ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

ความเข้มข้นต่ำสุดของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ระดับความเค็มต่างกัน

Minimum inhibitory concentration (MIC) of oxytetracycline against bacterial pathogens in various level of salinity

ชื่อนักศึกษา นางสาวละมัยพร ผาสุข
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ปวีณา ทวีกิจการ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย
อาจารย์ที่ปรึกษา .....
(ดร.ปวีณา ทวีกิจการ)

ภาควิชารับรองแล้ว
.....
(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 18 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20551

หอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ
เรื่อง

ความเข้มข้นต่ำสุดของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ระดับความเค็มต่างกัน

Minimum inhibitory concentration (MIC) of oxytetracycline against bacterial pathogens in various level of salinity

T099333

โดย

นางสาวละมัยพร ผาสุข

ปพ.
ล174ค
2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520
ปีการศึกษา 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ความเข้มข้นต่ำสุดของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ระดับความเค็มต่างกัน

Minimum inhibitory concentration (MIC) of oxytetracycline against bacterial pathogens in various level of salinity

เพื่อศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยา ออกซีเต็ตต้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sorbia* 5 สายพันธุ์ และ *Pseudomonas aeroginosa* 4 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคสัตว์น้ำ ที่ระดับความเค็มต่างๆ โดยทำการทดสอบยาอ็อกซีเต็ตต้าซัยคลีนที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2 - 2048 ppm. มีเชื้อเริ่มต้น $1x10^5$ CFU/ml. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Muller Hinton Broth (MHB)โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็มต่างกัน 6 ระดับคือ 0 , 0.1 , 0.2 , 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า MIC ของยา ออกซีเต็ตต้าซัยคลีน ต่อ *Aeromonas sorbia* มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น ซึ่งพบว่าค่า MIC มีค่าอยู่ที่ 8 - 128 ppm. ที่ความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า 64- 256 ppm. ที่ความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 512 ppm ที่ความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) จะมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า MIC ซึ่งอยู่ในช่วง 8 - 512 ppm. เช่นกัน และ ค่า MIC ของยาอ็อกซีเต็ตต้าซัยคลีนต่อ *Pseudomonas aeroginosa* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นเช่นกันโดยมีค่าอยู่ในช่วงที่ 8 - 512 ppm. ที่ความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่า MIC อยู่ในช่วง 32 – 1024 ppm. และที่ความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ในช่วง 64 – 1024 ppm. ส่วนค่า MBC พบว่ามีค่ามากกว่าค่า MIC คือ อยู่ในช่วง 64 - 2048 ppm. จากการศึกษาครั้งนี้ในการนำยาอ็อกซีเต็ตต้าซัยคลีนไปใช้เพื่อยับยั้งการเจริญหรือกำจัดเชื้อ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจะมีประสิทธิภาพดีที่สุด ในน้ำจืดและที่ความเค็มไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ หากความเค็มเพิ่มขึ้นจำเป็นต้องใช้ยาความเข้มข้นสูงขึ้น มิฉะนั้นจะเป็นการสูญเปล่าและทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ ปวีณา ทวีกิจการ เป็นอย่างยิ่ง ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะแก้ไขข้อบกพร่องในการทำปัญหาพิเศษ รวมถึงคอยอบรมสั่งสอนในเรื่องต่าง ๆ ทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้คำอบรมสั่งสอนจนข้าพเจ้าประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณนางสาวบุปผา จงพัฒน์ (พี่มอญ) และนางสาวสุดา (พี่ดาว) ที่คอยให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา และสุดท้ายข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้คำสั่งสอน คอยอบรมเลี้ยงดูและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในวันนี้

นางสาว ละมัยพร ผาสุข

เดือนเมษายน พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญตาราง (ต่อ)	III
สารบัญตาราง (ต่อ)	IV
สารบัญภาพ	V
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุปและข้อเสนอแนะ	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline)ในแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ โดยมีการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน	5
2	ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ต่อเชื้อ Vibrio 135 สายพันธุ์ ที่แยกมาจากตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง *Penaeus monodon*	7
3	ช่วงของค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด และค่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้(IC)50 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์	7
4	ค่า MIC ของเชื้อ *Actinobacter spp.* จำนวน 60 สายพันธุ์ต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด	8
5	การเปรียบเทียบค่า MIC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aromonas sorbia* 5 สายพันธุ์ที่ระดับความเค็มต่างกัน	18
6	การเปรียบเทียบค่า MBC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aromonas sorbia* 5 สายพันธุ์ที่ระดับความเค็มต่างกัน	19
7	การเปรียบเทียบค่า MIC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Psedomonas aeruginosa* 4สายพันธุ์ที่ความเค็มระดับต่างกัน	21
8	การเปรียบเทียบค่า MBC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Psedomonas aeruginosa* 4 สายพันธุ์ที่ความเค็มต่างกัน	22

ตารางภาคผนวกที่

1	ค่า MIC ของยาอ็กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia*ที่แยกจากปลาไหล (03573) ,ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.0 %	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
2	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia*ที่แยกจากปลาไหล (03573) ,ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.1 %	31
3	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia*ที่แยกจากปลาไหล (03573) ,ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.2 %	32
4	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia*ที่แยกจากปลาไหล (03573) ,ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.3 %	33
5	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia*ที่แยกจากปลาไหล (03573) ,ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.4 %	34
6	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia*ที่แยกจากปลาไหล (03573) ,ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.5 %	35
7	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.0%	36
8	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.1%	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
9	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.2%	38
10	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.3%	39
11	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.4%	40
12	ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.5%	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีของ *Pseudomonas aeruginosa*	12
2	วิธีการเจือจาง (dilution) ความเข้มข้นของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนแบบสองเท่า (twofold) ในการเตรียมความเข้มข้นของยาที่ระดับต่างๆ	15
3	การอ่านค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ Aeromonas sorbia ที่แยกจากปลาไหลที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 64 ppm.	17
4	การอ่านค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลากระดี่ทอง ที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 256 ppm.	19
5	การอ่านค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหลที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 64 ppm.	24
6	การอ่านค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลากระดี่ทอง ที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 256 ppm.	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำปัญหาหนึ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้คือการเกิดโรคระบาด ซึ่งเกิดจากหลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้ปลาอ่อนแอ จนทำให้ปลามีความต้านทานต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไม่ไหว และอีกปัจจัยหนึ่งคือเชื้อโรคมีความรุนแรงขึ้น ดังนั้นสิ่งที่จะต้องทำคือการป้องกันและกำจัดสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคซึ่งได้แก่ โปรโตซัว แบคทีเรียและไวรัส รวมถึงการเลี้ยงสัตว์น้ำให้มีความแข็งแรงอยู่เสมอโดยการให้อาหารในปริมาณที่เหมาะสมและมีการจัดการที่ดี แต่อย่างไรก็ตามวิธีการข้างต้นอาจไม่สามารถที่จะยับยั้งหรือป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคได้ จึงจำเป็นจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดโรคสัตว์น้ำ

ยาและสารเคมีที่นำมาใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคสัตว์น้ำที่มีสาเหตุที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมีหลายชนิดแต่ที่ได้รับอนุญาติให้ใช้กับสัตว์น้ำที่นำมาบริโภคมีเพียงไม่กี่ชนิดได้แก่ยาออกซีเต็ตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycliine) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวะที่เกษตรกรนิยมใช้ในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยการผสมในอาหารให้สัตว์น้ำกินโดยอาจใช้น้ำหรือสารเหนี่ยวนำต่างๆ เป็นการช่วยลดการสูญเสียของยาเนื่องจากการละลายทำให้ปลาได้รับยามากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาให้ได้ผลและมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (Minimum inhibitory concentration) เพื่อช่วยเกษตรกรลดค่าใช้จ่ายในการซื้อยา (ชลอ,2535) และข้อสำคัญที่ควรคำนึงในการใช้ยาอีกประการหนึ่งคือสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำนั้นๆ อย่างเช่นระดับของความเค็มที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของยาได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มุ่งหาค่า MIC ของยาออกซีเต็ตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycliine) ที่ความเค็มระดับต่างๆกันโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคสัตว์ทั่วไปคือ *Aeromonas sobia* ซึ่งจะทำให้เกิดอาการทองบวมน้ำและแผลตามตัวนอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสอย่างเฉียบพลัน (นนทวิทย์ และ บุญกว้าง.2537) *Pseudomonas aeruginosa* เป็นอีกตัวหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการเฉียบพลันถึงเรื้อรังบริเวณผิวหนังเกิดการเปื่อย ถลอกเป็นแผลตกเลือดทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและยังมีผลต่ออวัยวะภายในทำให้เกิดการตกเลือดและเยื่อบุช่องท้องอักเสบ ดังนั้นการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะในระรับความเข้มข้นที่เหมาะสมในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน เช่นใช้ยาร่วมกับการใช้เกลือเพื่อลดความเครียดหรือฆ่าเชื้อโรคบางชนิด จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยในการรักษาและกำจัดโรคสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อซึ่งจะทำให้ยากต่อการจัดการภายหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobia* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง
2. เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas sobia* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

1. ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentrations)

MIC หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะ หรือยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Lorian,1991) หน่วยที่ใช้ทั่วไปคือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือหน่วยสากล Iu/ml.(International unit) (นันทนา.2537)

