

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่มีรูปแบบการดื้อยา  
แบบ Multidrug resistance (MDR) จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล  
(*Oreochromis niloticus*)

ISOLATION OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) GRAM-  
NEGATIVE BACTERIA FROM WATER OF NILE TILAPIA  
(*Oreochromis niloticus*) FARM

ประกาศิษย์ แทนวันชัย  
พัชรี ใจสนิท

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่มีรูปแบบการดื้อยา  
แบบ Multidrug resistance (MDR) จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล  
(*Oreochromis niloticus*)

ISOLATION OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) GRAM-  
NEGATIVE BACTERIA FROM WATER OF NILE TILAPIA  
(*Oreochromis niloticus*) FARM

ประกาศิษย์ แทนวันชัย  
พัชรี ใจสนิท

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

ISOLATION OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) GRAM-  
NEGATIVE BACTERIA FROM WATER OF NILE TILAPIA  
(*Oreochromis niloticus*) FARM

PRAKASIT THANWANCHAI  
PATCHAREE JAISANIT

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

หัวข้อโครงการพิเศษ การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่มีรูปแบบการดื้อยาแบบ Multidrug resistance (MDR) จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*)  
Isolation of Multidrug Resistance (MDR) Gram-Negative Bacteria From Water of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Farm

ชื่อนักศึกษา นายประกาศิษย์ แทนวันชัย รหัสนักศึกษา 57050845  
นางสาวพัชรี ใจสนิท รหัสนักศึกษา 57050863




ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ประจำปีการศึกษา 2560

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่มีรูปแบบการดื้อยาแบบ Multidrug resistance (MDR) จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล ( <i>Oreochromis niloticus</i> )		
ชื่อนักศึกษา	นายประกาศิษย์ แทนวันชัย	รหัสนักศึกษา	57050845
	นางสาวพัชรี ใจสนิท	รหัสนักศึกษา	57050863
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ		

### บทคัดย่อ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเกษตรกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาและควบคุมการระบาดของโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในปลานิล ส่งผลทำให้มีรายงานเกี่ยวกับการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในฟาร์มเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียง ซึ่งงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะตรวจสอบการปรากฏของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปแบบการดื้อยาแบบ Multidrug resistance (MDR) ที่ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิล ซึ่งผลจากการทดสอบรูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิลจำนวน 16 ไอโซเลท ด้วยวิธี Kirby Bauer Disk Diffusion พบว่า เชื้อที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 10 ไอโซเลท มีรูปแบบการดื้อยาแบบ MDR และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีอัตราการดื้อสูงสุดต่อยา Erythromycin ในขณะที่เชื้อที่ใช้ในการทดสอบมีความไวต่อยา Norfloxacin สูงที่สุด

**คำสำคัญ :** แบคทีเรียแกรมลบ ปลานิล ยาปฏิชีวนะ Multidrug resistance (MDR)

Title	Isolation of Multidrug Resistance (MDR) Gram-Negative Bacteria From Water of Nile Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Farm
Students	Mr. Prakasit Thanwanchai Student ID 57050845 Miss Patcharee Jaisanit Student ID 57050863
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr. Karn Wongsariya

### Abstract

Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is not only the most important fish in freshwater fish economy but also have the largest portion in freshwater fish production. However, it is found that breeders normally use the antibiotics to treat and control the spread of infectious diseases caused by bacteria in Nile Tilapia. Consequently, the emergences of antibiotic resistant bacteria which are contaminated in farm and surrounding environment have been reported. This research aims to detect the presence of Multidrug resistance (MDR) pattern from Gram-negative bacteria, which are isolated from Nile Tilapia by using Kirby Bauer Disk Diffusion method. The result demonstrates that 10 isolates out of 16 isolates exhibit antibiotic resistance with MDR pattern. Furthermore, the tested bacteria show the highest resistance to Erythromycin, in the other hand, the highest sensitivity for inhibiting the growth of tested bacteria is obtained from Norfloxacin.

**Keywords :** Antibiotic, Gram-negative bacteria, Multidrug resistance (MDR), Nile tilapia

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์อย่างสูงจาก ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้กรุณาสละเวลาให้โอกาส ความรู้ คำปรึกษา และแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้นและเอื้อเฟื้อในส่วนของผู้ปรารถนาต่างๆที่จำเป็นและเกี่ยวข้องกับการทดลองในครั้งนี้ ตลอดจนกรุณาตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จออกมาเป็นรูปเล่มที่สมบูรณ์เรียบร้อย ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วรกฤต วรรณทกิจ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ ผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ได้นำมาใช้ทดสอบเป็นส่วนสำคัญ และให้คำแนะนำ การดำเนินการ และการพิจารณาโครงการพิเศษเป็นไปอย่างสมบูรณ์เรียบร้อย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการโครงการพิเศษที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำทั้งทางทฤษฎีและปฏิบัติ รวมถึงได้กรุณาสละเวลาตรวจทานและพิจารณาโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จเรียบร้อย ด้วยความเสียสละ เห็นความสำคัญ และน้ำใจอันดียิ่งต่อโครงการพิเศษและผู้วิจัย

รวมทั้งคณาจารย์ภาควิชาและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมืออย่างถูกต้องเหมาะสม สิ่งดีๆเหล่านี้ที่ทุกๆท่านได้ให้ความกรุณาในเรื่องต่างๆ ผู้วิจัยซาบซึ้งในไมตรีจิต และจะเก็บความทรงจำนี้ตลอดไป

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ไม่มากนักน้อย จึงขอบูชาแต่พระคุณบิดา มารดา บุรพจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนทำให้ได้งานวิจัยที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และผู้ที่ได้ให้ความสนใจโดยทั่วไป หากมีข้อบกพร่องที่อาจเกิดขึ้นหรือผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดด้วยความจริงใจแต่เพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกๆท่านที่ได้มีโอกาสศึกษางานวิจัยนี้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยสืบต่อไป

ประกาศิชย์    แทนวันชัย  
พัชรี            ใจสนิท

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 การจัดจำแนกยาปฏิชีวนะตามโครงสร้างทางเคมี.....	3
2.1.1 ยากลุ่ม Penicillins.....	3
2.1.2 ยากลุ่ม Cephalosporins.....	3
2.1.3 ยากลุ่ม Aminoglycosides.....	4
2.1.4 ยากลุ่ม Sulfonamides.....	4
2.1.5 ยากลุ่ม Quinolones.....	5
2.1.6 ยากลุ่ม Macrolides.....	6
2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ.....	6
2.2.1 กลุ่มที่มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (Cell wall) ของแบคทีเรีย.....	6
2.2.2 กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของแบคทีเรีย.....	6
2.2.3 กลุ่มที่มีผลยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ของแบคทีเรีย.....	7
2.2.4 กลุ่มที่มีผลขัดขวางการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย.....	7
2.2.5 กลุ่มที่มีผลขัดขวางขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism).....	7
2.3 กลไกในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย.....	7
2.3.1 การนำยาออกจากเซลล์.....	7
2.3.2 การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา.....	8
2.3.3. การลดการนำยาเข้าภายในเซลล์.....	8

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.4 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ.....	8
2.4.1 Multidrug resistance (MDR).....	8
2.4.2 Extreme drug resistance (XDR) .....	8
2.4.3 Pandrug resistance (PDR) .....	8
2.5 กลไกการถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย.....	8
2.5.1 Intrinsic resistance .....	9
2.5.2 Acquired resistance.....	9
2.5.2.1 แบคทีเรียเกิดมิวเทชัน (mutation) .....	9
2.5.2.2 แบคทีเรียได้รับยีนต้านทานยาปฏิชีวนะมาจากแบคทีเรียเซลล์อื่น.....	9
2.6 อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อที่ปนเปื้อนจากฟาร์มสัตว์น้ำและปลานิล .....	10
2.7 เทคนิคการคัดแยกเชื้อ และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์.....	10
2.7.1 Streak plate technique .....	10
2.7.2 Spread plate technique .....	11
2.7.3 Pour plate technique .....	11
2.8 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย .....	12
2.8.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี.....	12
2.8.1.1 TSI (Triple Sugar Iron Agar) .....	12
2.8.1.2 Motility Test .....	12
2.8.1.3 Catalase Test .....	12
2.8.2 การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย .....	13
2.9 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ.....	13
2.9.1 การวัดความไวของแบคทีเรียแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์.....	13
2.9.2 การความไวของแบคทีเรียแบบปริมาณวิเคราะห์ .....	13
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	14
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>16</b>
3.1 สารเคมี.....	16
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....	16
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	17
3.4 แผ่นยาปฏิชีวนะที่ใช้.....	18
3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....	18

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย .....	18
3.5.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น .....	18
3.5.3 การตรวจสอบลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ .....	19
3.5.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น .....	19
3.5.4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล.....	19
3.5.4.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) .....	19
3.5.4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่.....	20
3.5.5 การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย.....	20
3.5.6 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ.....	20
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย .....</b>	<b>21</b>
4.1 ผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง.....	21
4.2 ผลลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	21
4.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี .....	26
4.3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล.....	26
4.3.2 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ .....	28
4.3.3 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) .....	30
4.4 ผลการทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย .....	33
4.5 ผลการจัดจำแนกเชื้อ .....	34
4.6 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ .....	34
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>40</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	40
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	40
เอกสารอ้างอิง .....	41
ภาคผนวก.....	46
ภาคผนวก ก.....	47
ภาคผนวก ข.....	50
ภาคผนวก ค.....	54
ภาคผนวก ง .....	56
ภาคผนวก จ.....	60

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง NA และลักษณะการ เรียงตัว การติดสี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา นิล .....	22
4.2 การทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จาก น้ำฟาร์มเลี้ยงปลา นิล .....	27
4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา นिल ในอาหาร Motility medium.....	29
4.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา นิล.....	31
4.5 การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่แยกได้จากเชื้อที่แยกได้จากน้ำฟาร์ม เลี้ยง ปลา นิล.....	33
4.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยง ปลา นิล .....	35
4.7 รูปแบบการต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา นิล .....	38

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ Penicillins.....	3
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Cephalosporins.....	4
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides และ Gentamicin.....	4
รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamides .....	5
รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Quinolones และ Fluoroquinolone.....	5
รูปที่ 2.6 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ Erythromycin .....	6
รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็ง .....	11
รูปที่ 2.8 แสดงวิธีการ Cross streak plate.....	18

