และถังพลาสติก ซึ่งจะทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion สามารถคัดแยกแบคทีเรียจากปลาที่ติดเชื้อ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* (43.8%) *Aeromonas sobria* (20.8%) *Vibrio cholerae* (10.4%) *Streptococcus* spp. (6.3%) และ *Pseudomonas aeruginosa* (4.2%) จากผลการวิจัยพบเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ในปลานิลมากกว่าปลาดุกแอฟริกา และพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสรุปได้ว่า *Aeromonas* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีความไวต่อยา Sulphamethoxazole-trimethoprim Tetracycline และ Gentamycin และดื้อต่อยา Penicillin Ampicillin และ Erythromycin ได้ 100%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. กระบอกลดแทนเลสใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)
3. ปีกเกอร์ (Beaker)
4. แท่งแก้วคน (Stirring Rod)
5. ช้อนตักสาร (Spatula)
6. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
7. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Lamp)
9. หลอดทดลอง (Test Tube)
10. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
11. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
12. ปิเปต (Pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร
13. ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร
14. ลูกยาง (Rubber bulb)
15. จุกสำลี (Cork cotton)
16. ขวดฝาเกลียวใส่สาร (Media Storage Bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร
17. กระบอกดวง (Cylinder)
18. แผ่นสไลด์ (Slide)
19. กระดาษเช็ดเลนส์ (Lens Cleaning Paper)
20. ปากคีบ (Forceps)
21. หลอดหยด (Dropper)
22. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1000 ไมโครลิตร
23. ทิป (Tips) ขนาด 1000 ไมโครลิตร
24. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
25. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask)
26. คิวเวตต์ (Cuvette)
27. ไม้พันสำลี (Cotton Stick)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28. เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง
29. เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง
30. เครื่องผสมสาร (Vortex)
31. ไฟแช็ค (Lighter)
32. ถุงมือ (Medical gloves)
33. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)
34. เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper)
35. ตู้ป่นเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
36. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
37. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) 70 องศาเซลเซียส
38. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) 180 องศาเซลเซียส
39. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
40. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
41. ตู้เย็น (Refrigerator)
42. หม้อนึ่งแรงดันไอ (Autoclave)
43. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)
44. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Ethyl alcohol 70% v/v
2. Ethyl alcohol 95% v/v
3. Nutrient agar
4. Nutrient broth
5. Triple Sugar Iron agar
6. Motility medium
7. Hydrogen peroxide (H₂O₂) 3% w/v
8. Brain Heart Infusion Agar
9. Mueller Hinton Agar
10. Brilliant Green Lactose Bile broth
11. Agar
12. Glycerol 15% w/v

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. Barium chloride (BaCl_2) 1.175% w/v
15. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 1% v/v
16. Sodium chloride (NaCl) 0.85% w/v
17. Crystal violet
18. 0.5 McFarland standard
19. Gram Iodine
20. Safranin
21. Immersion oil

3.3 แผ่นยาปฏิชีวนะ (Antibiotic disc)

1. Ampicillin 10 μg
2. Cefoxitin 30 μg
3. Erythromycin 15 μg
4. Gentamicin 10 μg
5. Norfloxacin 10 μg
6. Sulphamethoxazole/Trimethoprim 25 μg

3.4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross Streak บนอาหาร Nutrient Agar บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นเชื้อบริสุทธิ์เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวที่สามารถมองได้ด้วยตาเปล่า จากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

3.5 การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain)

เตรียมเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross Streak ก่อนนำมาทดสอบ โดยจะต้องกระตุ้นเชื้อให้มีอายุ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นล้างสไลด์ให้สะอาดแล้วเช็ดสไลด์ให้แห้งด้วยผ้าก๊อช และหยดน้ำบริเวณกลางสไลด์ 1 หยดแล้วใช้หลอดเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดง ปลดรอยให้เย็นสักครู่ เชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเกลี่ยให้เป็นวงกลมกระจาย รอบจนกว่าหยดน้ำแห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเชื้อ นำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปหยดสีกคริสตัลไวโอเลตให้ทั่วรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น เมื่อล้างเสร็จก็นำสไลด์ไปหยด Gram Iodine ให้ทั่วรอยสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นชะด้วย Ethyl alcohol 95% โดยหยดลงไปข้างๆตามแนวราบ ประมาณ 5-10 วินาที จนกระทั่งไม่มีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าไม่เหมาะสมหรือต้องการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลงเหลืออีก แล้วย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น รอนสไลด์แห้ง จากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปศึกษาลักษณะการเรียงตัว การติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) และบันทึกภาพ

3.6 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.6.1 ทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล (TSI test)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวมา Cross Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเขี่ยนำไปเผาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น แล้วเขี่ยเขี่ยแทง (stab) ลงในอาหาร TSI ในส่วนของก้นหลอด (butt) ในลักษณะแนวตั้งตรงลึกประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของอาหารและขีดบนวันเอียง (slant) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ถ้าอาหารในส่วนของ Butt มีสีเหลือง แต่ส่วนของ slant มีสีแดง แสดงว่า เชื้อมีการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ถ้าอาหารมีสีเหลืองทั้งหลอด แสดงว่า เชื้อมีการหมักย่อยน้ำตาลมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป แต่ถ้าอาหารมีสีแดงเข้มทั้งหลอดแสดงว่าเชื้อสามารถใช้เปปโตินได้ และถ้ามีรอยแยกหรือการยกตัวขึ้นของอาหารแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างก๊าซได้ และถ้ามีตะกอนสีดำแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้โดยไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) จะทำปฏิกิริยากับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ได้เป็นเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)

3.6.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวมา Cross Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้หวงเขี่ยเขี่ยป้ายเชื้อโคโลนี ลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3% w/v สังเกตการเปลี่ยนแปลงว่าเกิดฟองแก๊สหรือไม่ ถ้าเชื้อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะได้ผลผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจนและน้ำ ซึ่งแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

3.6.3 ทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวมา Cross Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยนำไปเผาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น แล้วเขี่ยเขี่ย stab ลงในอาหาร Motility Medium โดยแทงลงประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของอาหาร นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าพบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียออกมานอกรอย stab แสดงว่าเชื้อมีการเคลื่อนที่ แต่ถ้าไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียออกจากรอย stab แสดงว่าเชื้อไม่มีการเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.4 การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวมา Cross Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Brilliant Green Lactose Bile broth ซึ่งเป็นทั้ง selective media และ differential media โดยจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก นำห้วงเชื้อเข้ามาเผาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็นแล้วเขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหาร Brilliant Green Lactose Bile broth (BGLB) ซึ่งในหลอดทดลองจะมีหลอดดักก๊าซ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลครั้งแรกเมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง โดยสังเกตจากความขุ่นก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดก๊าซจะสังเกตได้จากการแทนที่ของอากาศในหลอดดักแก๊ส ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้นำกลับไปที่บ่มต่อจนครบ 48 ชั่วโมง และอ่านผลเช่นเดียวกับครั้งแรก

3.7 การทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Resistant test)

การทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ ด้วยวิธี Disc diffusion ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำห้วงเชื้อเผาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น เขี่ยเชื้อลงในสารละลาย Normal saline solution 0.85% w/v ปรับความขุ่นให้เท่ากับ สารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland standard เมื่อปรับความขุ่นแล้วจึงใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อที่ต้องการทดสอบ ป้ายสารละลายให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร Mueller-Hinton agar plate (MHA) เมื่อป้ายจนทั่วผิวหน้าของอาหารแล้ว นำแผ่นยาปฏิชีวนะ ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Ampicillin Cefoxitin Erythromycin Gentamicin Norfloxacin และ Sulphamethoxazole มาวางบนผิวหน้าอาหาร โดยมีระยะห่างเท่าๆกันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แปลผลโดยการนำมาตรวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (zone of inhibition) โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้งและหาค่าเฉลี่ยของการยับยั้ง ในงานวิจัยนี้จะแปลผลโดยถ้าพบว่าเกิดโซนใสให้ถือว่าเชื้อไวต่อยาปฏิชีวนะและถ้าไม่เกิดโซนใสให้ถือว่าเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเรียงตัวและการติดสีภายใต้กล้อง





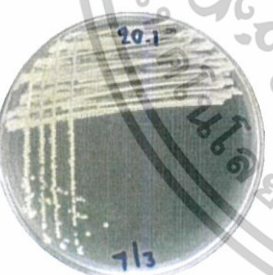

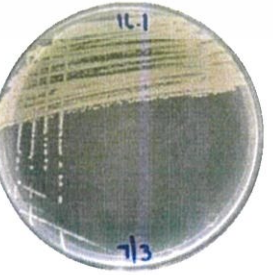
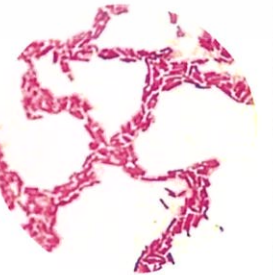
จุลทรรศน์

ผลการศึกษาเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลด้วยวิธี cross streak plate และ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ รูปร่างการเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรีย และการติดสี ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท โคโลนีมีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหัก เว้า สามารถแยกได้เป็น 4 กลุ่ม โดย กลุ่มที่ 1 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นทึบแสง มันวาว มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ APN-VII-R003 APN-IV-T004 (B) และ PPN-I-R005 กลุ่มที่ 2 มีลักษณะโคโลนีสีขาว โปร่งแสง มันวาว มีทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PPV-VI-R010 (61B) PSV-IV-T010 และ PSV-VI-R010 กลุ่มที่ 3 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองทึบแสง มันวาว มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ PSV-V-T004 กลุ่มที่ 4 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองโปร่งแสง มันวาว มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ APN-IV-T004 (A) และเมื่อทำการย้อมสีแกรม พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท ย้อมติดสีแดงของ safranin ซึ่งได้แก่ APN-VII-R003 PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PPV-VI-R010 (61B) PSV-IV-T010 PSV-V-T004 และ PSV-VI-R010 และมีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ย้อมติดสีม่วงของ crystal violet ได้แก่ APN-IV-T004 (A) APN-IV-T004 (B) และ PPN-I-R005 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

การย้อมสีแกรมสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ ซึ่ง การติดสีของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยและมีโครงสร้างซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้คริสตัลไวโอเลทจับกับผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้แน่น จึงกลายเป็น สารประกอบเชิงซ้อน (crystal violet-iodine complex) และไม่หลุดออกเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรีย ด้วยแอลกอฮอล์ ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกจึงไม่จับกับซาฟรานิน ทำให้เซลล์ยังคงติดสีม่วง และ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีไขมันที่ผนังเซลล์มากและมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าแบคทีเรีย แกรมบวก ไขมันจะถูกล้างออกมาด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุน สารประกอบเชิงซ้อนจึงหลุดออกมา ผนังเซลล์จึงติดสีแดงของซาฟรานินที่ย้อมทับได้ อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการติดสีของ เชื้อแบคทีเรีย เช่น อายุของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาย้อม ควรใช้เชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ถ้าใช้เชื้อที่ มีอายุมากอาจทำให้ผนังเซลล์สูญเสียความสามารถในการติดสีคริสตัลไวโอเลททำให้ติดสีแกรมลบ แทน (ปราโมทย์, 2545)

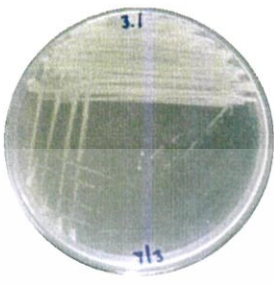
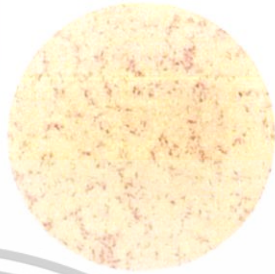




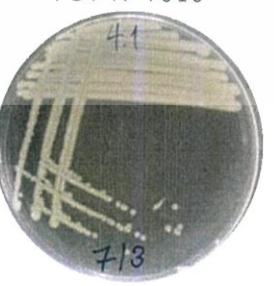
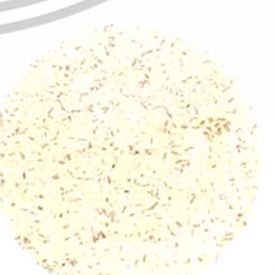
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ลักษณะการเรียงตัวและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย100X)	
<p>APN-VII-R003</p> 	<p>โคโลนีมีลักษณะทึบ แสง มันวาว สีขาวขุ่น มันวาว รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหัก เว้า</p>		<p>แกรมลบ รูปท่อนสั้น เรียงตัวกันแบบ เดี่ยวๆ</p>
<p>APN-IV-T004 (A)</p> 	<p>โคโลนีมีลักษณะโปร่ง แสง มันวาว สีเหลือง อ่อน รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหัก เว้า</p>		<p>แกรมบวก รูปท่อน สั้น เรียงตัวกันแบบ เดี่ยวๆ</p>
<p>APN-IV-T004 (B)</p> 	<p>โคโลนีมีลักษณะทึบ แสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบ เรียบ ไม่มีรอยหักเว้า</p>		<p>แกรมบวก รูปร่าง กลม เรียงตัวต่อกัน เป็นคู่</p>
<p>PPN-I-R005</p> 	<p>โคโลนีมีลักษณะทึบ แสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบ เรียบ ไม่มีรอยหักเว้า</p>		<p>แกรมบวก รูปท่อน ยาว เรียงตัวกันแบบ เดี่ยวๆ</p>


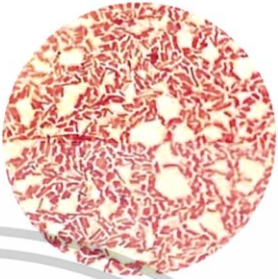
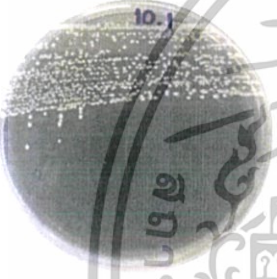