1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบค่า MIC

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่า MIC ของยาอ๊กซีเตตร้าซัยคลีนซึ่งอาจจะทำให้ค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลง (นันทนา. 2537)

1. ตัวยาทดสอบ ต้องใช้ชนิด Laboratory reference standard ไม่ใช่ชนิดที่ใช้กับผู้ป่วยซึ่งอาจจะมีสารเจือปน หรือมีความรุนแรงของยาไม่ตรงตามที่บ่งบอก สำหรับ Laboratory reference standard ควรอยู่ในลักษณะของผง แหล่งที่หาได้คือ โรงงานที่ผลิตหรือบริษัทที่จำหน่ายยาชนิดอื่นๆ หน่วยราชการที่ทำการวิเคราะห์ยา

2. การเลือกระดับความเข้มข้นที่จะทดสอบควรมีหลักเกณฑ์คือ ควรให้มากกว่าระดับสูงสุดที่พบในเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกายอย่างน้อยหนึ่งความเข้มข้นเลือกความเข้มข้นยาโดยดูจากการกระจายตัวของค่า MIC ที่ได้จากผลการทดสอบความไวของกลุ่มเชื้อแต่ละชนิดต่อยา ซึ่งอาจจะรวบรวมจากผู้อื่นที่เคยทำไว้ ซึ่งลักษณะการกระจายตัวเหล่านี้อาจเหมือนหรือแตกต่าง ซึ่งจะสามารถช่วยเป็นแนวทางเพื่อเลือกระดับยาที่ทดสอบ ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบมักไม่ให้สูงกว่า ระดับที่คาดว่าจะก่อให้เกิดพิษหนึ่งหรือสองความเข้มข้น

3. เชื้อที่นำมาทดสอบ ขนาดของเชื้อที่นำมาทดสอบ มีผลต่อการทดสอบอย่างมาก โดยเฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในการทดสอบวิธี broth dilution test เนื่องเชื้อจะมีการ active ต่ออาหารเหลวมากกว่า agar

4. บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ โดยเฉพาะเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง(agar medium) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้ค่อนข้างมาก เมื่อบ่มเพาะเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ต้องเป็นอาหารที่ยอมให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) มาก ขณะที่เชื้อเจริญ ไม่มีสารรบกวนการออกฤทธิ์ของยา ยาต้านจุลชีพที่ถูกรบกวนจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันได้แก่

5.1 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของยาบางชนิดเช่น การทดสอบยาที่นำมารักษาโรคติดเชื้อบริเวณที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ต่ำหรือสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 บัฟเฟอร์ (buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด อาจมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของยาบางชนิด

5.3 ปริมาณอิออนที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อความไวของเชื้อ และการออกฤทธิ์ของยาต่อเชื้อได้

5.4 Osmolality ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการทดสอบได้เช่นกัน

5.5 ปริมาณ NaCl ที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบการออกฤทธิ์ของยา เช่นการทดสอบยาที่จะนำมารักษาโรคติดเชื้อในแหล่งน้ำที่มีความเค็มสูง

5.6 อาหารเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นการเติมเลือดจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอ่านค่า MIC ไม่ได้ อาหารเสริมที่มีโปรตีนจะทำให้ค่า MIC ที่จับกับโปรตีนมีค่าสูง

5.7 วุ้น (agar) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharider ที่เตรียมได้จากสาหร่ายทะเลบางพวก มักมีประจุเป็นลบ เนื่องจากมีหมู่ acidic sulfate บน polysaccharider ดังนั้นยาที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น cationic จะสามารถจับกับหมู่ acidic sulfate ในวุ้นที่มีผลทำให้การออกฤทธิ์ของยาลดลง

1.2 ค่า MIC ยาอ็อกซีเต็ตร้าซัยคลีนในเชื้อต่างชนิดกัน

จากการศึกษาของ Tendencia และ dela Pena (2002) โดยใช้อ็อกซีเต็ตร้าซัยคลีนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ Vibrio, Pseudomonas และ Aeromonas โดยนำเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มาจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่เคยมีการใช้ยาอ็อกซีเต็ตร้าซัยคลีนและบ่อที่ไม่เคยมีการใช้ยาจากนั้นนำมาทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่มี 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนพบว่า Pseudomonas และ Aeromonas มีการดื้อยาอ็อกซีเต็ตร้าซัยคลีนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Vibrio และพบว่าเชื้อที่นำมาจากบ่อที่เคยมีกรใช้ยาจะมีการดื้อยามากกว่าซึ่งจะส่งผลให้ค่า MIC สูงขึ้น

Pursell et al. (1996) ได้มีการศึกษาหาค่า MIC โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดคือ MHA , TSCA และ 2216V ซึ่งในอาหารแต่ละชนิดมีการทดลองในเชื้อที่เหมือนกันเพื่อดูค่า MIC ที่แน่นอน โดยนำแบคทีเรียที่ได้มาจากชั้นตะกอนดินในน้ำเค็มใช้ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ MS24, MS21, MS5, MS1, MS2, MS , *E. coli*, *S. aureus*, *P.aeruginosa* และ *A.salmonicida* โดยมีการเตรียมเชื้อใน Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) และมีการเติม NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มไว้ที่ 18 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงจากนั้นนำเชื้อที่ได้โดย เตรียม stock เชื้อที่ 10^8 cfu/ml และมีการเจือจางยาออกซีเต็ตตร้าซัยคลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบสองเท่า (two fold) จากนั้นนำเชื้อไปบ่ม 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC โดยดูความเข้มข้นที่ไม่มีเชื้อขึ้น สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อจะใสเมื่อเปรียบเทียบกับ control และจากผลการทดลองจะเห็นว่าค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MIC ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดและเชื้อที่ต่างชนิดกันจะมีค่าที่แตกต่างกันไป ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSCA กับ 2216V จะให้ค่าที่สูงกว่าใน MHA (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า MIC (μg/ml) ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ในแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ โดยมีการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน

ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ		
	MHA	TSCA	2216V
MS1(TSCA)	0.25	4	2
MS2(TSCA)	4	8	32
MS3(TSCA)	1	2	4
MS24(2216V)	2	64	8
MS21(2216V)	32	128	128
MS5(2216V)	2	32	8
E.coli	2	32	16
S.aureus	0.5	2	4
P.aeruginosa	8	128	128
A.salmonicida	0.5	4	8

ที่มา:Pursell et al.,(1996)

จะเห็นว่า MIC ค่าที่ได้จะไม่เท่ากันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการต่อต้านของเชื้อแต่ละชนิด และอาหารแต่ละชนิดมีส่วนประกอบที่แตกต่างกันไป ซึ่ง Pursell *et al.* (1996) ได้กล่าวว่าผลที่ได้มานั้นเกิดจากความสัมพันธ์ปฏิกิริยาทางชีววิทยาของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน กับอาหารเลี้ยงเชื้อ และความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาทางชีวภาพ ของแบคทีเรียชนิดนั้นที่มีต่อยา ดังนั้นในการใช้ยา อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน ถ้าจะใช้ให้ได้ผลดีควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสมและมีการศึกษาปฏิกิริยาทางชีวภาพของเชื้อที่มีต่อยารวมถึงสภาพแวดล้อมในฟาร์มแห่งนั้น ซึ่งจากผลการทดลองตรงนี้พบว่าในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันและในเชื้อต่างชนิดกันนั้น ปริมาณการใช้ยาอาจไม่เท่ากันซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเพราะหากมีการใช้ยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในปริมาณที่เท่ากันในเชื้อต่างชนิดกันในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันความเข้มข้นที่ใช้อาจจะไม่เพียงพอในการยับยั้งแบคทีเรียได้เมื่อเป็นเช่นนี้จะทำให้เชื้อมีการปรับตัวดื้อยาได้ดังนั้นในการใช้ยาจึงควรมีการศึกษาหาค่า MIC และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาก่อนมีการใช้ยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน