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
μg	Microgram
Amp	Ampicillin
BaCl <sub>2</sub>	Barium chloride
BGLB	Brilliant Green Lactose Bile Broth
BHI	Brain Heart Infusion agar
Cef	Cefoxitin
Ery	Erythromycin
Gen	Gentamicin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen Peroxide
H <sub>2</sub> S	Hydrogen Sulfide
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfuric acid
MDR	Multidrug resistance
MHA	Mueller Hinton Agar
NA	Nutrient agar
NaCl	Sodium chloride
Nor	Norfloxacin
°C	Degree Celsius
Sul	Sulphamethoxazole/Trimethoprim
TSI	Triple sugar iron agar

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงและบริโภค ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยมีมูลค่าผลผลิตต่อปีสูงที่สุดในประเทศไทย จากความต้องการที่มีปริมาณสูงทำให้เกษตรกรมีการเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์กันมากขึ้น โดยการเลี้ยงปลาในอัตราความหนาแน่นสูง ส่งผลต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อคุณภาพของน้ำในบ่อเลี้ยงรวมถึงปัญหาโรคที่มากับน้ำ ส่งผลให้ปลานิลเกิดความเครียด อ่อนแอ และติดเชื้อได้ง่ายขึ้น (กรมประมง, 2556) โดยแบคทีเรียที่มักทำให้เกิดโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจในสัตว์น้ำจืด ได้แก่ สกุล *Aeromonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เกษตรกรได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกัน ควบคุม และรักษาโรคติดเชื้ออย่างไม่เหมาะสม (นิธิมา และคณะ, 2558) ส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ซึ่งเชื้อจะเกิดการดื้อยาขึ้นได้ต่อเมื่อแบคทีเรียสัมผัสกับยาปฏิชีวนะมาเป็นเวลานาน การพบเชื้อดื้อยาในบ่อน้ำเลี้ยงปลานิลไม่เพียงแต่ทำให้ยากแก่การรักษาโรคปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอื่นๆ อีกด้วย (วิษณุ, 2560)

จากปัญหาความรุนแรงของโรคและการดื้อยาปฏิชีวนะบางตัวในการรักษาโรคในสัตว์น้ำ ทำให้คณะผู้วิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการตรวจสอบความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำเลี้ยงปลานิล ซึ่งการทราบความชุกและแนวโน้มของการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในประเทศไทยมีประโยชน์มากในการนำไปใช้เป็นแนวทางรณรงค์การควบคุมและป้องกันการดื้อยาปฏิชีวนะ และยังใช้เป็นข้อมูลติดตามประเมินประสิทธิผลของการควบคุมและป้องกันการดื้อยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนที่มีรูปแบบการดื้อยาแบบ Multidrug resistance (MDR) ที่ปนเปื้อนจากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล
- 2) เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาแบบ MDR ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนที่คัดแยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง ศึกษารูปร่าง การเรียงตัว การติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และรวมถึงการจัดจำแนกเชื้อเบื้องต้นโดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล การทดสอบการสร้างเอนไซม์ คะตะเลส (catalase) การทดสอบการเคลื่อนที่ และการทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และสุดท้ายการศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อ โดยใช้วิธี Disk diffusion

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) เพื่อให้ทราบถึงการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา
- 2) เพื่อทราบถึงรูปแบบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนที่ปนเปื้อนในน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา

## บทที่ 2

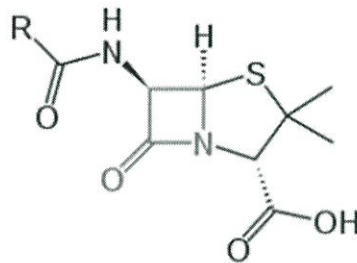
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 การจัดจำแนกยาปฏิชีวนะตามโครงสร้างทางเคมี

หากแบ่งยาปฏิชีวนะตามสูตรโครงสร้างทางเคมีของยา (Classification on chemical structure) สามารถแบ่งย่อยได้ ดังนี้

#### 2.1.1 ยากลุ่ม Penicillins

มีโครงสร้างทางเคมีของ beta-lactam ring ต่อกับ thiazolidine ring (รูปที่ 2.1) ซึ่งการเปลี่ยนแปลง side chain ทำให้ได้อนุพันธ์ต่างๆซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างออกไป เช่น ทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อการทำลายด้วยเอนไซม์ beta-lactamase และ ขยายขอบข่ายการออกฤทธิ์ โดยพวกที่จัดเป็น broad spectrum ออกฤทธิ์ต่อการสร้างผนังเซลล์ซึ่งมีผลต่อเชื้อทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด ยกตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น Ampicillin Amoxicillin Hetacillin Pivamcillin และ Cyclacillin (สุวณี และมาลัย, 2536)

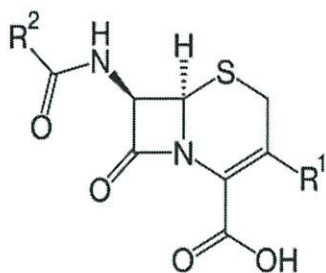


รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ Penicillins

(ที่มา : Holten and Onusko, 2000)

#### 2.1.2 Cephalosporins

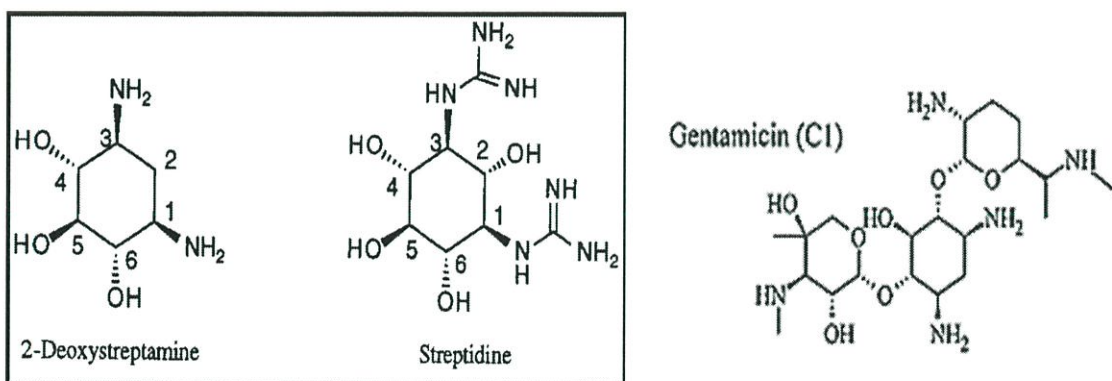
เป็นยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น beta-lactamdihydrothiazine ring (รูปที่ 2.2) ออกฤทธิ์ต่อการสร้างผนังเซลล์ มีความใกล้เคียงกับ Penicillins มากแต่สามารถทนต่อ beta-lactamase ได้ดีกว่า เนื่องจากมีการดัดแปลงที่ side chain เพื่อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยจัดเป็นพวก broad spectrum มีผลต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยกตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น Cefadroxil Cefazolin Cefoxitin Cefuroxime และ Cefoperazone (สุวณี และมาลัย, 2536)



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Cephalosporins  
(ที่มา : Pegler and Healy, 2007)

### 2.1.3 ยากลุ่ม Aminoglycosides

มีโครงสร้างทางเคมีพื้นฐาน คือ aminocyclitol มีโครงสร้างเป็นวงแหวนรูป 6 เหลี่ยม ประกอบด้วย amino และ hydroxyl groups ตำแหน่งของ amino groups จะมีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อของยาในกลุ่มนี้ ยาในกลุ่ม aminoglycosides ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างของ aminocyclitol เป็น 2-deoxystreptamine ยกเว้นยา streptomycin ที่มีโครงสร้างของ aminocyclitol เป็น streptidine (รูปที่ 2.3) และสามารถจับกับ 30S subunit ของไรโบโซม และออกฤทธิ์ด้วยการทำให้มีการแปลรหัสการสังเคราะห์โปรตีนผิดในเซลล์แบคทีเรีย จัดเป็นพวก broad spectrum ยาในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ให้ผลดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยกตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น Streptomycin Neomycin Framycetin (Neomycin B) Paromomycin Kanamycin Gentamicin และ Amikacin (ศิริลักษณ์ และเพลินจันทร์, 2555)



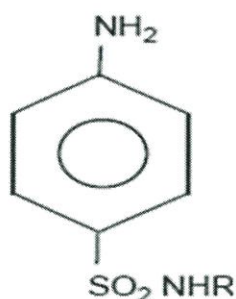
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides และ  
Gentamicin

(ที่มา: Zembower TR et al., 1998)

### 2.1.4 ยากลุ่ม Sulfonamides

เป็นยาสังเคราะห์ สูตรโครงสร้างประกอบด้วย benzene ring ที่มี amino group (-NH<sub>2</sub>) และ sulfone group (-SO<sub>2</sub>-) (รูปที่ 2.4) ซึ่งสูตรโครงสร้างของ sulfanilamide คล้ายกับ PABA

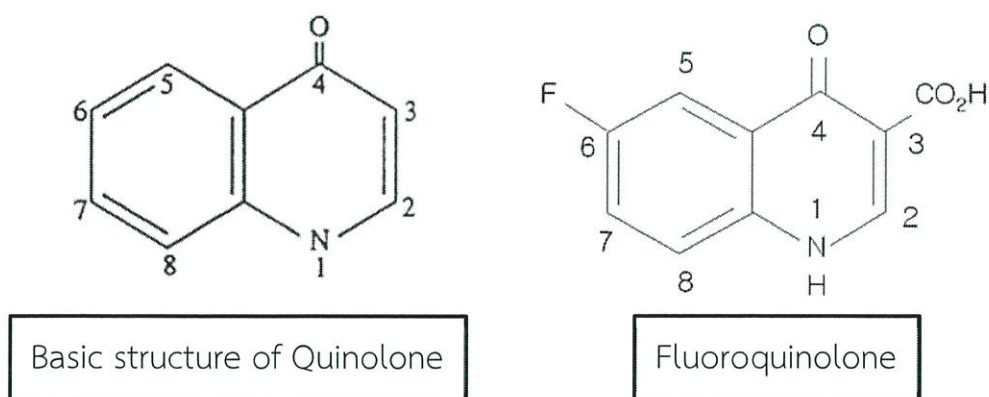
(Paraaminobenzoic acid) ที่แบคทีเรียหลายชนิดใช้ในการสร้างกรดโฟลิก โดยยาจะแย่งจับกับเอนไซม์ dihydropteroic acid synthetase ทำให้การสังเคราะห์กรดโฟลิกไม่เกิดขึ้น โดยจัดเป็นพวก broad spectrum ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึม มีผลทั้งต่อเชื้อแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (สุวณี และมาลัย, 2536)