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ลักษณะการเรียงตัวและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลักษณะโคโลนีสบนอาหารแข็ง		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย100X)	
 <p>PPV-VI-R012</p>	โคโลนีมีลักษณะโปร่งแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหักเว้า		แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เรียงตัวกันแบบเดี่ยวๆ
 <p>PPV-VI-R010 (61)</p>	โคโลนีมีลักษณะโปร่งแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหักเว้า		แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เรียงตัวกันแบบเดี่ยวๆ
 <p>PPV-VI-R010 (61B)</p>	โคโลนีมีลักษณะโปร่งแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหักเว้า		แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เรียงตัวต่อกันเป็นสาย
 <p>PSV-IV-T010</p>	โคโลนีมีลักษณะโปร่งแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มีรอยหักเว้า		แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เรียงตัวกันแบบเดี่ยวๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ลักษณะการเรียงตัวและการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย100X)	
 <p>PSV-V-T004</p>	<p>โคโลนีมีลักษณะทึบ แสง มันวาว สีเหลือง อ่อน รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ ไม่มี รอยหักเว้า</p>		<p>แกรมลบ รูปท่อนสั้น เรียงตัวกันแบบเดี่ยวๆ</p>
 <p>PSV-VI-R010</p>	<p>โคโลนีมีลักษณะโปร่ง แสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลมมน ขอบ เรียบ ไม่มีรอยหักเว้า</p>		<p>แกรมลบ รูปท่อนสั้น เรียงตัวกันแบบเดี่ยวๆ</p>

4.2 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical activity)

4.2.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลทั้ง 10 ไชโยเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลโดยวิธี TSI test พบว่าเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 6 ไชโยเลท อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนกันหลอดมีลักษณะเปลี่ยนจากสีแดงอมส้มเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว ไม่สร้างก๊าซและไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งได้แก่ APN-IV-T004 (A) PPN-I-R005 PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PSV-V-T004 และ PSV-VI-R010 เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 2 ไชโยเลท อาหารส่วนกันหลอดมีลักษณะเปลี่ยนจากสีแดงอมส้มเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียวและมีการสร้างก๊าซ ซึ่งได้แก่ APN-VII-R003 และ PSV-IV-T010 เชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ไชโยเลท อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเปลี่ยนจากสีแดงอมส้มเป็นสีเหลืองทั้งส่วนวุ้นเอียงและกันหลอด เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตสและหรือซูโครส ไม่สร้างก๊าซและไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งได้แก่ APN-IV-T004 (B) และ PPV-VI-R010 (61B) โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า 10 ไชโยเลท มีการเจริญบนผิวหน้าอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส แลคโตส และซูโครส มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลโดยกระบวนการ fermentation ที่กั้นหลอดเป็นสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในส่วนวุ้นเอียงจะใช้กระบวนการ oxidative decarboxylation ซึ่งเป็นการใช้สารประกอบไนโตรเจนในอาหารทำให้เกิดสภาพเป็นด่าง อาหารในส่วนวุ้นเอียงจึงมีสีแดง ดังนั้นแบคทีเรียที่ใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวจะเกิดกรดปริมาณน้อย จึงเกิดสีเหลืองเฉพาะที่กั้นหลอด ส่วนวุ้นเอียงจะมีสีแดงเนื่องจากสภาพเป็นด่าง สำหรับแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาล แลคโตสและหรือซูโครสในส่วนของวุ้นเอียงและกั้นหลอดนั้นจะเกิดสีเหลือง เพราะเกิดกรดปริมาณมาก ถึงแม้จะเกิด oxidative demination ซึ่งให้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติทำให้อาหารสภาพเป็นด่าง ก็ไม่เพียงพอที่จะสามารถเปลี่ยน pH จึงทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรดจากการหมักน้ำตาลดังกล่าว ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุได้ว่ามีการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลแลคโตสและซูโครสทั้งสองชนิด และถ้าเกิดก๊าซ (CO₂, H₂) จากการใช้น้ำตาลจะมีฟองอากาศแทรกอยู่ในอาหาร บางครั้งถ้าก๊าซมากก็จะดันอาหารลอยขึ้นจากกั้นหลอด และถ้าเชื้อผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยจะเกิดสีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยเชื้อ ซึ่งมักจะเกิดที่กั้นหลอด (ดวงพร, 2537)

ตารางที่ 4.2 แสดงความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลจากตัวอย่างเชื้อ

สายพันธุ์	สีอาหาร		เกิด	เกิด	การแปลผล
	วุ้นเอียง (slant)	กั้นหลอด (Butt)	ก๊าซ	ไฮโดรเจนซัลไฟด์	
APN-VII-R003 	แดง	เหลือง	+	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง กั้นหลอดมีสีเหลือง มีการสร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
APN-IV-T004 (A) 	แดง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง กั้นหลอดมีสีเหลือง ไม่สร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์

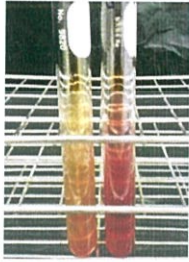



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลในการ
สร้างกรดจากการหมักน้ำตาลจากตัวอย่างเชื้อ

สายพันธุ์	สื่ออาหาร		เกิด ก๊าซ	เกิด ไฮโดรเจน ซัลไฟด์	การแปลผล
	วุ้นเอียง (slant)	กันหลอด (Butt)			
APN-IV-T004 (B) 	เหลือง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสแลคโตสและหรือซูโครสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงและกันหลอดมีสีเหลือง ไม่มีการสร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
PPN-I-R005 	แดง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง กันหลอดมีสีเหลือง ไม่สร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
PPV-VI-R012 	แดง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง กันหลอดมีสีเหลือง ไม่สร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
PPV-VI-R010 (61) 	แดง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง กันหลอดมีสีเหลือง ไม่สร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลในการ
สร้างกรดจากการหมักน้ำตาลจากตัวอย่างเชื้อ

สายพันธุ์	สื่ออาหาร		เกิด ก๊าซ	เกิด ไฮโดรเจน ซัลไฟด์	การแปลผล
	วุ้นเอียง (slant)	ก้นหลอด (Butt)			
PPV-VI-R010 (61B) 	เหลือง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสแลคโตสและหรือซูโครสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงและก้นหลอดมีสีเหลือง ไม่มีการสร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
PSV-IV-T010 	แดง	เหลือง	+	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง ก้นหลอดมีสีเหลือง มีการสร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
PSV-V-T004 	แดง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง ก้นหลอดมีสีเหลือง ไม่สร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์
PSV-VI-R010 	แดง	เหลือง	-	-	มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและสร้างกรด เนื่องจากบริเวณวุ้นเอียงมีสีแดง ก้นหลอดมีสีเหลือง ไม่สร้างก๊าซ และไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์

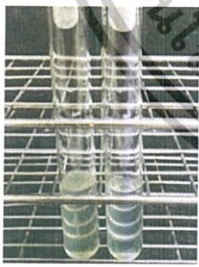


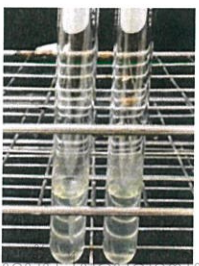
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิลทั้ง 10 ไอโซเลท ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว Motility medium พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลเป็นบวกซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้มีทั้งหมด 8 ไอโซเลท ได้แก่ APN-VII-R003 APN-IV-T004 (A) PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PPV-VI-R010 (61B) PSV-IV-T010 PSV-V-T004 และ PSV-VI-R010 และมีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลทที่ให้ผลเป็นลบซึ่งไม่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ APN-IV-T004 (B) และ PPN-I-R005 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

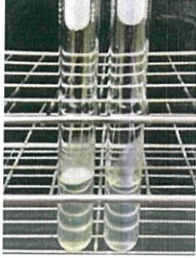
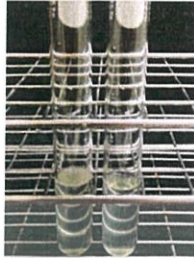




เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดมีแฟลกเจลลา (flagella) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยให้เชื้อมีคุณสมบัติสามารถเคลื่อนที่ได้ แบคทีเรียจึงสามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว จึงสังเกตการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียได้จากการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Motility Medium หากเชื้อแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่จะเห็นการแพร่กระจายของเชื้อออกห่างจากรอยแทงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่มีการเคลื่อนที่จะสังเกตเห็นได้วาร์อยแทงเชื้อ จะไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่นบริเวณที่มีรอยแทงเชื้อเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่อาจแสดงผลเป็นลบเทียม เนื่องจากเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ไม่ดีหรือแฟลกเจลลา อาจเกิดความเสียหายจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความร้อน เป็นต้น (กนกรัตน์, 2539)

ตารางที่ 4.3 แสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล ในอาหาร Motility Medium

สายพันธุ์	ผล	สายพันธุ์	ผล
APN-VII-R003 	+	APN-IV-T004 (A) 	+
APN-IV-T004 (B) 	-	PPN-I-R005 	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

สายพันธุ์	ผล	สายพันธุ์	ผล
PPV-VI-R012 	+	PPV-VI-R010 (61) 	+
PPV-VI-R010 (61B) 	+	PSV-IV-T010 	+
PSV-V-T004 	+	PSV-VI-R010 	+

หมายเหตุ : + คือ พบการเจริญของเชื้อออกนอกรอยแท่งเชื้อ
- คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อออกนอกรอยแท่งเชื้อ



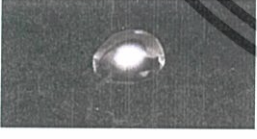
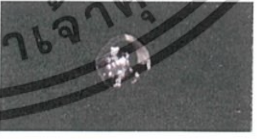

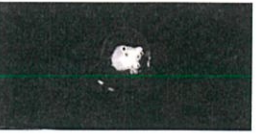
4.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิลทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดสามารถสร้างเอนไซม์ได้ แต่มีความเร็วในการเกิดฟองก๊าซแตกต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียที่เกิดฟองก๊าซทันทีหลังทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีทั้งหมด 8 ไอโซเลท ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ APN-VII-R003 APN-IV-T004 (B) PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PPV-VI-R010 (61B) PSV-IV-T010 PSV-V-T004 และ PSV-VI-R010 และเชื้อแบคทีเรียที่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไม่เกิดฟองก๊าซทันที แต่เกิดภายใน 30 วินาที มีจำนวนทั้งหมด 2 ไอโซเลท ได้แก่ APN-IV-T004 (A) และ PPN-I-R005 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

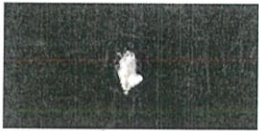
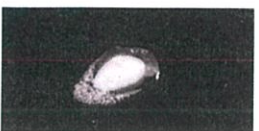


จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส นั้น โดยปกติในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งจัดว่าเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่พบในเซลล์ เพื่อย่อยสลายพันธะทางเคมีของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกตัวเป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ (นันทนา, 2537) ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง. เพราะเอนไซม์คะตะเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้น การอ่านผลลบผิดพลาด (false negative) สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าใช้เชื้ออายุมาก (ดวงพร, 2537) เชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงเกิดฟองก๊าซขึ้นช้า ซึ่งอาจทำให้สับสนกับผลที่เกิดจากเอนไซม์คะตะเลส (Sagar aryal, 2015)

ตารางที่ 4.4 แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

สายพันธุ์	ผล	สายพันธุ์	ผล
APN-VII-R003 	+	APN-IV-T004 (A) 	+*
APN-IV-T004 (B) 	+	PPN-I-R005 	+*
PPV-VI-R012 	+	PPV-VI-R010 (61) 	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

สายพันธุ์	ผล	สายพันธุ์	ผล
PPV-VI-R010 (61B) 	+	PSV-IV-T010 	+
PSV-V-T004 	+	PSV-VI-R010 	+

หมายเหตุ : + คือ เกิดฟองก๊าซทันที สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้
+* คือ เกิดฟองก๊าซช้า แต่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้

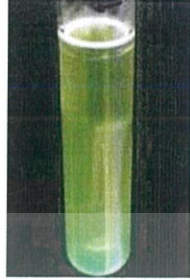





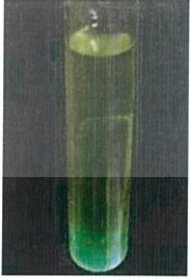
4.2.4 การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 7 ไอโซเลท จึงนำมาทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ในอาหาร Brilliant green lactose bile broth (BGLB) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ให้ผลเป็นบวก หลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง เนื่องจากการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ ได้แก่ APN-VII-R003 และ PSV-IV-T010 และเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ให้ผลเป็นลบ ได้แก่ PSV-VI-R010 PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PPV-VI-R010 (61B) และ PSV-V-T004 ดังแสดงในตาราง 4.5

จากการทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียพบว่าโคลิฟอร์มแบคทีเรียสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ผลเป็นกรดและก๊าซ แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดอื่นและยีสต์ สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้เช่นเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth (BGLB) จึงมีคุณสมบัติเป็นอาหารประเภท selective media และ differential medium ซึ่งจะมีฤทธิ์ยับยั้งไม่ให้แบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากแบคทีเรียแกรมลบเจริญเติบโตได้ ก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเกิดจากฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (ออร์ดี, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

สายพันธุ์	ผล	สายพันธุ์	ผล
APN-VII-R003 	+	PSV-VI-R010 	-
PPV-VI-R012 	-	PPV-VI-R010 (61) 	-
PPV-VI-R010 (61B) 	-	PSV-IV-T010 	+
PSV-V-T004 	-		

หมายเหตุ : + คือ เกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ

- คือ ไม่เกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิลต่อยาปฏิชีวนะ ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Norfloxacin Ampicillin Gentamicin Erytromycin Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ Cefoxitin ด้วยวิธี disk diffusion บนอาหาร MHA โดยจะวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้ง (zone of inhibit) โดยกำหนดว่าบริเวณที่ไม่เกิด clear zone แสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา และบริเวณที่เกิด clear zone แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดใดเลย 4 ไอโซเลท ได้แก่ PSV-V-T004 APV-IV-T004 (A) APV-IV-T004 (B) และ PSV-V-T004 มีเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือยา Erytromycin และ Cefoxitin จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ APN-VII-R003 และ PSV-IV-T010 และมีเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือยา Ampicillin Erytromycin และ Cefoxitin จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ PPV-VI-R012 PPV-VI-R010 (61) PPV-VI-R010 (61B) และ PSV-VI-R011 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ในปัจจุบันมียาปฏิชีวนะหลากหลายชนิดถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย การใช้ยาปฏิชีวนะโดยขาดความระมัดระวัง รวมทั้งการใช้โดยไม่ถูกวิธีเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อยา (วีรวรรณ, 2549) และนอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะกับฟาร์มปศุสัตว์ ตลอดจนจรรยากรรมเลี้ยงสัตว์ เพื่อรักษาโรค ป้องกันโรค และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ด้วย เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับต่ำๆ เป็นระยะเวลาอันยาวนานอาจก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาได้ (ณัฐธิดาและคณะ, 2559) การที่แบคทีเรียสามารถดื้อหรือต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้นั้น เกิดจากการควบคุมโดยยีนที่ควบคุมการทนทานต่อยาปฏิชีวนะ ยีนนี้อาจจะอยู่บนพลาสมิดที่เป็นดีเอ็นเอแบคทีเรียหรืออยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียก็ได้ ยีนเหล่านี้จะควบคุมแบคทีเรียให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (วีรวรรณ, 2549) ซึ่งแบคทีเรียสามารถถ่ายยีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกด้วย ทำให้มีชนิดของแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว (กนกพรและคณะ, 2557)