จากการศึกษาของ Miranda และ Zemelman (2002) เพื่อหาค่า MIC ของยาอ็อกซีเต็ตร้าซัยคลีนของแบคทีเรียที่มีใน Chilean salmon farms โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำจาก 4 บริเวณคือ CC1 คือฟาร์มที่มีการรับน้ำเข้ามาจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อเลี้ยงปลา salmon CC2 คือฟาร์มที่มีการเลี้ยงปลาsalmon ขนาดเล็กโดยทำการเลี้ยงในบ่ออนุบาลส่วน CC3 คือฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงปลา salmon โดยเก็บน้ำในบริเวณที่มีการปล่อยน้ำทิ้งและ CC4คือบริเวณโดยรอบที่มีการเลี้ยงปลา salmonในบริเวณของทะเลสาบ Natri ซึ่งในการทดลองนี้มีการใช้ยาตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5 – 2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller – Hinton agar แบบสองเท่า(twofold) ใช้เชื้อที่ความเข้มข้น 10^4 cfu/ml โดยเจือจางเชื้อใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นดูผลจาก plate ที่ไม่มีเชื้อ ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 64 ถึง 2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ในบริเวณ CC1 และ CC4 มีค่า MIC_{90} (ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 90 เปอร์เซ็นต์) อยู่ที่ 2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนบริเวณ CC2 และCC3 มีค่า MIC_{90} อยู่ที่ 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากค่า MICs ที่มีค่าต่ำสุดพบในบริเวณ CC4 คือบริเวณทะเลสาบซึ่งมีค่าน้อยกว่าหรือเทากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MICs ที่มีค่าสูงสุดพบในบริเวณ CC3 คือบริเวณบริเวณที่มีการปล่อยน้ำทิ้งซึ่งมีค่าอยู่ที่ 2048 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากค่า MIC ที่ต่างกันในบริเวณที่ต่างกันนั้น แสดงว่าสิ่งที่มีผลต่อค่า MIC มากที่สุดคือการเคยใช้ยามาก่อนในบริเวณนั้นโดยสังเกตจากค่า MICs ที่มีค่าต่ำสุดที่พบในบริเวณทะเลสาบซึ่งไม่เคยมีการใช้ยามาก่อนกับค่า MICs ที่มีค่าสูงสุดที่พบในบริเวณที่มีการปล่อยน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยง และสิ่งแวดล้อมของฟาร์มที่ต่างทำให้แบคทีเรียในแต่ละบริเวณมีการดื้อยาที่ต่างกันโดยเฉพาะบริเวณที่มีการสำรวจพบเชื้อ Aeromonas, Pseudomonas และ Vibrio ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการดื้อยาได้ง่ายมาก (Miranda and Zemelman, 2002)

1.4 ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดในเชื้อ Vibrio 135 สายพันธุ์

จากการศึกษาเพื่อหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดในเชื้อ Vibrio 135 สายพันธุ์ของ Ruangpan *et.al*, (1993) โดยวิธีของ Japan Society of Chemotherapy (1981) ซึ่งมีการเจือจางยาปฏิชีวนะแบบสองเท่า (twofold) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ยาตั้งแต่ 0.0125 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เชื้อที่ความเข้มข้น 10^4 cfu/ml จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ชั่งโมงและดูค่า MIC โดยดูจาก plate ที่ไม่มีเชื้อขึ้นพบว่ามีค่าดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ต่อเชื้อ Vibrio 135 สายพันธุ์ ที่แยกมาจากตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง *Penaeus monodon*

ยาปฏิชีวนะ	MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Number of Inhibited Strains													
	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.5	25	50	100
oxytetracycline	0	1	1	3	6	11	20	26	41	52	68	77	82	97
oxolinic acid	3	5	12	18	27	38	48	85	107	112	114	117	122	126
Norfloxacin	2	2	4	5	9	17	21	23	26	41	71	87	106	123
Chloramphenicol	0	0	0	1	1	1	1	3	30	42	87	102	128	131
Kanamycin	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	6	18

ที่มา: Ruangpan et.al. (1993)

ตารางที่ 3 ช่วงของค่า MIC ของยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิด และค่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้(IC)50 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์

ยาปฏิชีวนะ	ช่วงของค่า MIC(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		50%	90%
oxytetracycline	0.025-100	13	>100
Oxolinic acid	0.0125-100	1.2	37.5
Norfloxacin	0.0125-100	9.45	75
Chloramphenicol	0.1-100	9.45	37.5
Kanamycin	1.6-100	>100	>100

ที่มา: Ruangpan et.al.,(1993)

จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าเมื่อค่า MIC มีค่าสูงขึ้นเท่าไหร่ก็จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้หลายสายพันธุ์ขึ้นและค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนอยู่ในช่วง 0.025 ถึง มากกว่า100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่มีค่า MIC เท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอีก 97 สายพันธุ์ที่มีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในตารางที่ 3 จะเห็นว่าค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ที่ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ มากกว่า100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในยาปฏิชีวนะชนิดอื่นจะมีค่าที่แตกต่างกันไปดังที่แสดงในตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ความสัมพันธ์ของค่า MIC กับการดื้อยา

จากการศึกษาของ กันทิมาณีและคณะ (2546) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน คลอแรมฟินอล ซัลฟาเมทอกซาโซล และ แอมอกซิซิลลินของเชื้อ *Actinobacter spp.* จำนวน 979 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *Actinobacter spp.* มีเปอร์เซ็นต์การดื้อยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนสูงสุดคือ 49 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือซัลฟาเมทอกซาโซล 38 เปอร์เซ็นต์ คลอแรมฟินอล 25 เปอร์เซ็นต์และ แอมอกซิซิลลิน 11เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นสุ่มเชื้อ *Actinobacter spp.*ที่แสดงการดื้อยาชนิดต่างในระดับ clear zone กว้าง จำนวน 60 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิดคือ นอร์ฟลอกซาซิน อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน และ ซัลฟาเมทอกซาโซล ได้ผลดังตารางที่

ตารางที่ 4 ค่า MIC ของเชื้อ *Actinobacter spp.* จำนวน 60 สายพันธุ์ต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด

ยาต้านจุลชีพ	ค่า MIC (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
นอร์ฟลอกซาซีน	0.125 - 64
อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน	0.3125 - 160
ซัลฟาเมทอกซาโซล	1.0 - 10.24

ที่มา : กันทิมาณี และ คณะ(2546)

จากการทดลองจะเห็นว่าเชื้อ *Actinobacter spp.* มีการดื้อยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนสูงที่สุดและมีค่า MIC อยู่ในช่วงกว้างที่สุดด้วย ซึ่งจากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าการดื้อยาและการใช้ยามีความสัมพันธ์กันคือเมื่อเชื้อมีการดื้อยาสูงการใช้ยาในการยับยั้งแบคทีเรียหรือค่า MIC ก็จะสูงด้วย

2. ค่า MBC (Minimum Bactericidal concentration)

MBC หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยา อ็อกซีเตตร้าซัยคลีนที่สามารถทำลายหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3. ลักษณะทั่วไปของยาออกซีเต็ตต้าซัยคลีน (Oxytetracycline)

ออกซีเต็ตตราซัยคลินมีชื่อทางเคมีว่า 4-(Dimethylamino)-1,4,4,5,6,11,12a-octahydro-2,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacene carboxamideมีชื่อทางการค้าได้แก่ Glomycin, Terrafungine, Riomitsin, Hydroxytetracycline, Berkmycen, Biostat, Imperacin (Tablets), Oxacycline, Oxalats, Oxystevacin, Terrajects, Tetramxcin, Tetrmel, Tetran, Vendarcin, Vadarcin เป็นสารประกอบอนุพันธ์ (Derivative of compound) เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Disodium salt dihydrate $C_{22}H_{22}N_2Na_2O_9.2H_2O$ ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Tetracuycline เป็นยาที่ผลิตขึ้นเพื่อรักษาหรือควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่ไม่มีผลต่อพวกจุลชีพพวกยีสต์ราเมือก (moulds) ราชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นยาปฏิชีวนะที่ได้รับการยอมรับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาและยุโรปให้ใช้ได้ในสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภค ซึ่งยาในกลุ่มนี้ได้ผลิตขึ้นจากเชื้อราในตระกูล *Streptomyces* โดยมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ไม่มีกลิ่นและมีรสขมเล็กน้อย ถ้าเก็บไว้ในที่มืดจะสามารถเก็บไว้อย่างน้อย 2 ปี ที่อุณหภูมิห้องจะสูญเสียศักยภาพ ในรูปสารละลายไฮโดรคลอไรด์ที่ pH 1.0 ถึง 2.5 จะคงสภาพ (stable) อย่างน้อย 30 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส ที่ pH 3.0 ถึง 9.0 ไม่มีการสูญเสียศักยภาพ ผลึกของอ็อกซีเต็ตตร้าซัยคลีนละลายในน้ำเล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในสารละลายไฮโดรคลอไรด์ ละลายได้ในเมทธิลและเอทธิลแอลกอฮอล์ได้ปานกลาง แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์มและอีเทอร์ (ชลอ และคณะ,2534,กนกพรรณ,2536) และในการใช้ยาออ็กซีเต็ตร้าซัยคลีนจะใช้ในความเข้มข้นสูงเนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการซึมซับเข้าสู่ลำไส้ปลาได้ไม่ดีนักโดยใช้อยู่ที่ 100-150 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักปลา) (MirandaและZemelman,2002)