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Sulfonamides  
(ที่มา : Henry, 1943)

### 2.1.5 ยากลุ่ม Quinolones

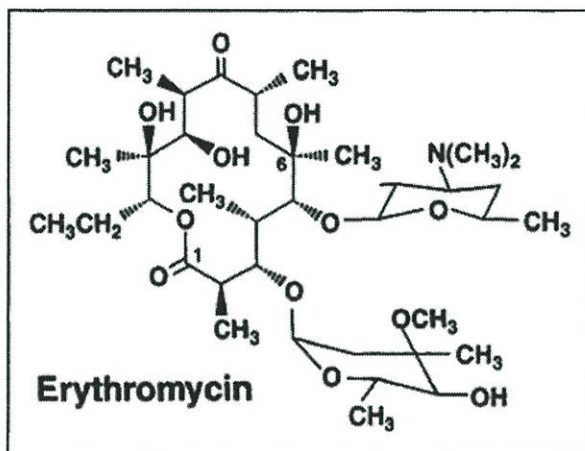
โครงสร้างของยาในกลุ่มนี้จะประกอบด้วย Basic structure ของ Quinolone เป็นโครงสร้างหลักและ functional group ที่ทำให้ยามีประสิทธิภาพที่ต่างกันไป ต่อมาได้พัฒนาโครงสร้างมาจาก Nalidixic acid โดยการเพิ่ม Fluorine เข้าไปในสูตรโครงสร้างเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 กลายเป็น Fluoroquinolone (รูปที่ 2.5) โดยจัดเป็นพวก broad spectrum ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ ยกตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น Nalidixic acid Oxolinic acid Pipemidic acid Cinoxacin และ Norfloxacin (Greenabhud, 2013)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของยาปฏิชีวนะกลุ่ม Quinolones และ Fluoroquinolone  
(ที่มา : Jae kyun hur, 2008)

### 2.1.6 ยากลุ่ม Macrolides

มีสูตรโครงสร้างเป็น macrocyclic lactone ring เชื่อมกับน้ำตาล ยกตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ เช่น Erythromycin Spiramycin Midecamycin Rosaramicin และ Roxithromycin (รูปที่ 2.6) โดยจัดเป็นพวก broad spectrum จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อ ยาในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีผลต่อเชื้อแกรมบวกมากกว่าเชื้อแกรมลบ (Greenabhud, 2013)



รูปที่ 2.6 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ Erythromycin  
(ที่มา : Salvador and Mark, 1999)

## 2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียได้โดยการออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างส่วนต่างๆของเซลล์โดยแบ่งยาปฏิชีวนะตามกลไกการออกฤทธิ์ จะสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 5 กลุ่ม คือ

### 2.2.1 กลุ่มที่มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ (Cell wall) ของแบคทีเรีย

ยากลุ่มนี้จะทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยไปยับยั้งการสร้าง mucopeptide ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง แบคทีเรียแบ่งตัวไม่ได้ ได้แต่ยืดออกและเกิดรูที่ผนังเซลล์ทำให้ส่วนภายในของเซลล์ออกมาภายนอกและแตกในที่สุด (สุวณี และมาลัย, 2536) ยากลุ่มนี้ จึงจัดเป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียโดยตรง (Bactericidals) มีความปลอดภัยสูงเนื่องจากเซลล์ของสัตว์ชั้นสูงทั่วไปไม่มีผนังเซลล์ ยกตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Penicillin Cephalosporin Vancomycin และ Bacitracin (Greenabhud, 2013)

### 2.2.2 กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของแบคทีเรีย

หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ เป็น Osmotic barrier คือช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป นอกจากนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อเลือกการนำส่งสารเข้าหรือออกจากเซลล์ (ศิริพร, 2549) โดยเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยชั้นโปรตีนและไขมัน ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะเข้าไปแทรกระหว่างโปรตีนกับไขมัน ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด สารใน

ไซโทพลาสซึมไหลออกมาทำให้เซลล์ตาย ยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ Polymyxin B Colistin และ Amphotericin B (สุวณี และมาลัย, 2536)

### 2.2.3 กลุ่มที่มีผลยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ของแบคทีเรีย

การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยจะไปยับยั้ง DNA Gyrase หรือ Topoisomerase ซึ่งทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยก (replication fork) โดยการตัด DNA สายใดสายหนึ่งออก เพื่อให้คลายเกลียวได้ ทำให้การสร้างดีเอ็นเอไม่สมบูรณ์ไม่เกิด DNA replication ยาชนิดนี้ ได้แก่ Nalidixic acid (ศิริพร, 2549) และยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โดยไปขัดขวางการทำงานของอาร์เอ็นเอ โพลีเมอเรส ทำให้ไม่สามารถแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวได้ อาร์เอ็นเอจึงไม่สามารถไปจับกับดีเอ็นเอ ได้แก่ Actinomycin D และ Rifampicin (สุวณี และมาลัย, 2536)

### 2.2.4 กลุ่มที่มีผลขัดขวางการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย

การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งออกฤทธิ์ต่อการสร้างโปรตีนที่ระดับไรโบโซม โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของไรโบโซม 30S และ 50S เช่น Tetracycline ยับยั้งในขั้นตอนที่ aminoacyl-tRNA จะเข้าไปจับกับ A site (acceptor site) ของ ribosome ในส่วนของ Chloramphenicol เป็นยาที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยจะไปจับที่ L-16 บน 50S ribosome ทำให้ไม่มีการสร้าง Peptide bond จึงยับยั้งการเจริญของเชื้อ และ Aminoglycoside ออกฤทธิ์ ที่ 30S บนไรโบโซม ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ (สุวณี และมาลัย, 2536)

### 2.2.5 กลุ่มที่มีผลขัดขวางขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของแบคทีเรีย

กลุ่มที่มีผลขัดขวางขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของแบคทีเรีย ยากจะไปยับยั้งขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของกรดโฟลิก ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอของแบคทีเรีย โดยยาแย่งจับกับ Dihydrofolic acid synthetase ทำให้แบคทีเรียไม่มีกรดโฟลิกที่ต้องนำไปใช้สร้างดีเอ็นเอ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวได้ ยากลุ่มนี้จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Bacteriostatics) ยากลุ่มนี้ ได้แก่ Sulfonamide และ Trimetoprim (Greenabhud, 2013)

## 2.3 กลไกในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะ เซลล์แบคทีเรียจะมีกลไกต่างๆ ที่จะทำให้เซลล์อยู่รอดหรือไม่ถูกยับยั้งการเจริญ โดยมีกลไกหลัก 3 แบบ ดังนี้

### 2.3.1 การนำยาออกจากเซลล์

โดยแบคทีเรียจะใช้พลังงานจาก ATP ลำเลียงยาปฏิชีวนะที่เข้ามาในเซลล์ให้ออกไปนอกเซลล์ โดยอาศัยโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า efflux pump เป็นการลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะภายในเซลล์ ทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปถึงเป้าหมาย (target) ได้ เช่น *E. coli* ที่ดื้อต่อ

ยา Tetracycline หรือแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยา Tetracycline และยา Chloramphenicol จะสามารถลำเลียงยาออกไปภายนอกเซลล์ได้ (สุนัดดา, 2556)

### 2.3.2 การสร้างเอนไซม์มาทำลายยา

โดยแบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงยาปฏิชีวนะหรือย่อยยาปฏิชีวนะ ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เช่น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Penicillin สามารถสร้างเอนไซม์ บีตาแลคตาเมส ซึ่งจะเปลี่ยนยา Penicillin ให้เป็นกรด penicilloic ที่ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (สุนัดดา, 2556)

### 2.3.3 การลดการนำยาเข้าภายในเซลล์

โดยแบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้อาปฏิชีวนะเข้าไปในเซลล์หรือเข้าไปได้น้อยลง เช่น *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Vancomycin จะมีผนังเซลล์ที่หนา ทำให้อายาไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ (สุนัดดา, 2556)

## 2.4 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ

โดยทั่วไปแบคทีเรียจะดื้อต่อยาปฏิชีวนะขนานเดียว แต่ถ้าแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนานจะเรียกว่า เชื้อดื้อยาหลายขนาน ดังนี้

### 2.4.1 Multidrug resistance (MDR)

Multidrug resistance (MDR) หมายถึง เชื้อที่ดื้อยาตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งกลุ่มยาที่ว่านี้ ได้แก่ Aminoglycoside Carbapenem Cephalosporin Beta-lactam plus beta-lactamase inhibitor และ Quinolone (วันทนีย์, 2559)

### 2.4.2 Extreme drug resistance (XDR)

Extreme drug resistance (XDR) หมายถึง เชื้อที่ดื้อต่อยาทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม Polymyxin หรือ ยากลุ่ม Glycylcycline (วันทนีย์, 2559)

### 2.4.3 Pandrug resistance (PDR)

Pandrug resistance (PDR) หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาทุกกลุ่ม รวมถึงยากลุ่ม Polymyxin และ Glycylcycline ด้วย (วันทนีย์, 2559)

## 2.5 กลไกการถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

การที่แบคทีเรียสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้นั้น เกิดจากการควบคุมโดยยีนที่ควบคุมการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ยีนนี้อาจจะอยู่บนพลาสมิดที่เป็น DNA วงแหวนสายคู่ที่อยู่นอกโครโมโซมของแบคทีเรีย หรืออยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรียก็ได้ แบคทีเรียที่ไม่มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะจะไม่สามารถอยู่รอดได้ เนื่องจากจะถูกยับยั้งหรือทำลายด้วยยาปฏิชีวนะ ขณะที่แบคทีเรียที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะจะยังคงมีชีวิตอยู่และสืบทอดลักษณะดังกล่าวไปยังรุ่นต่อไป นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางพันธุกรรมในประชากรแบคทีเรียให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสหรือจำนวนเบสใน DNA ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของ

แบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ซึ่งกลไกในระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิดการดื้อยาในแบคทีเรีย (molecular mechanisms of resistance) แบ่งได้เป็น 2 แบบ (สุนัดดา, 2556) คือ

### 2.5.1 Intrinsic resistance

เป็นการดื้อยาโดยธรรมชาติของแบคทีเรียเอง โดยแบคทีเรียทุกสายพันธุ์หรือเกือบทุกสายพันธุ์ในสปีชีส์นั้นมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เช่น การดื้อต่อยา Vancomycin ของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่ เนื่องจากยาไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ (สุนัดดา, 2556) หรือการดื้อต่อยา Ampicillin ของ *Klebsiella pneumoniae* เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum beta-lactamases (ESBLs) ที่ย่อยสลายยาได้ (บุญชูรัมย์, 2558)

### 2.5.2 Acquired resistance

เป็นการดื้อยาที่พบในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ทำให้แบคทีเรียที่เคยถูกทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะกลายเป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมหรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางพันธุกรรมในแบคทีเรีย จากกลไกต่างๆ ดังนี้ (สุนัดดา, 2556)

#### 2.5.2.1 แบคทีเรียเกิดมิวเทชัน (mutation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์แบคทีเรียเอง เช่น การเปลี่ยนแปลงลำดับหรือจำนวนเบสใน DNA มีผลทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาจทำให้ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนไปส่งผลให้สมบัติของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นแตกต่างไปจากเดิม หรือไม่สามารถทำงานได้ดังเดิม ทำให้ฟิโนไทป์ที่ปรากฏเปลี่ยนไป (สุนัดดา, 2556)

#### 2.5.2.2 แบคทีเรียได้รับยีนต้านทานยาปฏิชีวนะมาจากแบคทีเรียเซลล์อื่น

ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกัน หรือต่างสปีชีส์หรือต่างจิ้นส์กันก็ได้ การเคลื่อนย้ายยีนนี้เกิดจากกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) คือการที่แบคทีเรียมาจับคู่กัน แล้วมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรมที่เป็นพลาสมิดผ่านทางพิไล (pili) โดยที่แบคทีเรียเซลล์หนึ่งจะเป็นผู้ให้ (donor) และอีกเซลล์หนึ่งเป็นผู้รับ (recipient) โดยที่ทั้ง 2 เซลล์จะต้องเป็นแบคทีเรีย สปีชีส์เดียวกัน ในการถ่ายทอดสารพันธุกรรมนี้ พลาสมิดที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะของเซลล์ผู้ให้จะถูกจำลองขึ้นและเคลื่อนที่ไปยังเซลล์ผู้รับ ทำให้เซลล์ผู้รับมีพลาสมิดที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะนั้นได้ และกระบวนการทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) เป็นการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมหรือ DNA จากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ หรืออาจเกิดในแบคทีเรียต่างสปีชีส์กันก็ได้ การถ่ายทอดสารพันธุกรรมแบบนี้จะเกิดได้ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และเซลล์ผู้รับจะต้องมีสภาพทางสรีรวิทยาที่เหมาะสมด้วย โดยเซลล์แบคทีเรียผู้รับที่กำลังเติบโตอยู่ในระยะ log phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์มากที่สุด (exponential growth) จะเป็นระยะที่พบการทรานส์ฟอร์เมชันมากที่สุด เรียกเซลล์นี้ว่า คอมพีเทนท์ (competent cell) ผนังเซลล์ของเซลล์ผู้รับจะเกิดเป็นช่องหรือรูทำให้ DNA จากเซลล์ผู้ให้สามารถเข้าไปในเซลล์ผู้รับได้ DNA ที่เคลื่อนย้ายอาจจะเป็นชิ้นส่วนของโครโมโซม (สุนัดดา, 2556)

## 2.6 อุปติกรรม์การดื้อยาของเชื้อที่ปนเปื้อนจากฟาร์มสัตว์น้ำและปลานิล

ได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายทั้งในภาคครัวเรือนและในการทำปศุสัตว์ โดยการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกวิธีไม่เพียงแต่เพิ่มการดื้อยาในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแต่จะส่งผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่พบในสิ่งแวดล้อม คน และสัตว์ (กระทรวงสาธารณสุข, 2553) โดยเกษตรกรมีการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง หอย ปู และปลา ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ประเทศไทยอนุญาตให้ใช้กับสัตว์น้ำ ได้แก่ Oxytetracycline และ Sulfamethoxazole-trimethoprim โดยนำมาใช้ผสมในอาหาร เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ป้องกัน ควบคุม และรักษาโรคติดเชื้อ (วิษณุ, 2560) จากนั้นยาจะถูกกำจัดออกผ่านทางของเสีย และปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม เช่น พื้นดิน แม่น้ำ ลำธาร ส่งผลให้เกิดยาค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ได้รับหรือสัมผัสกับยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในปริมาณต่ำๆ อย่างต่อเนื่องสามารถทำให้เกิดการดื้อยาได้ (บรมพจน์ และลีณา, 2560)

ปลานิลเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นปลาน้ำจืดที่มีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยยังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีก เนื่องจากตลาดปลานิลทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กรมประมง, 2556) ได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเพิ่มผลผลิตของปลานิล ซึ่งการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้องนี้ก่อให้เกิดการพัฒนาแบคทีเรียที่ดื้อยา โดยการแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียมีสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมหรือพลาสมิด ซึ่งมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะอยู่และสามารถส่งผ่านไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้ (Calomiris et al., 1984) โดยเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลานิล ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacterium columnare* ซึ่งพบว่าตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา การเลี้ยงปลานิลในกระชังทุกพื้นที่ประสบปัญหาการระบาดของโรคก่อความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมาก โดย *Aeromonas hydrophila* เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อระบบหมุนเวียนในสัตว์น้ำจืด โดยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลานิลในกัวนพะเยาทั้งหมดดื้อต่อยา Amoxycillin และมีความไวต่อยา Norfloxacin, Kanamycin และ Neomycin สูงที่สุด (วิพรพรรณ และคณะ, 2555)

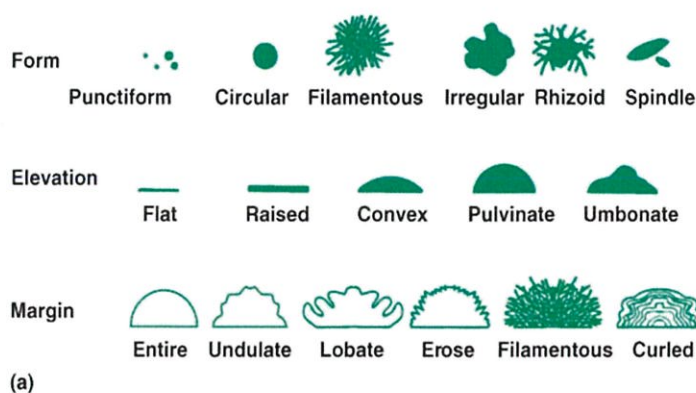
## 2.7 เทคนิคการคัดแยกเชื้อ และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์จะอาศัยหลักการในการเจือจาง โดยเทคนิคที่ใช้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธีดังนี้

### 2.7.1 Streak plate technique

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ โดยจะใช้ห้วงเชี่ยเชื้อที่เผาไฟและรอให้เย็นแล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารแข็งตามแนวระนาบ 4-5 เส้น ทำเช่นเดียวกันในรอยที่ 2 3 และ 4 โดยไม่ให้รอยสุดท้ายชนกับรอยแรก ซึ่งอาศัยหลักการเจือจาง ดังนั้น จะพบว่าเชื้อมีความหนาแน่นมากตามแนวขีดในรอยแรกๆ แต่ในรอยท้ายๆ เชื้อจะเจือจางลงและแยกแต่ละเซลล์ออกจากกันได้ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม แต่ละเชื้อจะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ได้ ซึ่งสามารถ

สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งได้ (ดังรูปที่ 2.7) ข้อดีของวิธีนี้ คือ สะดวกและทำได้ง่าย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552)



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็ง  
(ที่มา : Prescott et al., 2002)

### 2.7.2 Spread plate technique

เทคนิคนี้จะทำการปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่ถูกทำให้เจือจางแล้วลงบนอาหารแข็ง แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลจุ่มแอลกอฮอล์ สบไฟ จากนั้นจะใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานอาหารแข็ง เพื่อเป็นการทำให้เซลล์ต่างๆ แยกและกระจายออกจากกัน เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะปรากฏโคโลนีของเชื้อบนผิวหน้าอาหารเท่านั้น ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552)

### 2.7.3 Pour plate technique

เทคนิคนี้ตัวอย่างเริ่มต้นจะถูกเจือจางด้วยเทคนิค serial dilution โดยนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเติมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเทอาหารวุ้นลง (Agar Medium) ไปในจานเพาะเชื้อ (โดยอุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อประมาณ 48-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตายได้) ผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้เกิดการกระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยการหมุนจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นเกิดการแข็งตัว เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ด้านบนและบนอาหาร เกิดโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อขึ้นมา วิธีการนี้ นอกจากจะแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วยังสามารถศึกษาการเจริญในที่ที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศของเชื้อได้ เนื่องจากโคโลนีจะเกิดขึ้นทั้งบนผิววุ้นและใต้วุ้น (อภิญา, 2556)

## 2.8 การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

การระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (identification) เพื่อให้ทราบสปีชีส์ (species) หรือสายพันธุ์ภายในสปีชีส์ (strain) สามารถทำได้ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) สรีระวิทยา (physiology) และวิธีทางโมเลกุล (molecular method) โดยการระบุสายพันธุ์ของเชื้อเบื้องต้น สามารถทำได้โดยการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาโดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ดังนี้ (เจริญ, 2554)