เนื่องจากมีการใช้ยาปฏิชีวนะจำนวนมาก อัตราการดื้อยาก็คงจะเพิ่มเป็นคู่ขนาน ในปัจจุบันมีเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่ดื้อต่อยามากกว่า 2 กลุ่มขึ้นไปและมีเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่มีใช้ (กนกพรและคณะ, 2557) ซึ่งจากการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Ampicillin Erytromycin และ Cefoxitin ซึ่ง Erytromycin เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มแมคโครไลด์ มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและสารตั้งต้นทางพันธุกรรม ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต ส่วนยาปฏิชีวนะ Ampicillin และ Cefoxitin จัดอยู่ในกลุ่มเพนิซิลลินและเซฟาโลสปอริน ตามลำดับ ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกันคือทำลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต (อภัย, 2557)

นอกจากนี้ยังพบการดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์หนากว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในการออกฤทธิ์ยาจะต้องซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกหรือแทรกผ่านช่อง Porins ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบแต่ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นใบแจ้งประสงค์ตามการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ยาปฏิชีวนะที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ และต้องใช้ยาปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (นิตินพงษ์และคณะ, 2551) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae จะมีการขับยาออกด้วยวิธี efflux pump ซึ่งเป็นการลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะภายในเซลล์ ทำให้ยาไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้อีกด้วย (สุนัดดา, 2556) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกก็มีการดื้อยาได้ ซึ่งส่วนมากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะเป็นกลุ่ม *Staphylococcus spp.* (นิตินพงษ์และคณะ, 2551)

ตารางที่ 4.6 แสดงการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Nor	Amp	Gen	Erytro	Sul	Cef
1. APN-VII-R003	27.00	20.20	22.00	-	22.00	-
	26.00	20.00	21.00	-	22.20	-
	26.20	20.00	21.00	-	21.00	-
เฉลี่ย	26.40	20.06	21.38	-	21.73	-
2. APV-IV-T004 (A)	27.00	37.35	25.20	23.00	31.00	30.00
	28.00	32.00	26.10	24.00	28.00	27.20
	28.20	31.00	25.00	23.15	27.00	28.20
เฉลี่ย	27.73	33.45	25.43	23.38	28.66	28.46
3. APV-IV-T004 (B)	30.00	32.30	26.35	25.00	29.00	30.00
	21.00	32.15	25.20	25.00	30.00	27.00
	31.00	32.00	26.00	25.00	30.00	26.20
เฉลี่ย	30.00	32.15	25.85	24.33	29.66	27.73
4.PPN-I-R005	27.00	34.00	29.00	24.00	35.00	29.00
	30.25	34.00	26.00	29.00	36.00	28.00
	20.10	38.00	26.30	23.00	30.20	24.10
เฉลี่ย	28.45	35.33	27.10	23.66	33.73	28.36
5.PPV-VI-R012	27.00	-	23.00	-	24.60	-
	30.00	-	21.25	-	24.15	-
	29.00	-	22.00	-	24.20	-
เฉลี่ย	28.66	-	22.08	-	24.31	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) แสดงการทดสอบการต่อต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Nor	Amp	Gen	Erytro	Sul	Cef
6.PPV-VI-R010 (61)	25.00	-	11.00	-	25.20	-
	25.00	-	20.00	-	25.00	-
	26.00	-	20.00	-	25.00	-
เฉลี่ย	25.33	-	20.33	-	25.66	-
7. PPV-VI-R010(61B)	25.00	-	22.00	-	26.00	-
	29.00	-	21.00	-	26.00	-
	29.00	-	20.00	-	26.00	-
เฉลี่ย	28.66	-	21.00	-	25.33	-
8. PSV-IV-T010	29.00	19.00	20.15	-	24.00	-
	29.00	18.15	20.00	-	23.00	-
	27.20	18.00	20.00	-	25.00	-
เฉลี่ย	28.40	18.50	20.05	-	24.00	-
9.PSV-V-T004	27.00	37.35	25.20	23.00	31.00	30.00
	25.00	32.00	26.10	24.00	28.00	27.20
	28.20	31.00	25.00	23.15	27.00	28.20
เฉลี่ย	27.73	33.45	25.43	23.38	28.66	28.46
10.PSV-VI-R011	28.00	-	21.00	-	26.00	-
	25.00	-	20.00	-	25.00	-
	25.20	-	20.00	-	25.10	-
เฉลี่ย	26.06	-	20.33	-	25.36	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลาชนิด จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 7 ไอโซเลท และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 3 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีพบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ สามารถแยกเชื้อได้เป็น 3 ตระกูล ได้แก่ Enterobacteriaceae Pseudomonadaceae และ Vibrionaceae ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Enterobacter spp* *Pseudomonas spp* และ *Vibrio spp* ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีรูปร่างท่อนสั้น ลักษณะโคโลนีมีทั้งสีขาว สีเหลือง โปรงแสงและทึบแสง มันวาว รูปร่างกลมมน สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส โดยมีการสร้างกรดและก๊าซจากการหมักน้ำตาล แต่ไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ และเชื้อส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่และสร้างเอนไซม์อะคะเลสได้ และเป็นฟิซิลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย จำนวน 2 ไอโซเลท

จากการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียต่อยา 6 ชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพียง 3 ชนิด ได้แก่ Ampicillin Erytromycin และ Cefoxitin ยาปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียมีการดื้อยามากที่สุด คือ Erytromycin และ Cefoxitin และยาปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียมีการดื้อยารองลงมา คือ Ampicillin

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นเพิ่มเติมที่อาจก่อให้เกิดโรคในปลาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และควรมีการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียให้มีความจำเพาะมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กมลสิริ ภูมิภมร , ประภัสสร เซาวนสกุล , ประสบพร ทองนุ่น และอัญญรัตน์ ทิพย์ธารา. 2560 “ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Enterococcus spp.* และยีนดื้อยาที่พบในมูลสุกร ระหว่างฟาร์มที่มีระบบ การเลี้ยงปกติ และฟาร์มกึ่งอินทรีย์” *สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ*. ปีที่ 12, ฉบับ 2. 103-127. (กันยายน – ธันวาคม 2560)

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2556. “ปริมาณและมูลค่าสัตว์น้ำจืดที่สำคัญทางเศรษฐกิจ” หน้า 19-33. ใน *สถิติการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประจำปี 2556*. เอกสารฉบับที่ 5/2558

กองวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. 2556. ความแตกต่างระหว่างเพศและการผสมพันธุ์ [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <https://www.fisheries.go.th/genetic/index.php/2013-11-15-01-35-24/85-2013-11-25-08-28-46/101-2014-02-06-01-52-39?showall=&start=3>

ศิริ กอนันตกุล และจุฬ สีนชัยพาณิชย์. 2549. การเลี้ยงปลานิลในกระชัง. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

จากรวรรณ ตลับนาค. 2560. ยาปฏิชีวนะกลุ่มต่างๆ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <https://www.mindmeister.com/fr/915993553/>

ชนกันต์ จิตมนัส. 2556. “โรคปลา” *เชียงใหม่สัตว์แพทยสาร*. ปีที่ 11, ฉบับ 1. 75-86.