4. การตกค้างของอ็อกซีเต็ตตร้าซัยคลีนในแหล่งน้ำ

จากการศึกษาของ Campbell *et.al*,(2001) เกี่ยวกับการใช้ยาอ็อกซีเต็ตร้าซัยคลีนเพื่อรักษาโรคสัตว์น้ำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในฟาร์มปลา salmon *(salmon salar)* ที่มีเม่นทะเล (*Psammeechinus miliaris*) อาศัยอยู่ โดยการผสมยาในอาหาร 29 มิลลิกรัมต่อกรัม(น้ำหนักอาหาร) ให้กินเป็นเวลา 12 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อ gonad ของหอยเม่นที่อยู่ในฟาร์มซึ่งเป็นอวัยวะส่วนที่มีการสะสมของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน เพื่อศึกษาการสะสมและการลดลงของยาอ็อกซีเตต-ร้าซัยคลีน ในวันที่ 20, 40 และ 70 หลังจากที่มีการให้ยาพบว่ามีค่าอยู่ที่ 69.9 $\pm$ SD35.7 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 57.95 $\pm$ SD 26.9 ไมโครกรัมต่อกรัมและในวันที่ 70 ลดลงมีค่าอยู่ที่ 8 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับและจากการทดลองทำให้ทราบครึ่งชีวิตของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในหอยเม่นอยู่ที่ 24.6 วัน (ที่ 11-13 องศาเซลเซียส) ซึ่งผลนี้ชี้ให้เห็นว่ายามีการสูญเสียไปกับสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในแหล่งน้ำทำให้ปริมาณความเข้มข้นของยาไม่เพียงพอที่จะใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลต่อค่า MIC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนที่จะเพิ่มขึ้นในการใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Coyne *et al.* (1997;1995) ในการหาสาเหตุของการดื้อยาโดยการวิเคราะห์สิ่งที่คิดว่าน่าจะมีผลต่อการดื้อยาเช่น ในอาหารที่ให้ปลา ชั้นตะกอน และหอยสองฝา ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงฟาร์มที่มีการใช้ยาออกซีเตตร้าซัยคลีนในการรักษาหรือยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- มีการตกค้างของ ออกซีเตตร้าซัยคลีน ในหอยสองฝา (mussels) ที่มีการวิเคราะห์ โดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Samuelsen *et al.* (1992b) ซึ่งจะเห็นว่าช่วง 12 วันก่อนจะสิ้นสุดการรักษาไม่พบการตกค้างของยาเลยแต่พบค่าการตกค้างของยาสูงที่สุดในวันที่ 4 ก่อนที่จะสิ้นสุดการรักษามีค่าถึง 10.2 กรัม/ตัน น้ำหนักของหอยและในวันที่ 12 หลังจากที่มีการใช้ยาไม่มีการตรวจพบการตกค้างของยาเลย

- การตกค้าง ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีนในอาหาร เนื่องจากการใช้ยาอ็อกซีเต็ตตร้าซัยคลีนในการรักษาโรคส่วนใหญ่จะให้โดยการผสมในอาหารและจะมีอาหารบางส่วนที่ปลาไม่ได้กินจากนั้นก็จะตกตะกอนทำให้ยาบางส่วนสูญเสียไปกับอาหาร

- การตกค้าง ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน ในตะกอนจากการวิเคราะห์ตะกอนซึ่งมีการรวบรวมมาและวิเคราะห์โดยวิธีของ Coyne พบว่ามีการตกค้างของอ็อกซีเต็ตตร้าซัยคลีน พบปริมาณความเข้มข้นสูงสุดมีค่าอยู่ที่ 9.9 $\pm$ 2.9 ไมโครกรัมต่อกรัม (น้ำหนักตะกอน) ในวันที่ 4 หลังจากที่มีการใช้ยา

ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนแต่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียในแหล่งน้ำนั้นๆและย่อมส่งผลต่อการใช้ยาชนิดเดิมในแหล่งน้ำเดิมคือต้องใช้ยาในปริมาณที่สูงขึ้นนั่นคือค่า MIC ต้องเพิ่มขึ้นด้วยหรืออาจไม่มีการใช้ยาชนิดเดิมในแหล่งน้ำนั้นก็ได้เนื่องจากการใช้ยาชนิดเดิมในปริมาณที่เพิ่มขึ้นหรือใช้บ่อยจะทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย (จิตติมา และคณะ, 2541)

5. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

5.1 ***Aeromonas sorbia***

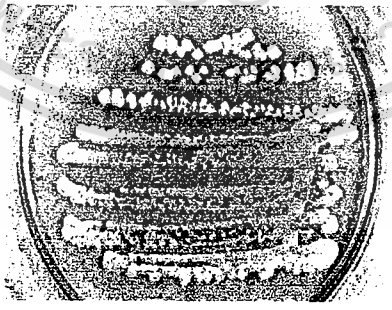
Aeromonas sobia แบคทีเรียแกรมลบไม่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นแท่งส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแส้ (flagellum) (Robert,1987) โคโลนีที่ขึ้นอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะกลมโค้งและมีผิวเรียบ เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Family Aeromonads เป็นเชื้อที่สามารถหลั่งเอนไซม์ lactamases , lipases ,hemolytic , protases ,chitinases , nucleases, และ amylases สามารถเจริญได้ในอาหาร nutrient agar (oxoid cm3)ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อสามารถแยกได้จากปลา *A.sorbia* พบครั้งแรกโดย sanarelli ในปี ค.ศ. 1891 (Roberts,1978) แต่เดิม *A.sorbia* จัดอยู่ในกลุ่ม Aeromonads ซึ่งมีอยู่สามชนิดคือ *Aeromonas punctata A. hydrophila* และ *A. liguetaciens* และในสัตว์น้ำที่มีเชื้อ *A.sorbia* จะทำให้บริเวณผิวหนังเป็นแผลขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นอาการตกเลือด (haemorrhage) จะทำให้เนื้อเยื่ออวัยวะภายในตายเนื่องจากเกิดการตกเลือดอย่างมาก ไตม้ามเกิดการบวมน้ำขยายใหญ่จะเห็นเป็นน้ำของเหลวไหลออกมาภายในช่องท้อง ซึ่งจุดสำคัญที่เกิดการตายของเนื้อเยื่อ ได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ gonad และ ตับอ่อน ผิวหนังเกิดการสึกกร่อน บริเวณหนังแท้เกิดการบวมน้ำผิวหนังชั้นนอกเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแผลเปื่อย (Roberts,1978) ดังนั้นจึงควรมีการป้องกันและรักษาไม่ให้เกิดโรคโดยการปรับปรุงสภาพแวดล้อม และทำการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำที่จะทำให้เกิดปัญหามลพิษซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. sorbia* หรืออาจมีการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีที่มีประสิทธิภาพ สามารถกำจัดและรักษาโรคได้แต่อาจมีผลกระทบต่อความอยากกินอาหารของปลา จึงควรมีการใช้ยาเท่าที่จำเป็น (Roberts,1978)

5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Family Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีขนาดใหญ่กว่า E.coli เคลื่อนที่โดยการใช้ Flagellum เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งสั้นหรือเป็นสายยาวโดยปกติจะพบตามต้นพืช ซึ่ง *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่มีรงควัตถุ pyocyanin และ pyoverdin (fluorescent) และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคในคน ซึ่งไปทำลายระบบขับถ่าย ระบบทางเดินหายใจ และทำให้เกิดโรคผิวหนังในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนแต่ไม่สามารถทำลายในเนื้อเยื่อที่แข็งหรือหนาเกินไป *P.aeruginosa* เจริญได้ในอาหารธรรมดาที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 28-30 องศาเซลเซียสและเป็นเชื้อทีมีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี ดังนั้นการเลี้ยงปลาที่หนาแน่นจนเกินไปอาจจะทำให้ปลามีอาการเฉียบพลันหรือเรื้อรังโดยติดเชื่อที่ผิวหนังหรือเนื้อเยื่ออ่อนทำให้เกิดการเปื่อยหรือเป็นแผลและมีการตกเลือดบริเวณกว้าง นอกจากนี้ยังมีผลต่ออวัยวะภายในทำให้เกิดการตกเลือด และยังเป็นพิษต่อโปรตีนทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดที่บริเวณผิวหนัง เกิดอาการบวมน้ำและแผลเปื่อยอย่างรวดเร็วดังนั้นจึงควรมีการป้องกันโดยการจัดการที่ดีมีการควบคุมในเรื่องของคุณภาพน้ำและลดการเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่น หรืออาจใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในการรักษาและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Anon, 2002)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของ *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : Anon (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 *Pseudomonas fluorescence*

P. fluorescence อยู่ใน family Pseudomonadacrae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ใช้ออกซิเจน ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำตาลกลูโคส มีลักษณะโคโลนีกลมนูนหรือแบนโปร่งแสงโคโลนีมองเห็นเป็นสีเหลืองถึงสีเหลืองปนเขียวเป็นพวก สร้างสารเรืองแสง (fluorescence) ภายใต้แสง ultra – violet เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและน้ำ โดยปกติจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของน้ำ แต่สามารถเข้าทำลายสัตว์น้ำได้ ซึ่งจะทำให้เกิดอาการเฉียบพลันถึงเรื้อรัง บริเวณผิวหนังจะเกิดการเปื่อยเป็นแผล ตกเลือดบริเวณกว้างทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ มีผลต่ออวัยวะภายในทำให้เกิดการตกเลือดและเยื่อบุช่องท้องอักเสบ ดังนั้นควรมีการป้องกันโดยมีการจัดการในด้านการเลี้ยงให้ดี และมีการควบคุมในเรื่องคุณภาพน้ำและลดการเลี้ยงอย่างหนาแน่น หรืออาจมีการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในการรักษาและกำจัดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ (Roberts,1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ
2. เครื่องชั่ง
3. Vortex mixture
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. loob และ needle
6. แอลกอฮอล์
7. เชื้อบริสุทธิ์
8. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Spectronic 401
9. กระบอกตวงขนาด 100 ml. และ 500 ml.
10. Flask
11. ฟรอยด์
12. ตู้บ่มเชื้อ
13. ตู้อบความร้อน
14. สำลี
15. Rack
16. Muller Hinton Broth ของบริษัท Oxiod co.p.o
17 Agar
18 Broth
19. NaCl
20. ยา อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน ของบริษัท SIGMA – ALDRICH co.p.o
21 น้ำกลั่น