### 2.8.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)

#### 2.8.1.1 TSI ( Triple sugar iron agar )

จะเป็นการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และ Non fermentative gram negative (ณัฐพงษ์และคณะ, 2550) โดยการทดสอบทางชีวเคมีด้วยอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) เป็นการบอกความแตกต่างของเชื้อโดยอาศัยความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครส โดยใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ การสร้างกรดที่เกิดขึ้นสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลือง ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสจากกระบวนการหมักจะให้กรด บริเวณก้นหลอดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และบริเวณผิววุ้นจะเป็นสีแดงเนื่องจากการใช้เปปโตนโดยวิธี oxidative decarboxylation แล้วให้ผลเป็นต่าง ถ้าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครสได้ ทั้งบริเวณก้นหลอดและบริเวณผิววุ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งข้อจำกัดของวิธีการนี้ คือ จะไม่สามารถระบุได้ว่ามีการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลแลคโตสและซูโครสทั้งสองชนิด นอกจากนี้ การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สังเกตได้จากรอยแตกหรือฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเกิด  $H_2S$  สังเกตได้จากตะกอนสีดำบริเวณก้นหลอด เรียกว่า เฟอรัสซัลไฟด์ (นันทนา, 2537)

#### 2.8.1.2 Motility Test

เนื่องจากแบคทีเรียหลายชนิดมีแฟลกเจลลา จึงสามารถเคลื่อนที่ได้ คุณสมบัตินี้สามารถทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากเชื้อไม่เคลื่อนที่ จะเห็นรอยที่เชื้อเจริญ (ขุ่น) ตามรอยที่ stab เชื้อ ลงไป หากมีการเคลื่อนที่ก็จะเห็นการแพร่กระจายของเชื้อออกห่างจากรอยที่ stab ซึ่งในการทดลองเชื้อบางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้ไม่ดี จึงอาจทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ (กนกรัตน์, 2548)

#### 2.8.1.3 Catalase Test

วิธีนี้เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งโดยปกติในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นก๊าซออกซิเจน และน้ำ ดังนั้นการทดสอบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์นี้ได้หรือไม่ ทำได้โดยการใช้ลูปเซียเชื้อลงบนสไลด์แล้วหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้า

เกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลเป็นบวก ซึ่งการทดลองนี้ไม่ควรทำการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่เพราะเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์คะตะเลสอยู่ภายในเซลล์จึงทำให้แปลผลผิดพลาดได้ (นันทนา, 2537)

### 2.8.2 การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

โคลิฟอร์มแบคทีเรียสามารถย่อยแลคโตสได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสให้ผลเป็นกรดและแก๊ส แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดอื่น และยีสต์ สามารถย่อยแลคโตสได้เช่นเดียวกัน จึงทำการทดสอบยืนยันเพื่อบ่งชี้ว่าเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยใส่เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth ที่มีหลอดดักแก๊ส ซึ่งในอาหาร Brilliant-Green Lactose Bile Broth จะประกอบไปด้วย Oxgall ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และ Brilliant-Green จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นและยีสต์จะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญเติบโต โดยแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant-Green Lactose Bile Broth จะเกิดจากโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (อรดี, 2554)

## 2.9 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

การวัดความไวต่อยาปฏิชีวนะ มีวัตถุประสงค์เพื่อดูความสามารถของยาปฏิชีวนะต่างๆในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ โดยแบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้ (สุวณี และมาลัย, 2536)

### 2.9.1 Diffusion method

Diffusion method ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย ประหยัด และสามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก ซึ่งได้แก่ Agar disk-diffusion Antimicrobial gradient method (Etest) Agar well diffusion method Agar plug diffusion method Cross streak method และ Poisoned food method โดย Agar disk-diffusion จัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งจะประเมินผลจาก inhibition zone นอกจากนี้ Antimicrobial gradient method มักใช้ในการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกว่าแบคทีเรียที่ทดสอบต้องใช้ยาปฏิชีวนะน้อยที่สุดเท่าใดจึงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (วลัยลักษณ์, 2559)

### 2.9.2 Dilution method

Dilution method มักใช้ในการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกว่าต้องใช้ยาปฏิชีวนะน้อยที่สุดเท่าใดจึงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และใช้ในการหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกว่าต้องใช้ยาปฏิชีวนะจำนวนน้อยที่สุดเท่าใดถึงจะฆ่าแบคทีเรียได้ โดยหลักการของวิธีนี้ คือ เจือจางยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารที่มียาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ซึ่งอาจทำในอาหารแข็งเรียกว่า agar dilution ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถเห็นโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นมาทำให้ทราบถึงการปนเปื้อนของเชื้ออื่น หรือเจือจางยาปฏิชีวนะในอาหารเหลว เรียกว่า broth dilution

ข้อดีคือสามารถวัด MBC ได้ โดยนำมาเลี้ยงต่อบน agar plate ที่ไม่มียาต้านจุลชีพแล้วสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการเจริญของเชื้อได้ ข้อเสีย คือ เนื่องจากอ่านผลโดยการดูความขุ่น วิธีนี้จึงไม่สามารถบอกได้ว่าการปนเปื้อนของเชื้ออื่น (สுவณี และมาลัย, 2536)

## 2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาเป็นปัญหาที่สำคัญ จึงได้มีการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะและรูปแบบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางรณรงค์การควบคุมและป้องกันการดื้อยาปฏิชีวนะ โดยจากงานวิจัยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาแบบ Multidrug-Resistant ที่สำคัญทางการแพทย์ที่คัดแยกได้จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในทางการแพทย์ในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ โดยเชื้อที่แยกได้ ได้แก่ Enterobacteria (ENT) Non-fermenting Gram-negative rods (NFR) และ Gram-positive cocci (GPC) และทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ พบว่า โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อปลามีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสูงกว่าเชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งพบว่า เชื้อ Gram-positive cocci (GPC) มีความต้านทานต่อยา Penicillin และ Azithromycin ในขณะที่กลุ่ม Enterobacteria (ENT) และ Non-fermenting Gram-negative rods (NFR) มีความต้านทานต่อ Ampicillin และ Ampicillin / Sulbactam หรือ Gentamicin (Juriana et al., 2012) จากนั้นได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับอุบัติการณ์และความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาในประเทไนจีเรีย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาใน (Oreochromis niloticus) และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ Enterobacteriaceae นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสกุล Staphylococcus Escherichia Proteus Bacillus Klebsiella Micrococcus Serratia Pseudomonas Salmonella และ Streptococcus ซึ่งเชื้อที่ทดสอบมีความไวต่อยา Augmentin Cotrimoxazole Nalidixic acid Tetracycline Amoxicillin Nitrofurantoin Ofloxacin และไวต่อยา Gentamicin (Tiamiyu et al., 2015)

ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สามารถดื้อยาได้หลายชนิดโดยคัดแยกได้จากผิวน้ำในประเทศเม็กซิโก ซึ่งมีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีผลต่ออาการระบาดของโรคอุจจาระร่วง โดยพบว่า 53% ของเชื้อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดและ 15% มีความต้านทานต่อยาแบบ Multidrug Resistance ได้แก่ Klebsiella oxytoca Escherichia coli และ Enterobacter cloacae โดยเชื้อมีความต้านทานต่อ Cefazoline Cefuroxime Ampicillin และ Ampicillin-Sulbactam (Delgado et al., 2016) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับอุบัติการณ์และความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาในและปลาตุกในยูกันดา โดยการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อก่อโรคที่พบในปลาในและปลาตุก รวมทั้งศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกได้ ซึ่งเชื้อที่พบ ได้แก่ Aeromonas spp. และ Plesiomonas shigelloides เมื่อ

นำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า เชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Penicillin Oxacillin และ Ampicillin (Wamala et al., 2018)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สารเคมี

- 70% (v/v) และ 95% (v/v) Ethyl Alcohol
- 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride 1% (w/v)
- BaCl<sub>2</sub> 1.175% (w/v)
- Glycerol 15% (v/v)
- Gram staining kit
  - 95% (v/v) Ethyl Alcohol
  - Crystal violet
  - Iodine
  - Safranin
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (w/v)
- Immersion oil
- NaCl 0.85% (w/v)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (v/v)

#### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- Autoclave
- Beaker ขนาด 50 500 และ 1000 ml.
- Bunsen burner
- Compound light microscope
- Cork cotton
- Cotton swabs
- Cuvette
- Cylinder ขนาด 10 และ 20 ml.
- Digital balance ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- Dropper
- Duran ขนาด 250 ml.
- Forcep
- Freezers -20 °C และ -80 °C

- Glass Pipette ขนาด 1.5 และ 10 ml
- Glass slide
- Hot air oven
- Incubator
- Inoculating Loop
- Laminar flow cabinet
- Lens cleaning paper
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml.
- Micropipette ขนาด 100-1000  $\mu$ l
- Microwave
- Needle
- Petri dish
- Rack
- Refrigerator
- Rubber bulb
- Spatula
- Spectrophotometer
- Stirring rod
- Test tube
- Tips
- Vernier Caliper
- Volumetric flask
- Vortex mixer

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Agar
- BHI
- BGLB
- Motility medium
- MHA
- NA
- TSI

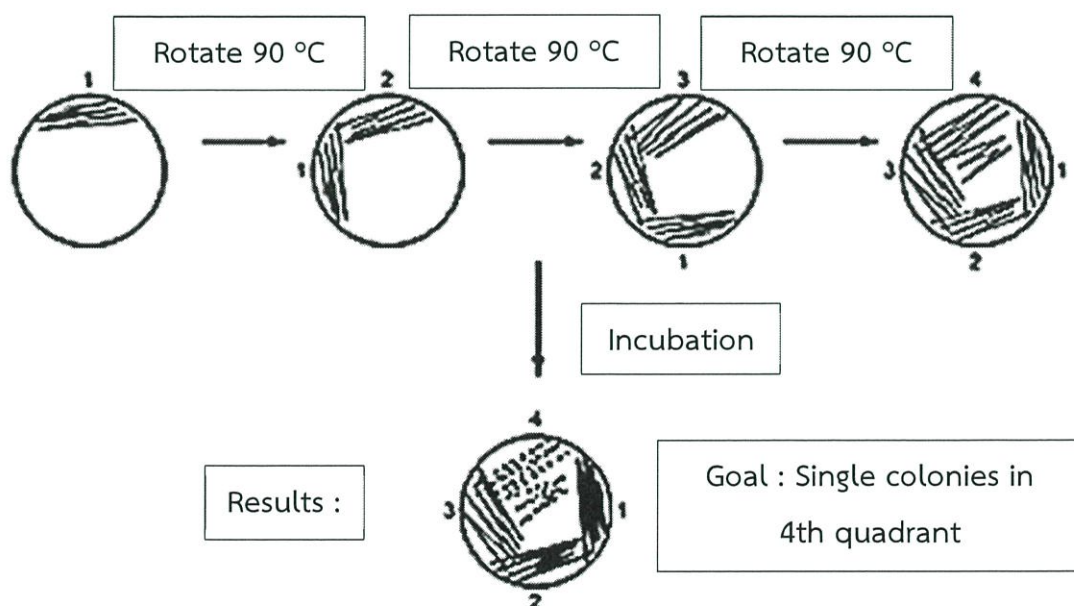
### 3.4 ยาปฏิชีวนะ

- Ampicillin	10	μg
- Cefoxitin	30	μg
- Erythromycin	15	μg
- Gentamicin	10	μg
- Norfloxacin	10	μg
- Sulphamethoxazole/Trimethoprim	25	μg