ชลิตา อนุพันธ์. 2558. “ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากมะสัง.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี*.

ชาญณรงค์ รอดคำ. 2552. โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.micro.vet.chula.ac.th/index.php/doc/doc_download/57-

ทีริมา ภาคภูมิ , กัลยาภรณ์ จันตรี และอรพิน โกมุติบาล. 2559. “ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องสำอาง.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, มหาวิทยาลัยสวนดุสิต*.

อัชพงศ์ ธรรมบรรหาร. 2558. “วิวัฒนาการของยาปฏิชีวนะสู่การดื้อยาในปัจจุบัน” *R&D NEWSLETTER*. ปีที่ 22, ฉบับ 4. 17-21. (ตุลาคม – ธันวาคม 2558)

ธีระวุฒิ หวังอานวยพร. 2550. “ความสามารถในการต้านจุลินทรีย์และต้านสารอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด.” *ปริญญาานิพนธ์วิทยาศาสตร์พื้นฐานคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยหอการค้า*

ธีระชัย ธนानันต์. 2541. *ปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา*. กรุงเทพฯ : โครงการตาราภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ศูนย์หนังสือแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นฤชยา ไกรเนตร. 2553. การเพาะเลี้ยงปลาไนล. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด
- นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- นิลุบล ยูอาสา , ชุตินา หาญจวนิช และนงนุช สุวรรณเพ็ง. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดกับปลาไนลที่เลี้ยงในกระชังใน เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารประกอบงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำ ปี 2545. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 27 หน้า.
- บุปผา ศิริรัมย์. 2540. พฤติกรรมสุขภาพในเรื่องการใช้จ่ายปฏิชีวนะของประชาชนในจังหวัดนครปฐม. นครปฐม : สถาบันวิจัยประชากรและสังคมมหาวิทยาลัยมหิดล
- ประพันธ์ศักดิ์ ศีระษะภูมิ, เยาวรัตน์ ศรีวรรณ , อีสริยา วุฒิสินธุ์ , อัจฉรา จุฑาเกตุ, ณีภูษา นิธิกุลวรรณศ์ และปณรัตน์ ผาดี. 2556. การศึกษาและประเมินผลกระทบของปัจจัยเสี่ยงที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาไนล (*Oreochromis niloticus*) ของประเทศไทย. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ประพันธ์ศักดิ์ ศีระษะภูมิ และนนทวิทย์ อารีย์ชน. 2552. “โรคที่เป็นสาเหตุของการตายที่รุนแรงของปลาไนลในประเทศไทย.” ใน นิทรรศการงานวิจัยบนเส้นทางงานวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ประสาทร บริสุทธิ์เพชร , พิทย ภาณุบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 91-99. ใน งานประชุมสัตวแพทยศาสตร์ครั้งที่ 9. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พนัส เฉลิมแสนยากร. 2557. โรคจากแบคทีเรีย [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/แบคทีเรีย/>
- พนาวรรณ คุณติสุข. 2554. “การใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic drugs) อยาถูกตองและเหมาะสม” *โลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*. ปีที่ 21, ฉบับ 3. 193 - 195. (กรกฎาคม-กันยายน 2554)
- วิพรพรรณ เนื่องเม็ก, วัฒนศักดิ์ จาละคร และอนิรุช เนื่องเม็ก. 2555. “การแยกเชื้อและความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแอโรโมนาสไฮโดรฟีลาที่แยกได้จากปลาไนลปกติในกว๊านพะเยา” *แก่นเกษตร*. ปีที่40, ฉบับพิเศษ 1. 355-361.
- วิชญ ธรรมลิขิตกุล. 2534. คู่มือโรคติดเชื้อและการใช้ยาต้านจุลชีพ. ฉบับเรียบเรียงครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้ง กรุ๊ป
- วิชญ ธรรมลิขิตกุล. 2557. “เชื้อโรคคือยาปฏิชีวนะ (ยาต้านจุลชีพ) และการควบคุมและป้องกัน โรคติดเชื้อคือยาปฏิชีวนะ” *เวชบัณฑิตศิริราช*. ปีที่ 7, ฉบับ 1. 26-29. (มกราคม-มิถุนายน 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วิชญ์ ธรรมลิขิตกุล. 2560. โครงการควบคุมและป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://doi.nrct.go.th/ListDoi/Download/376590/7ad3cd39f885019a6e1d1a8455e98349?Resolve_Doi=10.14457/MU.res.2017.1
- วีรวรรณ ลูวีระ. 2549. “การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย” *สงขลานครินทร์เวชสาร*. ปีที่ 24, ฉบับที่ 5. 253-259. (กันยายน – ตุลาคม 2549)
- วีระชัย โชควิณูญ . 2530. เทคนิคการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำด้านแบคทีเรีย กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- วุฒินันท์ จตุพศ. 2549. การใช้ยาปฏิชีวนะในทางศัลยศาสตร์ช่องปาก. กรุงเทพฯ : คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ศิริพร วงศ์ดินดา. 2549. “การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา ESBLs และ AmpC และอุบัติการณ์ของ CTX-M gene ใน Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากโรงพยาบาลรามาริบัติ.” วิทยาศาสตร์บัณฑิตคณะเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยมหิดล
- ศิริลักษณ์ อนันต์ณัฐศิริ. 2549. หลักการใช้ยาต้านจุลชีพ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : [http://www.ped.si.mahidol.ac.th/site_data/mykku_med/701000033/Principle%20use%20of%20ATB%20\(379%20411\).doc](http://www.ped.si.mahidol.ac.th/site_data/mykku_med/701000033/Principle%20use%20of%20ATB%20(379%20411).doc)
- สมศักดิ์ โกลเลขา. 2530. “ยาในกลุ่มควิโนโลน” *เภสัชวิทยา*. ปีที่ 9. 31-39
- สมโภชน์ อัครกะวีวัฒน์. 2547. สารบัญรื้อปลาน้ำจืดไทย. กรุงเทพฯ : องค์การค้าคุรุสภา
- สุดา ตันตวนิช, เต็มดวง สมศิริ, วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ, จารี ผลชนะ, วารินี ปัญญาวิธ, ฐิติพร หลาวประเสริฐ และจิราภรณ์ บำรุงกิจ. 2554. โรคปลานิล. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยสุขภาพ น้ำจืดกรมประมง.