วิธีการ

แผนการทดลอง

การทดลองนี้จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนตามลำดับคือ

1. ขั้นตอนการทดสอบหาค่า MIC ที่ความเค็มต่างกัน ดังนี้คือที่ระดับความเค็ม

0, 0.1, 0.2, 0.3,0.4 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ตามวิธีของ (ชลอ และคณะ, 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการทดสอบค่า MBC ที่ความเค็มต่างกัน ดังนี้คือที่ระดับความเค็ม

0, 0.1,0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ (ซลอ และคณะ, 2534)

วิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนการทดสอบหาค่า MIC

1.1 การเตรียม Stock เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/mlโดยเทียบกับ McFarland NO.1 ซึ่งมีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย = 3×10^8

1.1.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง

1.1.2 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบ/วินาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

1.1.3 เทอาหารส่วนบนทิ้งแล้วนำเชื้อที่ตกตะกอนไปล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำการล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง

1.1.4 เติมน้ำเกลือลงไปในปริมาณที่เพียงพอ แล้วทำการดูดเชื้อเพื่อเจือจางให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับ McFarland NO.1

1.1.5 ดูดเชื้อที่มีความขุ่นเท่า McFarland NO.1 ทำการเจือจางในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้เชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ตามที่ต้องการโดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$3 \times 10^8 \times V_1 = 1 \times 10^5 \times 30$$

$$V_1 = \frac{1 \times 10^5 \times 30}{3 \times 10^8}$$

$$V_1 = 0.01 \text{ ml}$$

ดังนั้นจะต้องดูดสารละลายเชื้อแบคทีเรียลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 29.09 มิลลิลิตร จำนวน 0.01 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพราะฉะนั้นหากต้องการเชื้อที่ใช้ในการทดลองในปริมาณต่างๆ สามารถที่ใช้สูตรนี้ในการคำนวณได้

1.2 การเตรียมความเข้มข้นของยา

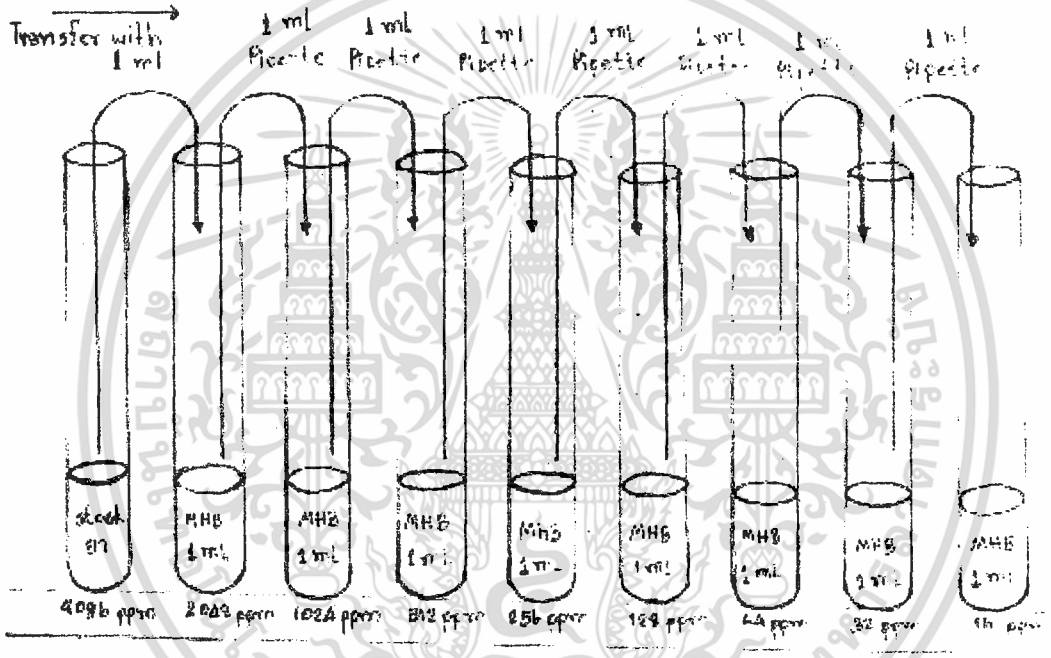
1.2.1 ยาที่ใช้เป็นยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ของบริษัท SIGMA-ALDRICH co.p.o.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2 เตรียมความเข้มข้นของยาจาก stock ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth (MHB)

1.2.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการปรับความเค็มด้วย Nacl แล้วใส่หลอดแก้วหลอดละ 1 ml. แล้วดูดยา Oxytetracycline จาก stock ที่เตรียมมา 1 ml. ใส่ลงใน Muller Hinton Broth (MHB)หลอดแรกที่เตรียมไว้ซึ่งเตรียมเป็น 4 เท่าของอาหารปกติจำนวนหนึ่งหลอดจะได้ความเข้มข้นของยาลดลงครึ่งหนึ่งแล้วทำการเจือจางความเข้มข้นสองเท่าต่อไปยัง Muller Hinton Broth (MHB)ที่เตรียมไว้เป็น 2 เท่าของอาหารปกติจนได้ความเข้มข้นต่ำสุด

(1024 → 512 → 256 → 128 → 64 → 32 → 16 → 8)



ภาพที่ 4 วิธีการเจือจาง (dilution) ความเข้มข้นของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนแบบสองเท่า (twofold) ในการเตรียมความเข้มข้นของยาที่ระดับต่างๆ

1.3 การทดสอบค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรีย

1.3.1 นำเชื้อที่เตรียมไว้ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^5 CFU/ml ปริมาตร 25-30 ml

1.3.2 ดูดเชื้อที่มีเซลล์ 10^5 CFU/ml มา 1 ml. ใส่ลงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของยาระดับต่างๆ ที่มีปริมาตร 1มิลลิลิตร จะทำให้ความเข้มข้นของยาลดลงครึ่งหนึ่ง ส่วนในหลอด control จะไม่ใส่ยา โดยการทดลองจะทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทดสอบค่า MBC(Minimum Bactericidal concentration)

2.1 หลังจากที่ทราบค่า MIC แล้วนำ Broth Dilution ที่มีค่าความเข้มข้นของยาสูงกว่าค่า MIC ซึ่งเป็น Broth Dilution ที่ใสมา 3 ระดับ โดยการใช้ loop เขี่ยเชื้อเผาไฟทิ้งให้เย็น แตะเชื้อจาก Broth Dilution ไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA (Tryptic Soy Agar)

2.2 นำ plate TSA ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 – 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกผล

การบันทึกข้อมูล

1. จดบันทึกค่า MIC โดยสังเกตจากหลอดทดลองที่ระดับความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้น ซึ่ง MHB จะใสโดยเทียบกับ control
2. จดบันทึกค่า MBC โดยสังเกต Agar ที่ระดับความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน จะทำการเปรียบเทียบหาความแตกต่างที่ระดับความเค็มต่างๆ โดยโปรแกรม spss version 10 วิธีของ Turkey

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

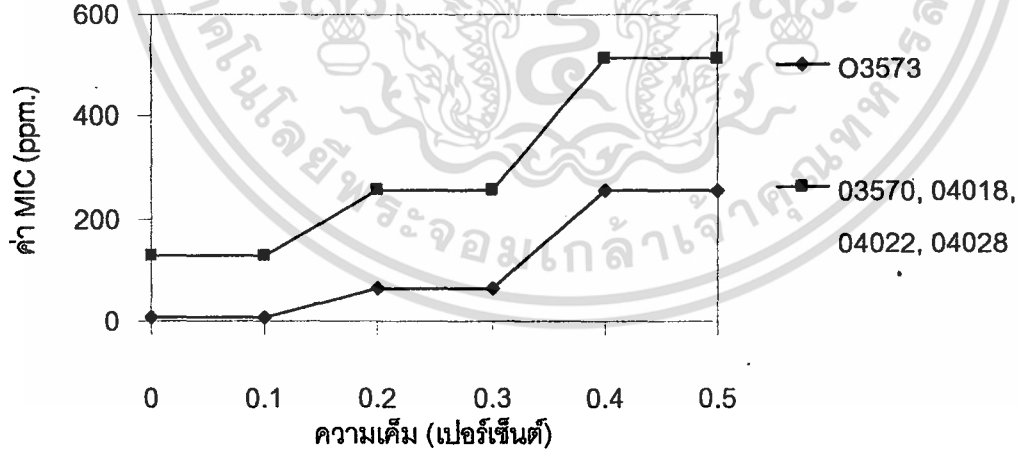
เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546– เดือนเมษายน พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ค่า MIC ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน(Oxytetracycline) ต่อเชื้อ Aeromonas sorbia 5 สายพันธ์