### 3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำเลี้ยงปลาขึ้นมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Cross streak plate โดยการนำลูปเชี่ยเชื้อ (Loop) สก๊อฟไฟจนร้อนแดงและทิ้งไว้ให้เย็น นำลูปไปแตะเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมา streak ลงบนอาหารแข็ง NA จากนั้นนำลูปเชี่ยเชื้อ (Loop) สก๊อฟไฟจนร้อนแดงและทิ้งไว้ให้เย็น รอยที่ 2 จะลากจากรอยแรก ทำเช่นเดียวกันในรอยที่ 3 และ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่ให้รอยสุดท้ายชนกับรอยแรก (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 แสดงวิธีการ Cross streak plate

(ที่มา : Erin, 2012)

#### 3.5.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้แล้วนำมา streak ลงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง โดยสังเกตสี ความโปร่งแสง ความทึบแสง ความมันวาว และรูปร่างของโคโลนี

### 3.5.3 การตรวจสอบลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาย้อมสีด้วยวิธี Gram Stain โดยล้างสไลด์ให้สะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วหยดน้ำลงบนสไลด์ 1 หยด จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อลงไฟจนร้อนแดงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น และเชื้อลงบนสไลด์แล้วเกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไป ตรึงเชื้อ (Fix) โดยการนำสไลด์ที่แห้งแล้วไปผ่านไฟ 2-3 ครั้ง จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที เททิ้ง ล้างด้วยน้ำ หยดสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ล้างสีออกด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 % (Ethyl alcohol) โดยหยดผ่านบริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ล้างด้วยน้ำ และหยดสีซาฟรานิน (Safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสี แล้วบันทึกผล

### 3.5.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

#### 3.5.4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล

ใช้ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างกรดและก๊าซจากการหมัก (Fermentation) น้ำตาลแลคโตส (Lactose) ซูโครส (Sucrose) และกลูโคส (Glucose) รวมถึงการสร้าง  $H_2S$  โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เผลาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น เขี่ยเชื้อแล้วแทง (stab) เชื้อลงไปบนอาหาร TSI (Triple sugar Iron agar) ทำการ streak บนผิวหน้าวุ้นเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครสได้ จะทำให้อาหารทั้งหมดเป็นสีเหลือง ถ้าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว จะทำให้บริเวณก้นหลอดอาหารเป็นสีเหลืองเนื่องจากสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลได้เพียงเล็กน้อย และบริเวณ slant เป็นสีแดง เนื่องจากเชื้อมีการใช้เปปโติน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดได้เลย แต่สามารถใช้เปปโตินได้ คือ บริเวณ slant จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ถ้าเชื้อใช้น้ำตาลแล้วมีก๊าซเกิดขึ้น ก๊าซจะดันให้อาหารยกตัวขึ้น หรือมีรอยแยกของอาหาร และถ้าเชื้อสร้าง  $H_2S$  จะทำปฏิกิริยากับ Ferrous ion ที่มีอยู่ในอาหารได้ Ferrous Sulfide ทำให้เกิดเป็นตะกอนสีดำขึ้น

#### 3.5.4.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase)

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งแบคทีเรียสร้างขึ้นมาเพื่อย่อยสลาย  $H_2O_2$  โดยนำลูปเขี่ยเชื้อ (Loop) เผลาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น เขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ หยด 3% (w/v)  $H_2O_2$  1 หยด ลงบนบริเวณที่ป้ายเชื้อ สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดฟองก๊าซให้เป็นผลบวก ไม่เกิดฟองก๊าซให้เป็นผลลบ

### 3.5.4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่

เป็นวิธีตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว Motility medium โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเข็มเชื้อเข้าเผาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น แล้วแทง (stab) เชื้อลงไปในการอาหาร Motility medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อมีการเคลื่อนที่จะพบการเจริญของเชื้อเคลื่อนออกจากบริเวณที่แทง (stab) ถ้าเชื้อไม่เคลื่อนที่จะพบการเจริญของเชื้อแค่บริเวณที่แทง (stab)

### 3.5.5 การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย โดยใช้อาหาร Brilliant green lactose bile broth (BGLB) ที่เป็น Selective media และ Differential media ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำลูปเชื้อเข้าเผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็นแล้วเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดอาหาร BGLB ที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลโดยหลอดที่เกิดก๊าซให้เป็นบวก หลอดที่ไม่เกิดก๊าซให้บ่มต่อจนครบ 48 ชั่วโมง นำมาอ่านผลอีกครั้ง หลอดที่เกิดก๊าซภายใน 48 ชั่วโมง ทั้งหมดให้ผลบวก

### 3.5.6 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disc diffusion นำลูปเชื้อเข้าเผาไฟจนร้อนแดงรอให้เย็น เขี่ยเชื้อ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเชื้อเข้าเผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็นแล้วเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองที่มี Normal saline solution 0.85% (w/v) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard นำหลอดแขวนในน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วทำการ vortex แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate (MHA) รอให้แห้ง จากนั้นใช้ Forcep ที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นยาปฏิชีวนะ มาวางบนผิวหน้า MHA ตั้งทิ้งไว้ แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อที่ทำทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยเชื้อที่โตยา คือ เชื้อที่ไม่ปรากฏวงใส (clear zone) ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ เชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ คือ เชื้อที่ปรากฏวงใส (clear zone) ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง

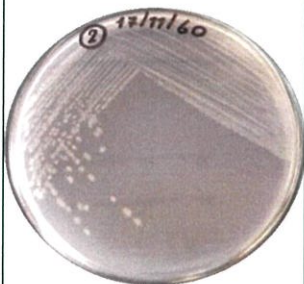
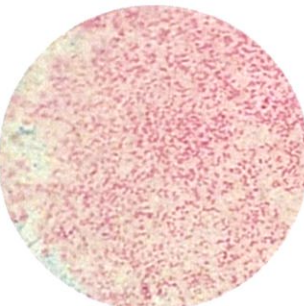
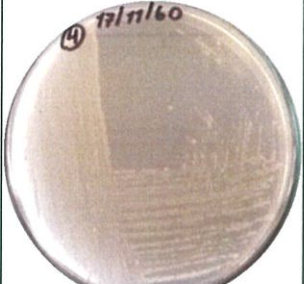
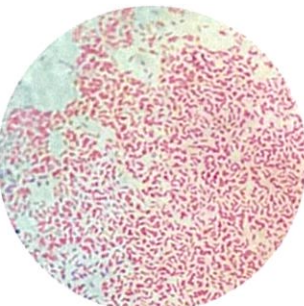



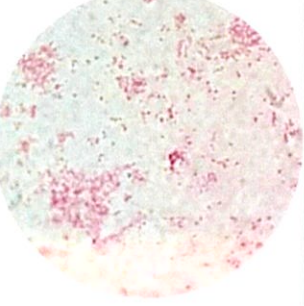
ลักษณะการเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิล จำนวน 16 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่า สามารถแบ่งลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งออกเป็น 7 กลุ่ม โดยเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างไม่สมมาตร (Irregular) ความนูนยกตัว (Raised) และขอบเป็นคลื่น (Undulate) 1 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R014 เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างกลม (circular) ความนูนยกตัว และขอบเรียบ (Entire) 1 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R015 เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่างไม่สมมาตร ความนูนยกตัว และขอบเรียบ 1 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-T011 เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีเหลือง รูปร่างไม่สมมาตร ความนูนยกตัว และขอบหยัก (Curled) 1 ไอโซเลท ได้แก่ PSN-IV-T003 เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีเหลือง รูปร่างกลม ความนูนยกตัว และขอบเรียบ 2 ไอโซเลท ได้แก่ PSV-V-R002.2 และ PSV-V-R002.3 เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างไม่สมมาตร ความนูนยกตัว และขอบเป็นคลื่น 4 ไอโซเลท ได้แก่ PPV PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.1 และ PPV-VI-R010.2 เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างกลม ความนูนยกตัว และขอบเรียบ 6 ไอโซเลท ได้แก่ PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-V-R002. PPV-VI-R009.1 PPV-VI-R009.2 และ PSV-VI-R010.2

ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถใช้เป็นหลักในการจำแนกแบคทีเรียได้ เพราะลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยสังเกต สี ขนาด รูปร่าง การยกตัว และขอบของโคโลนี (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552)

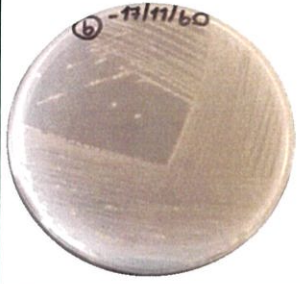
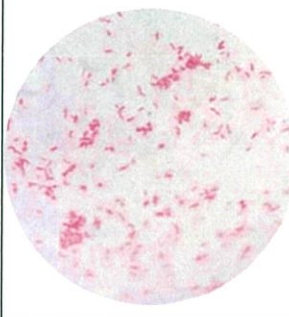

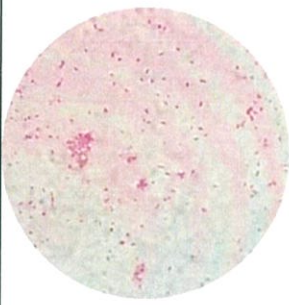

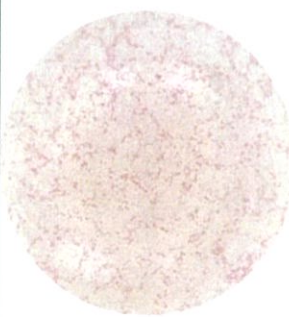

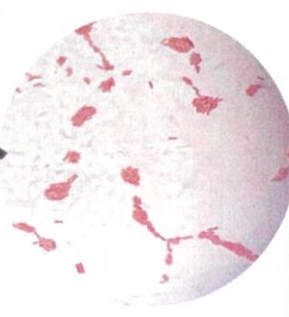
#### 4.2 ผลลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ลักษณะการเรียงตัว การติดสี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิล จำนวน 16 ไอโซเลท หลังจากย้อมสีแบบแกรม ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า เชื้อทั้งหมด 16 ไอโซเลท รูปร่างเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของ safranin