- สุปราณี ชินบุตร. 2545. “ยาดกคางในเนื้อกุ้ง” *การประมง*. ปีที่ 55, ฉบับ 3. 213 - 214.
- สุรเกียรติ อาชานานุภาพ. 2553. ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 1. กรุงเทพฯ : หมอชาวบ้าน.
- สุวณี สุขเวชย์ และ มาลัย วรจิตร. 2540. แบคทีเรียพื้นฐาน = Basic bacteriology. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ศิริยอด
- อภัย ราชฎารวิจิตร. 2557. “ยาอิริโทมัยซิน” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/อิริโทมัยซิน/>
- อภัย ราชฎารวิจิตร. 2557. “แอมปิซิลิน” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/แอมปิซิลิน/>
- อภัย ราชฎารวิจิตร. 2557. “เซฟไซติน” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/เซฟไซติน/>
- อภัย ราชฎารวิจิตร. 2557. “ซัลฟาเมทอกซาโซน” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/ซัลฟาเมทอกซาโซน/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อภัย ราชภูริจิตร. 2557. “โพลิก กรดโพลิก” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/กรดโพลิก/>
- อภัย ราชภูริจิตร. 2557. “ยาปฏิชีวนะ” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/ยาปฏิชีวนะ/>
- อภัย ราชภูริจิตร. 2557. “อะมิโนไกลโคไซด์” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://haamor.com/th/อะมิโนไกลโคไซด์/>
- อภิญา จันทรวัฒน์. 2545. บทที่ 1 เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1.php>
- อัมพร อยู่บาง. 2554. อยากรู้ใหม่...ทำไมถึงดีอียา?. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.yourhealthyguide.com/article/ag-medicine-obstruct.html>
- Black, JA. , Moland, ES. and Kenneth S. 2005. “AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC β -lactamases.” *J Clin Microbiology*. 43: 3110-3113.
- Calomiris, J.J. , Armstrong, J.L. and Seidler, R.J. 1984. “Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water.” *Applied and Environmental Microbiology*. 47: 1238 – 1242
- Canton, R. and Ruiz-Garbajosa, P. 2011. “Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes.” *Current Opinion in Pharmacology*. 11: 477-485.
- Chia, J. Chu, C. Su, LH. Chiu, CH. Kuo, AJ. Sun, CF. Wu, TL. 2005. “Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M β -lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan.” *J Clin Microbiology*. 43: 4486-4491.
- Eckert, C. Gautier, V. Saladin-Allard, M. Hidri, N. Verdet, C 2004. “Ould-Hocine Z, et al. Dissemination of M-type β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris” *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 1249-1255.
- Ensor, VM. Shahid, M. Evans, JT. Hawkey, PM. 2006. “Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 1260-1263.
- Gilbert, DN. Aminoglycosides. In : Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. 2005. *Principles and Practice of Infectious Diseases 6th ed.* Philadelphia : ElsevierChurchill Livingstone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Harley, J. P. and Prescott, L.M. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th editer
- In Repeort The Expert Consulration on International Fish Trade and Food Secueity. 27-30 January 2003. Casablanca. Morocco : FAO Fisheries Report.
- Lynch, SR. Puglisi, JD. 2001. "Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes." *Journal of Molecular Biology*. 306: 1037-58.
- MIRANDA, C.D. and ZEMELMAN, R. 2001. "Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay." *Marine pollution bulletin*. Vol.42 , NO.11, 1096-1102
- Palmer, K.L. Kos, V.N. and Gilmore, M.S. 2010. "Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance." *Current Opinion in Pharmacology*. 13 : 632- 639.
- Pathak, S.P. Kotalo Rama Gopal. 2005. "Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish." *Environmental Research* 98(1):100-3.
- Piddock, LJV. White, DG. Genserg, K. Pumbwe, L. Griggs, DJ. 2000. "Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* . 44: 3118-21.
- Pitout, JD. Nordmann, P. Laupland, KB. Poirel, L. 2005. "Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56: 52-59.
- Piumsombun, S. 2003 The Impact Of International Fish Trade On Food Security In Thailand.
- Turner, PJ. 2005. "Extended-spectrum beta-lactamases." *Clinical Infectious Diseases*. 41: S273-5.
- Vorachit, M. 2006. "Antibacterial Susceptibility Testing of *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp." *Antibacterial Susceptibility Testing*. Faculty of Medical Technology, Mahidol University. Bangkok. 56-63.
- Vorachit M. 2010. Laboratory Diagnosis of Drug Resistant Gram Positive Bacteria. In: Watcharin Rangspanuratn, editor. *Laboratory Diagnosis of Drug Resistant Bacteria*. Bangkok : Pinkaopress. 65-72.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wamala, S.P. Mugimba, K.K. Mutoloki, S. Evensen, Ø. Mdegela, R. Byarugaba, D.K. and Sørum, H. 2018. "Occurrence and antibiotic susceptibility of fish bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Clarias gariepinus* (African catfish) in Uganda." *Fisheries and Aquatic Sciences* 21:6
- Wright, GD. 2005. "Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification." *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57:1451-1470