จากผลการทดลองตามวิธีของ ชลอ และคณะ (2534) พบว่าค่า MIC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน ที่ 24 ชั่วโมง ต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือเชื้อ ที่แยกมาจากปลาไหล (03573), ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และ ปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็มต่างๆ กันคือที่ความเค็ม 0 ,0.1 ,0.2 ,0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่าค่า MIC ที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 8 ppm. โดยพบในเชื้อ *A.sorbia* ที่แยกมาจากปลาไหล ส่วนเชื้อที่แยกมาจากปลาทอง, ปลาปอมปาดัวร์, ปลากระดี่ทอง และปลากัด มีค่า MIC อยู่ที่ 128 ppm. และที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบค่า MIC ของเชื้อที่แยกมาจากปลาไหลมีค่าอยู่ที่ 64 ppm. ส่วนเชื้อที่แยกมาจากปลาทอง, ปลาปอมปาดัวร์, ปลากระดี่ทอง และปลากัด มีค่า MIC อยู่ที่ 256 ppm. และ ที่ระดับความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบค่า MIC ของเชื้อที่แยกมาจากปลาทอง, ปลาปอมปาดัวร์, ปลากระดี่ทอง และปลากัดมีค่าอยู่ที่ 512 ppm.ส่วนเชื้อที่แยกมาจากปลาไหล มีค่า MIC อยู่ที่ 256 ppm ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นว่าค่า MIC ที่ระดับความเค็มใกล้เคียงกันจะมีค่า MIC ที่เท่ากัน เช่นที่ระดับความเค็ม 0 กับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ 0.2 กับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ 0.4 กับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพของยาจะลดลงโดยสังเกตจากค่า MIC ที่มีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่า MIC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aromonas sorbia* 5 สายพันธุ์ที่ระดับความเค็มต่างกัน* อักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

ความเค็ม(เปอร์เซ็นต์)	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย				
	ค่า MIC(ppm.)				
	03573	03570	04018	04022	04028
0	8^{ac}	128^{ad}	128^{ad}	128^{ad}	128^{ad}
0.1	8^{ac}	128^{ad}	128^{ad}	128^{ad}	128^{ad}
0.2	64^{abc}	256^{abd}	256^{abd}	256^{abd}	256^{abd}
0.3	64^{abc}	256^{abd}	256^{abd}	256^{abd}	256^{abd}
0.4	256^{bc}	512^{bd}	512^{bd}	512^{bd}	512^{bd}
0.5	256^{bc}	512^{bd}	512^{bd}	512^{bd}	512^{bd}

หมายเหตุ : อักษร a, b ในสดมภ์เดียวกันคือสัญลักษณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MIC ในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับความเค็มต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

: อักษร c, d ในแถวเดียวกันคือสัญลักษณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MIC ในเชื้อสายพันธุ์ต่างสายพันธุ์ที่ระดับความเค็มเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่าค่า MIC ของเชื้อ *Aromonas sorbia* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ระดับความเค็ม 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับค่า MIC ที่ระดับความเค็ม 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเห็นว่าที่ระดับความเค็มที่แตกต่างกันมาก คือที่ระดับความเค็ม 0 และ0.1 เปอร์เซ็นต์ กับ 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่า MIC ที่แตกต่างกันมากโดยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากที่ระดับความเค็มที่ต่างกันมากปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อย่อมแตกต่างกันมากเช่นกัน ซึ่งในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีปริมาณอิออนของ Na^+ และ Cl^- มากขึ้น อิออนเหล่านี้จะไปจับกับโมเลกุลของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนทำให้ยาเกิดการตกตะกอนทำให้ปริมาณความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) มีค่าเพิ่มมากขึ้น ดังที่ Kerry . *et al* (1996) ได้กล่าวว่า การใช้ยาในน้ำเค็มที่มีปริมาณของอิออน หรือแร่ธาตุต่างๆ ที่สูงกว่าในน้ำจืดจะทำให้ยามีการตกตะกอนมากกว่าจึงส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียในแหล่งน้ำนั้นๆ เกิดการดื้อยาและส่งผลทำให้ค่า MIC เพิ่มขึ้นด้วย และจากภาพที่ 3 จะเห็นว่า ค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหล (03573) มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ของเชื้อสายพันธุ์อื่นซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับเชื้อสายพันธุ์อื่นที่ระดับความเค็มเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในตารางที่ 5 ซึ่งเชื้อที่แยกจากปลาไหล (03573) นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเชื้อที่มีความแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์อื่น คือเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำธรรมชาติ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่แยกมาจากสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งไม่เคยมีการใช้ยามาก่อน จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่มีการดื้อยา (Tendencia and dela pena, 2002) ดังนั้นค่า MIC จึงต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นและอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่า MIC คือลักษณะทางชีวภาพของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันยังส่งผลให้ค่า MIC ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันด้วย(Kerry .*et al*, 1995)

2. ค่า MBC ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ต่อเชื้อ Aeromonas sorbia 5 สายพันธ์

ในการทดลองเพื่อหาค่า MBC ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* 5 สายพันธ์ โดยบันทึกผลการทดลองหลังจากที่บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่า MBC ของเชื้อทั้ง 5 ชนิด และที่ระดับความเค็มทุกระดับมีค่าเท่ากับค่า MIC (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบค่า MBC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aromonas sorbia* 5 สายพันธุ์ที่ระดับความเค็มต่างกัน

ความเค็ม(เปอร์เซ็นต์)	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย				
	ค่า MBC (ppm.)				
	03573	03570	04018	04022	04028
0	8^{a}	128^{a}	128^{a}	128^{a}	128^{a}
0.1	8^{a}	128^{a}	128^{a}	128^{a}	128^{a}
0.2	64^{ab}	256^{ab}	256^{ab}	256^{ab}	256^{ab}
0.3	64^{ab}	256^{ab}	256^{ab}	256^{ab}	256^{ab}
0.4	512^{b}	512^{b}	512^{b}	512^{b}	512^{b}
0.5	512^{b}	512^{b}	512^{b}	512^{b}	512^{b}

หมายเหตุ : อักษร a, b ในสดมภ์เดียวกันคือสัญลักษณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MBC ในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับความเค็มต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

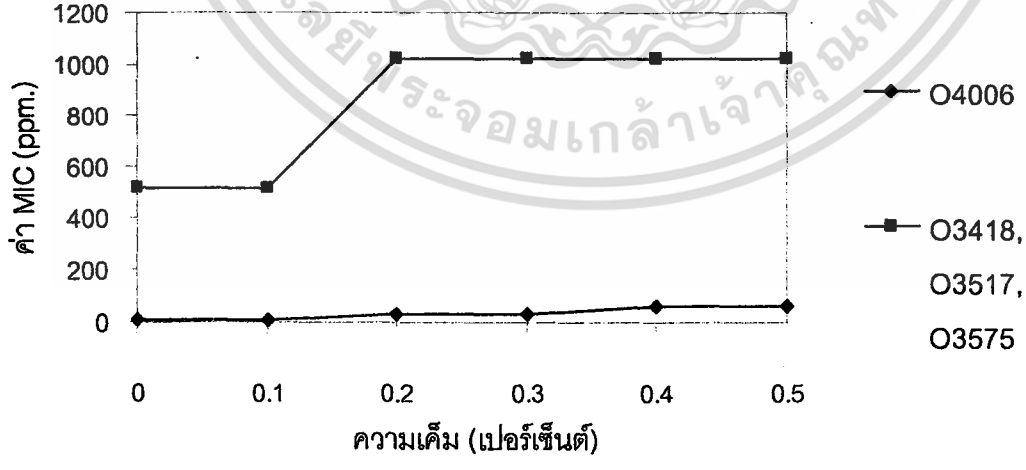
จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าค่า MBC ของเชื้อทั้ง 5 สายพันธ์ที่ระดับความเค็ม 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับค่า MBC ที่ระดับความเค็ม 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเห็นว่าที่ระดับความเค็มที่แตกต่างกันมาก คือที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กับ 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าMBC ที่แตกต่างกันมากโดยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลเหมือนกับค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MIC ที่ระดับความเค็มต่างกัน ดังที่ ชลอ และคณะ (2534) ได้กล่าวว่า ค่า MBC เป็นระดับความเข้มข้นของยาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจะมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC

3. ค่า MIC ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ต่อเชื้อ Pseudomonas aeruginosa 4 สายพันธ์

จากการทดลองหาค่า MIC ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* 4 สายพันธ์ คือเชื้อ*P. aeruginosa* ที่แยกมาจากเขียดนา (04006), เชื้อจากตะพาบม่านลาย (03418), เชื้อจากปลาม้าลาย (03517) และ เชื้อ จากปลาทอง (03575) ที่ระดับความเค็มต่างๆ กันคือที่ความเค็ม 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าค่า MIC ของเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลาย และ ปลาม้าลาย ที่ระดับความเค็ม 0และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ที่ 512 ppm. ส่วนในเชื้อ*P. aeruginosa* ที่แยกมาจากเขียดนา มีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 8 ppm. ส่วนที่ระดับความเค็ม 0.2 และ0.3 เปอร์เซ็นต์ค่า MIC ของเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลายและ ปลาม้าลาย มีค่าอยู่ที่ 1024 ppm ส่วนในเชื้อที่แยกมาจากเขียดนามีค่าอยู่ที่ 32 ppm. และที่ระดับความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ค่า MIC ของเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลาย และปลาม้าลาย มีค่าอยู่ที่ 1024 ppm. ส่วนในเชื้อที่แยกมาจากเขียดนามีค่าอยู่ที่ 64 ppm. และจะเห็นว่าค่า MIC มีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 8 ppm. ที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์และมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 1024 ppm. ที่ระดับความเค็ม 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นว่าค่า MIC ของเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลาย และปลาม้าลายมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 512 ppm. เป็น 1024 ppm. เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นจาก 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์และมีค่าคงที่จนถึงระดับความเค็มที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ส่วนในเชื้อที่แยกจากเขียดนาค่า MIC มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบค่า MIC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Psedomonas aeruginosa* 4 สายพันธุ์ที่ความเค็มระดับต่างกัน