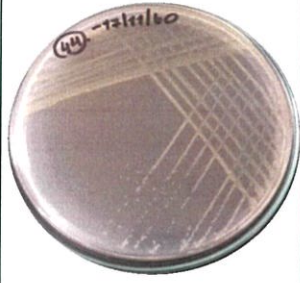
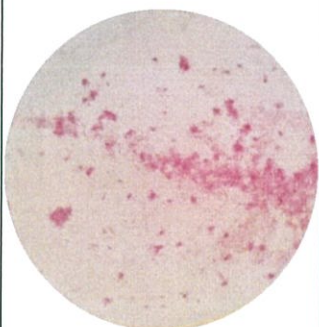

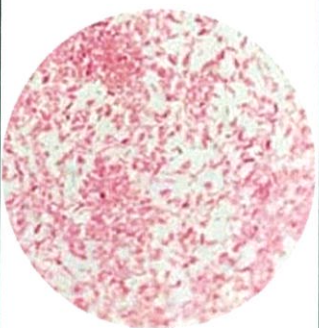

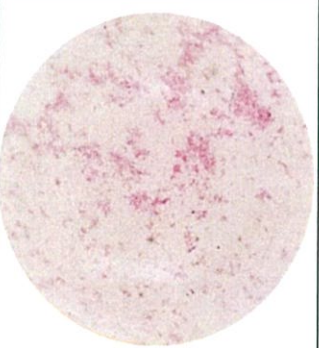

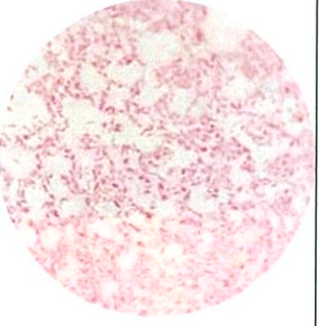
ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง NA และลักษณะการเรียงตัว การติดสี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)	
1	TSN-VI-R014 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่าง ไม่สมมาตร ความหนูนยกตัว ขอบเป็นคลื่น		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น
2	TSN-VI-R015 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่าง กลม ความนูน ยกตัว ขอบ เรียบ		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น
3	TSN-VI-T011 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีขาวขุ่น รูปร่าง ไม่สมมาตร ความหนูนยกตัว ขอบเรียบ		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น
4	PSN-V-T002 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่าง กลม ความนูน ยกตัว ขอบ เรียบ		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น


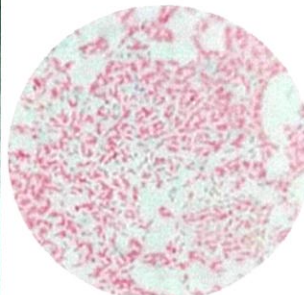
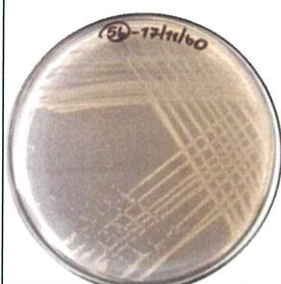
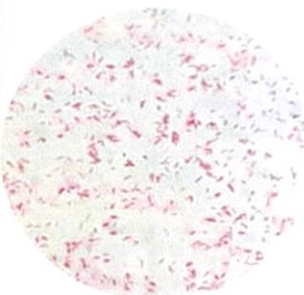
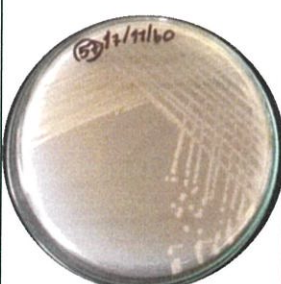
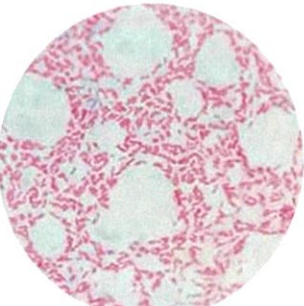
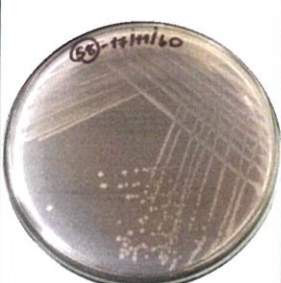

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง NA และลักษณะการเรียงตัว การติดสี ภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลาชนิด

ลำดับที่	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง		ลักษณะภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)	
5	 <p>PSV-V-R001</p>	<p>ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่าง กลม ความนูน ยกตัว ขอบเรียบ</p>		<p>ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น</p>
6	 <p>PPV</p>	<p>ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างไม่ สมมาตร ความ นูนยกตัว ขอบ เป็นคลื่น</p>		<p>ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น</p>
7	 <p>PSV-VI-R010.1</p>	<p>ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างไม่ สมมาตร ความ นูนยกตัว ขอบ เป็นคลื่น</p>		<p>ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น</p>
8	 <p>PSN-IV-T003</p>	<p>ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีเหลือง รูปร่าง ไม่สมมาตร ความนูนยกตัว ขอบหยัก</p>		<p>ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น</p>

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง NA และลักษณะการเรียงตัว การติดสี ภายใต้วัดกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลาชนิด

ลำดับที่	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง	ลักษณะภายใต้วัดกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)	
9	PSV-V-R002.1 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างกลม ความนูนยกตัว ขอบเรียบ	 ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อนสั้น
10	PPV-VI-R010.1 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างไม่สมมาตร ความนูนยกตัว ขอบเป็นคลื่น	 ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อนสั้น
11	PSV-V-R002.2 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีเหลือง รูปร่างกลม ความนูนยกตัว ขอบเรียบ	 ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อนสั้น
12	PSV-V-R002.3 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีเหลือง รูปร่างกลม ความนูนยกตัว ขอบเรียบ	 ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อนสั้น

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง NA และลักษณะการเรียงตัว การติดสี ภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ของเชื้อที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง		ลักษณะภายใต้วัยกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)	
13	PPV-VI-R009.1 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างกลม ความนูนยกตัว ขอบเรียบ		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น
14	PPV-VI-R009.2 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างกลม ความนูนยกตัว ขอบเรียบ		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น
15	PPV-VI-R010.2 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สี ครีม รูปร่างไม่ สมมาตร ความ นูนยกตัว ขอบ เป็นคลื่น		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น
16	PSV-VI-R010.2 	ลักษณะโคโลนี ทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างกลม ความนูนยกตัว ขอบเรียบ		ติดสีแดงของ safranin รูปร่างท่อน สั้น

การย้อมสีแกรมสามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็นแกรมบวกและแกรมลบ โดยอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุไฟฟ้า (Iron - exchange) ระหว่างสีกับผิวเซลล์หรือองค์ประกอบภายในเซลล์ ซึ่งประจุไฟฟ้าของสีจะเข้าไปเกาะประจุไฟฟ้าบนผิวเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์ นอกจากนี้ องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกของเซลล์อาจมีส่วนร่วมกับการที่มีประจุไฟฟ้าเป็นบวก เช่น  $\text{Na}^+$  หรือ  $\text{K}^+$  เนื่องจากผิวเซลล์ของแบคทีเรียมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ จึงทำปฏิกิริยากับสารที่มีประจุไฟฟ้าเป็นบวก (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552)

ซึ่งการติดสีของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจะแตกต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันเกาะที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกและยังมีชั้นผนังเซลล์บางกว่า ดังนั้น ในช่วงที่ล้างด้วยแอลกอฮอล์จะละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสี crystal violet-iodine complex หลุดออกมาจึงติดสีแดงของ safranin ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกจะมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำ เยื่อหุ้มเซลล์มีขนาดเล็กลงสารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เมื่อย้อมทับด้วย safranin จึงทำให้เซลล์ยังคงติดสีม่วง (นันทนา, 2537) แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยที่ส่งผลทำให้การติดสีของเชื้อแบคทีเรียไม่เป็นตามทฤษฎี เช่น ในแบคทีเรียแกรมบวกในบางสภาวะอาจให้ผลแตกต่างในการย้อมคือไม่ติดสีแกรมบวก เนื่องจากอายุของแบคทีเรียปกติควรจะใช้เชื้อที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ถ้าใช้เชื้อที่อายุมากผนังเซลล์อาจสูญเสียความสามารถในการติดสีคริสตัลไวโอเล็ตทำให้ติดสีแกรมลบแทน (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552)

### 4.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

#### 4.3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล

นำเชื้อที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงปลาชนิด 16 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลโดยใช้อาหาร Triple Sugar iron agar ( TSI ) พบว่า สามารถแบ่งเชื้อได้ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยเชื้อที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว ไม่สร้างก๊าซและไม่สร้าง  $\text{H}_2\text{S}$  มี 11 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R014 TSN-VI-R015 TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.2 PPV-VI-R009.2 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2 เชื้อที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครสได้ ไม่สร้างก๊าซและไม่สร้าง  $\text{H}_2\text{S}$  มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.1 และ PPV-VI-R009.1 เชื้อที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครส สร้างก๊าซและไม่สร้าง  $\text{H}_2\text{S}$  มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ PPV เชื้อที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครสได้ ไม่สร้างก๊าซและไม่สร้าง  $\text{H}_2\text{S}$  มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ PSN-IV-T003 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

การทดสอบทางชีวเคมีด้วยอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) เป็นการบอกความแตกต่างของเชื้อ โดยอาศัยความสามารถในการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครส

โดยใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีกรดเกิดขึ้น แบคทีเรียที่ใช้ น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีอากาศโดยกระบวนการหมัก (Fermentative) จะให้กรด สังเกตได้โดย อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่บริเวณก้นหลอด และแบคทีเรียที่เจริญบน TSI สามารถให้ผลผลิตเป็น ต่างจากการใช้เปปโตนโดยวิธี oxidative decarboxylation ทำให้อาหารบริเวณผิววุ้น (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดง ดังนั้น แบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาล แลคโตส และหรือซูโครสได้จะมีสีแดงบริเวณผิววุ้น (slant) และมีสีเหลืองที่บริเวณก้นหลอด (butt) (นันทนา, 2537)