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Nutrient Agar (NA)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสาร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Triple Sugar Iron Agar (TSI)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	15	กรัม
Protease Peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Ferrous sulfate	0.20	กรัม
Sodium chlorid	5	กรัม
Sodium thiosulfate	0.30	กรัม
Phenol red	0.02	กรัม
Agar	12	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสาร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Motility Medium

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptose	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสาร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) Broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Oxgall	20	กรัม
Brilliant green	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสาร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

Mueller Hinton Agar (MHA)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Beef extract power	2	กรัม
Acid Digest of Casein	17.50	กรัม
Soluble starch	1.50	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	7.3 ±0.1	

การเตรียม : ชั่งสาร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brain Heart Infusion Broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Brain heart infusion	37	กรัม
Glycerol	150	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร

การเตรียม : ชั่งสาร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

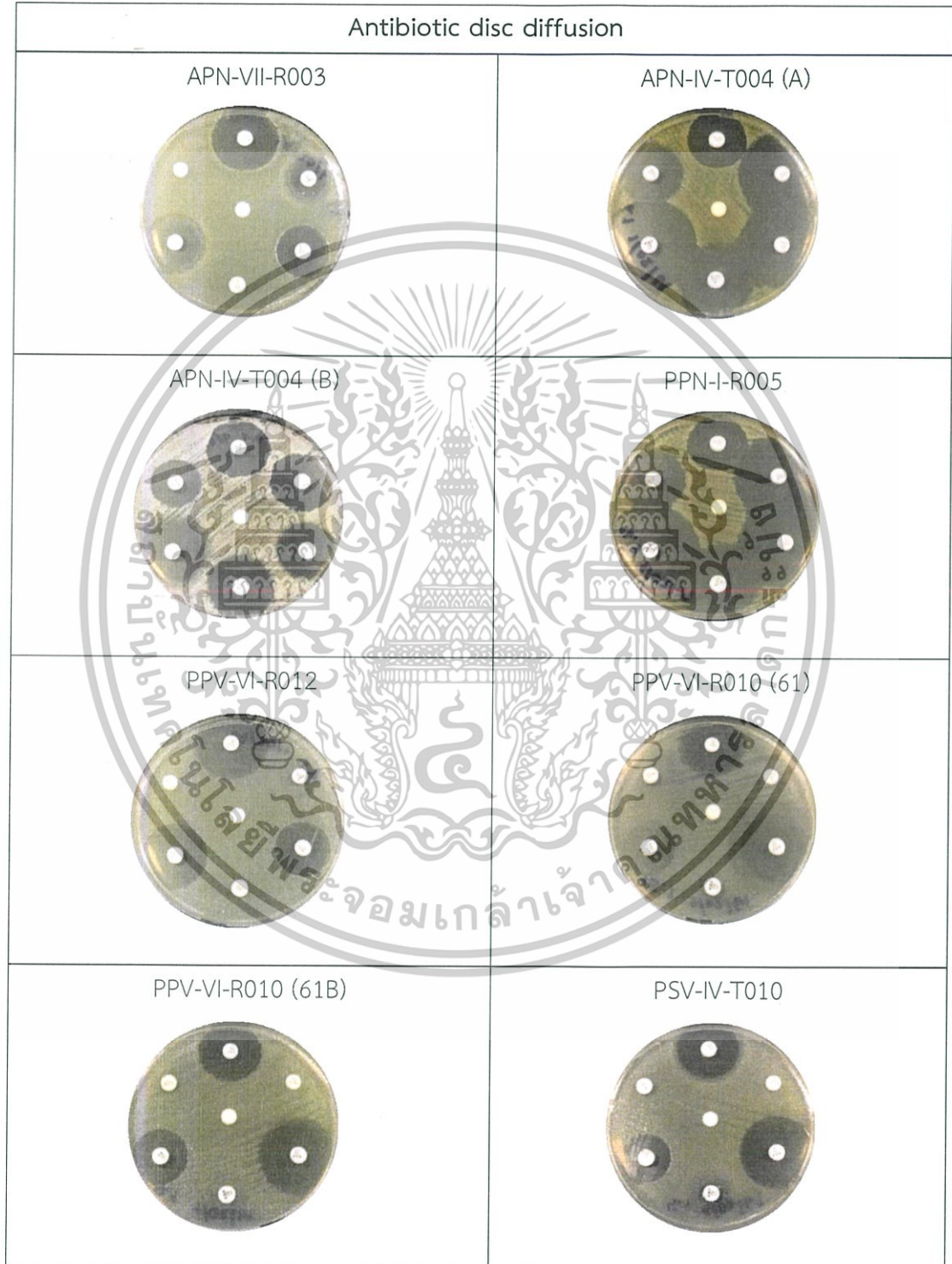


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

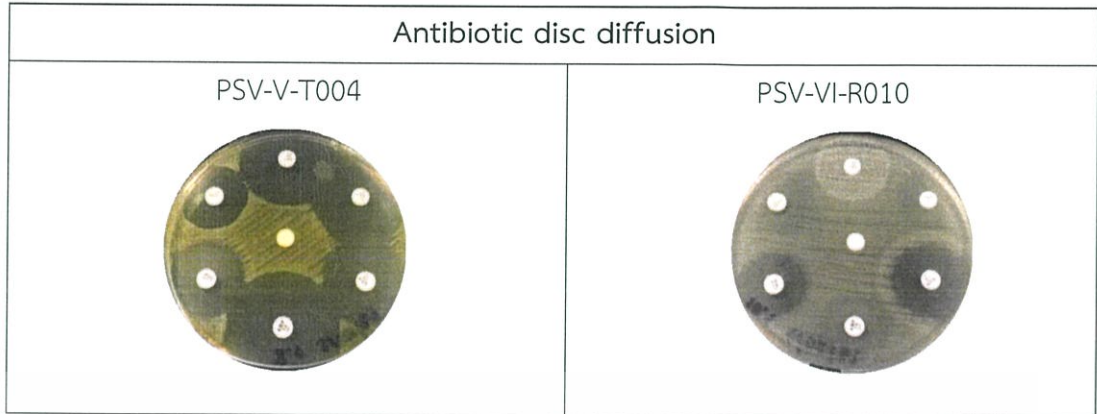
การทดสอบการต่อต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย

ตาราง แสดงการทดสอบการต่อต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงการทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล



Norfloxacin	10	ไม่โคกรัม
Ampicillin	10	ไม่โคกรัม
Gentamicin	10	ไม่โคกรัม
Erytromycin	15	ไม่โคกรัม
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	25	ไม่โคกรัม
Cefoxitin	30	ไม่โคกรัม

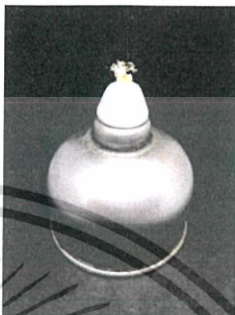




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Lamp)	
บีกเกอร์ (Beaker)	
จานเพาะเชื้อ (Petri dish)	

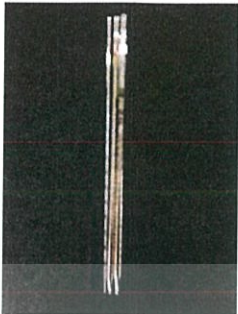


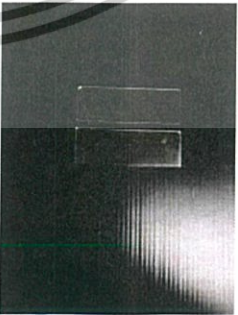
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1000 ไมโครลิตร	
ขวดฝาเกลียวใสสาร (Media Storage Bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร	
กระบอกสแตนเลส ใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)	
หลอดทดลอง (Test Tube)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
<p>ปิเปต (Pipette) ขนาด 1.5 และ 10 มิลลิลิตร</p>	
<p>ทิป (Tips) ขนาด 1000 ไมโครลิตร</p>	
<p>ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)</p>	
<p>แผ่นสไลด์ (Slide)</p>	


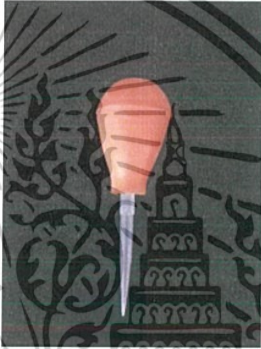


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)	
ไม้พันสำลี (Cotton Stick)	
เครื่องผสมสาร (Vortex)	
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	


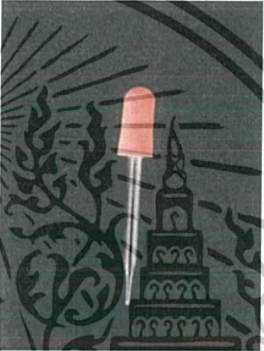


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
<p>แท่งแก้วคน (Stirring Rod)</p>	
<p>ลูกยาง (Rubber bulb)</p>	
<p>ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) 180 องศาเซลเซียส</p>	
<p>ช้อนตักสาร (Spatula)</p>	





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
ตู้อบเชื้อ 37 องศาเซลเซียส	
หลอดหยดสาร (Dropper)	
กระบอกตวง (Cylinder)	
หม้อนึ่งแรงดันไอ (Autoclave)	





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญตเห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
ตู้แช่แข็ง -180 องศาเซลเซียส	
คิวเวต (Cuvette)	
หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	
ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	



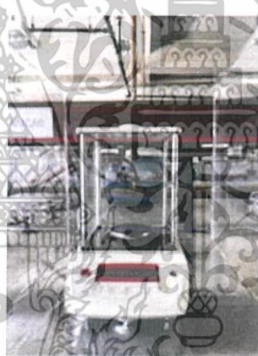
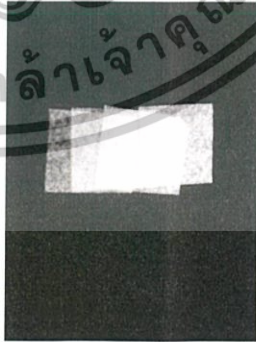
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอาจนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
ตู้แช่แข็ง -4 องศาเซลเซียส	
ตู้อบลม (Hot Air Oven) 70 องศาเซลเซียส	
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)	
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
<p>เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)</p>	
<p>ถุงมือ (Medical gloves)</p>	
<p>เครื่องซิงค์ทศนิยม 4 ตำแหน่ง</p>	
<p>กระดาษเช็ดเลนส์ (Lens Cleaning Paper)</p>	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง(ต่อ) แสดงเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	
เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper)	
เข็มเย็บผ้า (Needle) ลวดเย็บผ้า (Loop)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตาราง แสดงลำดับใน Stock และสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับใน Stock	สายพันธุ์
1.1	APN-VII-R003
6.1	APN-IV-T004 (A)
20.1	APN-IV-T004 (B)
16.1	PPN-I-R005
3.1	PPV-VI-R012
15.1	PPV-VI-R010 (61)
9.1	PPV-VI-R010 (61B)
4.1	PSV-IV-T010
8.1	PSV-V-T004
10.1	PSV-VI-R010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้