ความเค็ม(เปอร์เซ็นต์)	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย			
	ค่า MIC(ppm)			
	04006	03418	03517	03575
0	8^{ab}	512^{ac}	512^{ac}	512^{ac}
0.1	8^{ab}	512^{ac}	512^{ac}	512^{ac}
0.2	32^{ab}	1024^{ac}	1024^{ac}	1024^{ac}
0.3	32^{ab}	1024^{ac}	1024^{ac}	1024^{ac}
0.4	64^{ab}	1024^{ac}	1024^{ac}	1024^{ac}
0.5	64^{ab}	1024^{ac}	1024^{ac}	1024^{ac}

หมายเหตุ : อักษร a ในสดมภ์เดียวคือสัญลักษณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MIC ในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับความเค็มต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

: อักษร b, c ในแถวเดียวกันคือสัญลักษณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MIC ในเชื้อต่างสายพันธุ์กันที่ระดับความเค็มเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 7 จะเห็นว่าค่า MIC ที่ระดับความเค็มต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่างจากค่า MIC ของเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กับ 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเชื้อทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันทางลักษณะกายภาพและชีวภาพจึงทำให้การต่อต้านและความไวต่อยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่างกัน จึงส่งผลต่อค่า MIC ให้มีค่าแตกต่างกันด้วย (Miranda and Zemelman,2002) และในภาพที่ 4 จะเห็นว่าประสิทธิภาพของยาลดลงเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นซึ่งเห็นได้ชัดเจนในเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลาย และปลาม้าลาย โดยสังเกตจากค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น ส่วนในเชื้อที่แยกจากเขียดนา (04006) มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ของเชื้อสายพันธุ์อื่นซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) เนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกจากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งไม่เคยมีการใช้ยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนมาก่อนจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่มีการดื้อยา ดังนั้นค่า MIC จึงมีค่าต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ เจ้าคุณทหาร

4. ค่า MBC ของ อ็อกซีเตตร้าซัยคลีน(Oxytetracycline) ต่อเชื้อ Pseudomonas aeruginosa 4 สายพันธ์

ในการทดลองเพื่อหาค่า MBC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีน (Oxytetracycline) ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* 5 สายพันธ์ โดยบันทึกผลหลังจากที่บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่า MBC ของเชื้อทั้ง 5 สายพันธ์ มีค่ามากกว่าค่า MIC ที่ทุกระดับความเค็ม (ตารางที่ 8) และที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ในเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลายและ ปลาม้าลาย พบว่ามีค่าอยู่ที่ 1024 ppm. ส่วนในเชื้อ ที่แยกมาจากเขียดนา มีค่าต่ำสุดคือมีค่าอยู่ที่ 64 ppm. ที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ในเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลายและปลาม้าลาย มีค่า MBC อยู่ที่ 2048 ppm. ส่วนในเชื้อที่แยกมาจากเขียดนามีค่าอยู่ที่ 128 ppm และที่ระดับความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลายและปลาม้าลาย มีค่า MBC อยู่ที่ 2048 ppm. ส่วนในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกมาจากเขียดนามีค่า MBC อยู่ที่ 256 ppm. ซึ่งจะเห็นว่าค่า MBC มีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 64 ppm. ที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์และมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 2048 ppm. ที่ระดับความเค็ม 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบค่า MBC ของอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Psedomonas aeruginosa* 4 สายพันธุ์ที่ความเค็มต่างกัน

ความเค็ม(เปอร์เซ็นต์)	ชนิดเชื้อแบคทีเรีย			
	ค่า MBC(ppm)			
	04006	03418	03517	03575
0	64[a]	1024[a]	1024[a]	1024[a]
0.1	64[a]	1024[a]	1024[a]	1024[a]
0.2	128[ab]	2048[a]	2048[a]	2048[a]
0.3	128[ab]	2048[a]	2048[a]	2048[a]
0.4	256[b]	2048[a]	2048[a]	2048[a]
0.5	256[b]	2048[a]	2048[a]	2048[a]

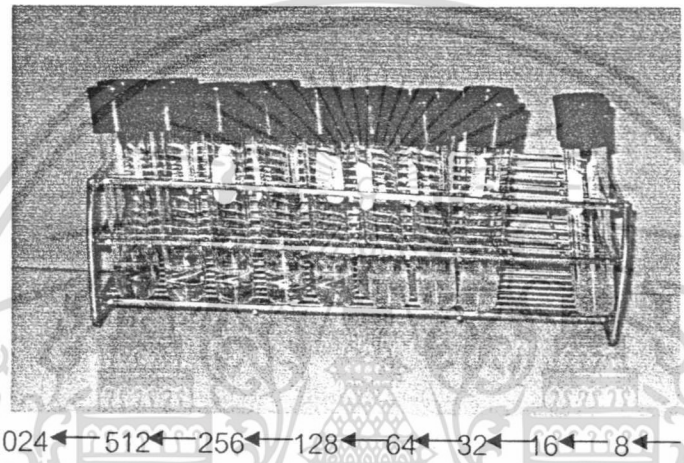
หมายเหตุ : อักษร a, b ในสดมภ์เดียวกันคือสัญลักษณ์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MBC ในเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่ระดับความเค็มต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากตารางจะเห็นว่าค่า MBC ของเชื้อที่แยกจากปลาทอง ตะพาบม่านลายและปลาม้าลาย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ ในเชื้อที่แยกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

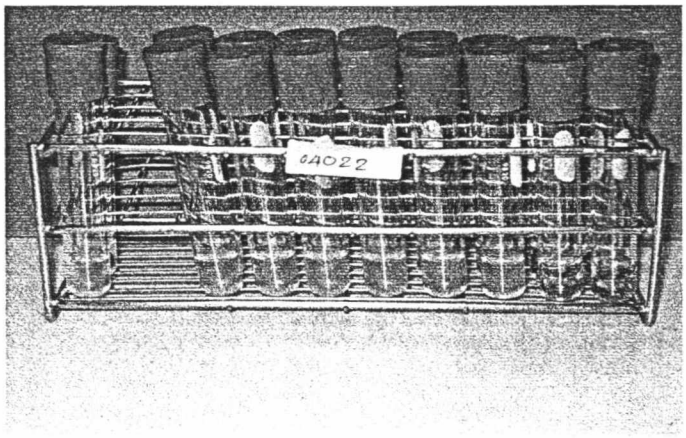
เขียดนา พบว่าค่า MBC ที่ระดับความเค็ม 0, 0.1, 0.2 และ0.3 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับค่า MBC ที่ระดับความเค็ม 0.2, 0.3, 0.4 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเห็นว่าที่ระดับความเค็ม 0 และ0.1เปอร์เซ็นต์ กับ 0.4 และ0.5 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ ค่า MIC ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ชนิดของปลาและสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำนั้นๆ (ชลอ และคณะ, 2534)

5. ผลการอ่านค่า MIC



ภาพที่ 5 การอ่านค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหลที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 64 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



control → 4 → 8 → 16 → 32 → 64 → 128 → 256 → 512

ภาพที่ 6 การอ่านค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลากระดี่ทอง ที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 256 ppm.

จากภาพที่ 4 และ 5 จะเห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่อาหารใสเมื่อเปรียบเทียบกับ control คือค่า MIC ซึ่งในเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีค่าไม่เท่ากันถึงแม้จะอยู่ที่ระดับความเค็มเดียวกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความไวหรือการต้านยาของเชื้อนั้นๆ (ชลอ และคณะ, 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

1. ค่า MIC ของยาอ็อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ที่ 8 – 128 ppm. และที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ในช่วง 64 - 256 ppm. ส่วนที่ระดับความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าอยู่ที่ 512 ppm. และ ค่า MIC ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ระดับความเค็ม 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ที่ 8 – 512 ppm. และที่ระดับความเค็ม 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอยู่ในช่วง 32 - 1024 ppm. ส่วนที่ระดับความเค็ม 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าอยู่ที่ 64 – 1024 ppm.

2. เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพของยาจะลดลงโดยสังเกตจากค่า MIC ของยาในเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้จะมีค่าใกล้เคียงกันที่ระดับความเค็ม 0 - 0.1, 0.2 - 0.3 และ 0.4 – 0.5 เปอร์เซ็นต์

3. ค่า MIC ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ มีค่าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้ออาศัยอยู่ และลักษณะทางชีวภาพรวมถึงความคุ้นเคยของเชื้อต่อยาของเชื้อนั้นๆ

4. ในการใช้ยาปฏิชีวนะกับเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้ผลดีนั้นควรมีการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นก่อน และไม่ควรใช้ยาชนิดเดิมซ้ำๆ กัน เพราะเชื้อแบคทีเรียจะมีการดื้อยาได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ควรมีการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดลองอย่างละเอียด

2. เชื้อที่นำมาทดสอบค่า MIC ของยาควรเป็นเชื้อที่นำมาจาก stock เดียวกันและควรทำพร้อมๆกัน เพื่อป้องกันการปรับตัวเองของเชื้อ

3. เชื้อที่ใช้ทดสอบควรเลี้ยงอยู่ในอาหารระยะ exponential phase และควรทำให้เสร็จสิ้นภายใน 1 – 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเลี่ยนแปลงทางเคมีของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกพรรณ ศรีมโนภาษ. 2536. การตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะตกค้าง (Oxytetracycline) โดยวิธีทางจุลชีพวิทยาในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง.ฝ่ายตรวจรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ; กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ; กรมประมง; เกษตรกลางจตุจักร, กรุงเทพ.103 น.

กันทิมาณี พันธุ์วิเชียร, เต็มดวง สมศิริ, สุปราณี ชินบุตร และ ธวัชชัย แก้วมาก. 2546. การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Actinobacter spp.* ในฟาร์มเลี้ยงปลาแบบผสมผสาน. วารสารการประมง. 56 (4) : 353 - 359.

จิตติมา เขี้ยวแก้ว, เต็มดวง สมศิริ และ สุปราณี ชินบุตร. 2541. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในปลาดุกลูกผสมและปลาช่อนจากบ่อเลี้ยงในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรครั้งที่ 36 บทคัดย่อ 3-5 . สำนักหอสมุดมหาวิทยาลัยเกษตร . 297 น.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, พรเลิศ จันทร์รัชกูล, พิกุล จิรวาณิชไพศา และ สุวรรณา เบญจธรรมนนท์. 2534. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดจากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรครั้งที่ 29 รายวานผลการวิจัยสาขาสัตว์ ประมง 4-7. สำนักหอสมุดมหาวิทยาลัยเกษตร. 87 น.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอร์โรปส์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 67 หน้า.

ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, วีระวุฒิ มหามนตรี และ วนิดา โพธารามิก. 2526 . การศึกษานิเวศวิทยาของเชื้อ *Aeromonas hydrophilya* strain F 588. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 101น.

ลิลา เรืองแป้น. 2528 . ความเข้มข้นต่ำสุดของสารเคมีที่สามารถระงับการเจริญของแบคทีเรีย 4 สกุล ที่แยกจากปลาเป็นโรคระบาด. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 23 สาขาประมง ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บทคัดย่อ 5-7, สำนักหอสมุดมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.193 น.

สิทธิ บุญรัตนผลิน, จิราพร เกษตรจันทร์, สถาพร ดิเรกบุษราตม, ฮาวารียะห์ เรืองปราชญ์ และ กิจการ ศุภามตย์. 2526. ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคสัตว์น้ำ. วารสารการประมง. 36(3) : 247 – 255 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2527. ผลของอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Aeromonas sp.* และ NON-01 *vibrio chloerae*. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 7(3) : 119 - 123.

Anon. 2002. Pseudomonas aeruginosa. http://www.bact.wisc edu / Bact 330 // ecturepseudomonas

Campell, D.A., P. Pantazis and M.S. Kelly. 2001. Impact and residence time of oxytetracycline in the sea urchin, *Psammechinus miliaris*, a potential aquaculture species. Aquaculture 202. 73-87.

Coyne, R., M. Hiney and P. Smith . 1997. Transient presence of Oxytetracycline in blue mussels (*Mytitus edulis*) following its therapeutic use at a marine Atlantic salmon farm. Aquaculture 149 : 175-181.

Kerry, J., M. Hiney, R. Coyne, S. NicGabhainn, D. Gilroy, D. Cazabon and P. Smith. 1995 .Fish feed as a source of Oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. Aquaculture 131 : 101-113.

Kerry,J., M. Slattery, S.Vaughan and P. Smith.1996 .The importance of bacterial multiplication in the selection, by Oxytetracycline –HCl, of Oxytetracycline-resistant bacteria in marine sediment microcosms. Aquaculture 144 : 103-119.

Lorian, V. E. 1991. Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd edition. Williams & Wilkins. Tokyo. 1248p.

Miranda, C.D. and R.Zemelman.2002. Bacteria resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. Aquacuture 212 : 31-47.

Pursell, L., T. Dineen, J. Kerry, S. Vaughan and P. Smith. 1996. The biological significance of breakpoint concentration of Oxytetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. Aquaculture145 : 21-30.

Roberts, R.J. 1978. Fish pathology. Bailliere Tindall. London. 318 p.

Ruangpan,L.,S. Prapadsorn.and K. Sangrungruang.2539. Minimal Inhibitory Concentration of 5 Chemotherapeutants against *Vibrio* Bacteria and Their Transferring of R-Plasmid. วารสารการประมง ปีที่ 49 . ฉ.1-6. 495-499.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tendencia, E.A.and L.D.dela Pena.2002. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 213. 1-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ค่า MIC ของยาออ็กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหล (03573) , ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.0 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03573	03570	04018	04022	04028
2048	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-
64	-	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+
16	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+
ค่า MBC	8 ppm.	128 ppm.	128 ppm.	128 ppm.	128 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหล (03573) , ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.1 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03573	03570	04018	04022	04028
2048	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-
64	-	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+
16	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+
ค่า MBC	8 ppm.	128 ppm.	128 ppm.	128 ppm.	128 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 ค่า MIC ของยาอ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหล (03573) , ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0..2 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03573	03570	04018	04022	04028
2048	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-
128	-	+	+	+	+
64	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+
ค่า MBC	64 ppm.	256 ppm.	256 ppm.	256 ppm.	256 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหล (03573) , ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.3 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03573	03570	04018	04022	04028
2048	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-
128	-	+	+	+	+
64	-	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+
ค่า MBC	64 ppm.	256 ppm.	256 ppm.	256 ppm.	256 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจากปลาไหล (03573) , ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.4 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03573	03570	04018	04022	04028
2048	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+
ค่า MBC	512 ppm.	512 ppm.	512 ppm.	512 ppm.	512 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Aeromonas sorbia* ที่แยกจาก ปลาไหล (03573) , ปลาทอง (03570), ปลาปอมปาดัวร์ (04018), ปลากระดี่ทอง (04022) และ ปลากัด (04028) ที่ระดับความเค็ม 0.5 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03573	03570	04018	04022	04028
2048	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
Control	+	+	+	+	+
ค่า MBC	512 ppm.	512ppm.	512 ppm.	512 ppm.	512 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) , ตะพาบม่านลาย (03418) , ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.0 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03575	03418	03517	04006
2048	-	-	-	-
1024	-	-	-	-
512	-	-	-	-
256	+	+	+	-
128	+	+	+	-
64	+	+	+	-
32	+	+	+	-
16	+	+	+	-
8	+	+	+	-
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
control	+	+	+	+
ค่า MBC	1024 ppm.	1024 ppm.	1024 ppm.	64 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 8 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) , ตะพาบม่านลาย (03418) , ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.1 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03575	03418	03517	04006
2048	-	-	-	-
1024	-	-	-	-
512	-	-	-	-
256	+	+	+	-
128	+	+	+	-
64	+	+	+	-
32	+	+	+	-
16	+	+	+	-
8	+	+	+	-
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
control	+	+	+	+
ค่า MBC	1024 ppm.	1024 ppm.	1024 ppm.	64 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 9 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) ,ตะพาบม่านลาย (03418) ,ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0..2 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03575	03418	03517	04006
2048	-	-	-	-
1024	-	-	-	-
512	+	+	+	-
256	+	+	+	-
128	+	+	+	-
64	+	+	+	-
32	+	+	+	-
16	+	+	+	+
8	+	+	+	+
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
control	+	+	+	+
ค่า MBC	2048 ppm.	2048 ppm.	2048 ppm.	128 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 10 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) , ตะพาบม่านลาย (03418) , ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.3 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03575	03418	03517	04006
2048	-	-	-	-
1024	-	-	-	-
512	+	+	+	-
256	+	+	+	-
128	+	+	+	-
64	+	+	+	-
32	+	+	+	-
16	+	+	+	+
8	+	+	+	+
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
control	+	+	+	+
ค่า MBC	2048 ppm.	2048 ppm.	2048 ppm.	128 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 11 ค่า MIC ของยาออ๊กซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) , ตะพาบม่านลาย (03418) , ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.4 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03575	03418	03517	04006
2048	-	-	-	-
1024	-	-	-	-
512	+	+	+	-
256	+	+	+	-
128	+	+	+	-
64	+	+	+	-
32	+	+	+	+
16	+	+	+	+
8	+	+	+	+
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
control	+	+	+	+
ค่า MBC	2048 ppm.	2048 ppm.	2048 ppm.	256 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 12 ค่า MIC ของยาอ๊อกซีเตตร้าซัยคลีนต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกจากปลาทอง (03575) , ตะพาบม่านลาย (03418) , ปลาม้าลาย (03517) และเขียดนา (04006) ที่ระดับความเค็ม 0.5 %

ความเข้มข้นของยา (ppm.)	03575	03418	03517	04006
2048	-	-	-	-
1024	-	-	-	-
512	+	+	+	-
256	+	+	+	-
128	+	+	+	-
64	+	+	+	-
32	+	+	+	+
16	+	+	+	+
8	+	+	+	+
4	+	+	+	+
2	+	+	+	+
control	+	+	+	+
ค่า MBC	2048 ppm.	2048 ppm.	2048 ppm.	256ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้