ตารางที่ 4.2 การทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์ม เลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	รหัส	สีอาหาร		เกิด gas	เกิด H <sub>2</sub> S
		อาหารเอียง (slant)	ก้นหลอด (butt)		
1	TSN-VI-R014	แดง	เหลือง	-	-
2	TSN-VI-R015	แดง	เหลือง	-	-
3	TSN-VI-T011	แดง	เหลือง	-	-
4	PSN-V-T002	แดง	เหลือง	-	-
5	PSV-V-R001	แดง	เหลือง	-	-
6	PPV	เหลือง	เหลือง	+	-
7	PSV-VI-R010.1	เหลือง	เหลือง	-	-
8	PSN-IV-T003	ส้ม	ส้ม	-	-
9	PSV-V-R002.1	แดง	เหลือง	-	-
10	PPV-VI-R010.1	เหลือง	เหลือง	-	-
11	PSV-V-R002.2	แดง	เหลือง	-	-
12	PSV-V-R002.3	แดง	เหลือง	-	-
13	PPV-VI-R009.1	เหลือง	เหลือง	-	-
14	PPV-VI-R009.2	แดง	เหลือง	-	-
15	PPV-VI-R010.2	แดง	เหลือง	-	-
16	PSV-VI-R010.2	แดง	เหลือง	-	-

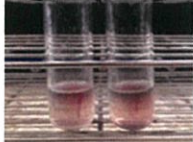
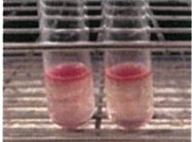
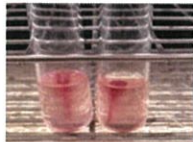
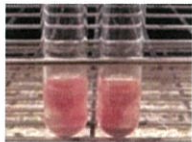
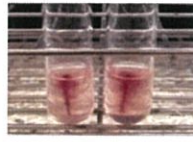
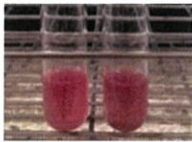
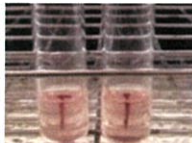

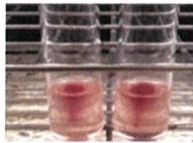
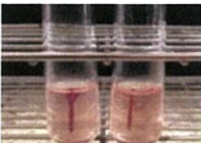
สำหรับแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือ ซูโครส จะให้ปริมาณกรดมาก ถึงแม้จะเกิด oxidative decarboxylation ซึ่งให้แอมโมเนียที่มีคุณสมบัติทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง ก็ไม่เพียงพอที่จะสามารถเปลี่ยน pH จึงทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรดจากการหมักน้ำตาลดังกล่าว ดังนั้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดทั้งบริเวณอาหารวันเอียง (slant) และก้นหลอด (butt) จะไม่สามารถระบุได้ว่ามีกรดจากการหมักน้ำตาลแลคโตส หรือซูโครส หรือทั้งสองชนิด สำหรับการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สังเกตได้จากรอยแตกหรือฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง  $H_2S$  นั้น เกิดขึ้นจากกระบวนการรีดักชัน (reduction) ของ thiosulfate ก๊าซ  $H_2S$  ที่เกิดขึ้นไม่มีสี ดังนั้นตรวจสอบได้โดยใช้ ferric ammonium sulfate เป็นอินดิเคเตอร์ โดยเมื่อ  $H_2S$  รวมตัวกับ เพอร์ริค อีออน (ferric ion) จะเกิดตะกอนสีดำ เรียกว่า เพอร์ริคซัลไฟด์ (ferrous sulfide) และขบวนการรีดักชันดังกล่าวเกิดขึ้นเฉพาะในสภาพที่เป็นกรดเท่านั้น และมักเกิดบริเวณก้นหลอด (butt) (นันทนา, 2537)

#### 4.3.2 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่

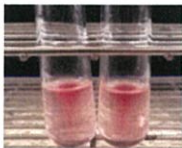
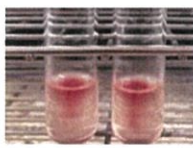

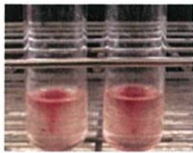
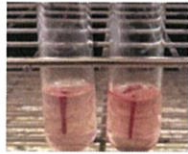
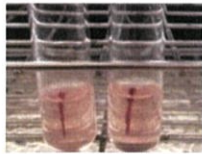
ผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในอาหาร Motility medium พบว่า มีเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PPV PSN-IV-T003 PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.2 PSV-V-R002.3 PPV-VI-R009.1 และ PPV-VI-R009.2 สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนอีก 6 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R014 TSN-VI-R015 PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2 ไม่พบการเคลื่อนที่ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) ใช้เพื่อทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่เนื่องมาจากการที่เชื้อมี flagella ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยให้เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ (นันทนา, 2537) เพื่อให้สามารถเห็นบริเวณที่มีการเจริญหรือการเคลื่อนที่ของเชื้อได้ชัดเจนขึ้นจึงมีการใส่สาร 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ซึ่งใช้เพื่อตรวจหาการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ในเซลล์ที่มีชีวิต โดยเอนไซม์ dehydrogenase จะทำปฏิกิริยากับ substrates และปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) ออกมา ซึ่งไฮโดรเจนไอออนจะไปทำปฏิกิริยากับสาร 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ซึ่งเป็นสารไม่มีสี ให้กลายเป็นสาร 2,3,5-triphenyl tetrazolium formazan ซึ่งมีสีแดง (วสุ, 2547) แต่อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่อาจแสดงผลเป็นลบเทียม (false negative) เนื่องจากเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ไม่ดี หรือ flagella อาจเกิดความเสียหายจากความร้อน การสั่นสะเทือน หรืออาการบาดเจ็บอื่นๆ (Dalynn, 2014)

ตารางที่ 4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิลในอาหาร  
Motility medium

ลำดับที่	Motility Test	ผล	ลำดับที่	Motility Test	ผล
1	TSN-VI-R014 	-	2	TSN-VI-R015 	-
3	TSN-VI-T011 	+	4	PSN-V-T002 	+
5	PSV-V-R001 	+	6	PPV 	+
7	PSV-VI-R010.1 	-	8	PSN-IV-T003 	+
9	PSV-V-R002.1 	+	10	PPV-VI-R010.1 	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิลในอาหาร Motility medium

ลำดับที่	Motility Test	ผล	ลำดับที่	Motility Test	ผล
11	PSV-V-R002.2 	+	12	PSV-V-R002.3 	+
13	PPV-VI-R009.1 	+	14	PPV-VI-R009.2 	+
15	PPV-VI-R010.2 	-	16	PSV-VI-R010.2 	-



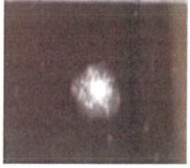



หมายเหตุ : + เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้  
- เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

#### 4.3.3 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase)


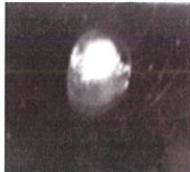
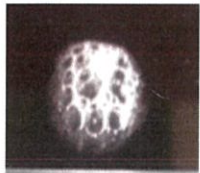


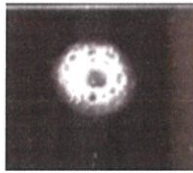
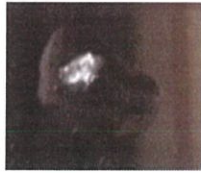
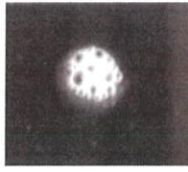


ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเลี้ยงปลานิลทั้งหมด 16 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้งหมดให้ผลเป็นบวก แต่ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะแตกต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียที่เมื่อทดสอบกับ  $H_2O_2$  3% (w/v) แล้วสามารถเกิดฟองก๊าซได้ทันที มีทั้งหมด 11 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R014 TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PPV PSN-IV-T003 PSV-V-R002.1 PPV-VI-R010.1 PSV-V-R002.2 PSV-V-R002.3 และ PPV-VI-R009.2 และเชื้อแบคทีเรียที่เกิดฟองก๊าซช้า (3 วินาที) หลังจากหยด  $H_2O_2$  3% (w/v) ลงไป มีทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R015 PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R009.1 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ให้เป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ (นันทนา, 2537) ซึ่งในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสจะพบเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้นการอ่านผลลบผิดพลาด (false negative) สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าใช้เชื้ออายุมาก (ดวงพร, 2537) และเชื้อบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เล็กน้อยโดยเกิดฟองแก๊สอย่างช้าๆซึ่งอาจทำให้สับสนกับผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส (Aryal, 2015)

ตารางที่ 4.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	Catalase Test	ผล	ลำดับที่	Catalase Test	ผล
1	TSN-VI-R014 	+	2	TSN-VI-R015 	+ <sup>w</sup>
3	TSN-VI-T011 	+	4	PSN-V-T002 	+
5	PSV-V-R001 	+	6	PPV 	+

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	Catalase Test	ผล	ลำดับที่	Catalase Test	ผล
7	PSV-VI-R010.1 	+ <sup>w</sup>	8	PSN-IV-T003 	+
9	PSV-V-R002.1 	+	10	PPV-VI-R010.1 	+
11	PSV-V-R002.2 	+	12	PSV-V-R002.3 	+
13	PPV-VI-R009.1 	+ <sup>w</sup>	14	PPV-VI-R009.2 	+
15	PPV-VI-R010.2 	+ <sup>w</sup>	16	PSV-VI-R010.2 	+ <sup>w</sup>

หมายเหตุ : +<sup>w</sup> เกิดฟองก๊าซซ้

#### 4.4 ผลการทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยใช้อาหาร Brilliant green lactose bile broth (BGLB) ซึ่งเป็น Selective media และ Differential media ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า เชื้อที่จัดเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียมี 1 ไอโซเลท ได้แก่ PPV ส่วนเชื้ออีก 15 ไอโซเลท ไม่จัดเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** การทดสอบการเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่แยกได้จากเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	รหัส	การสร้างก๊าซ
1	TSN-VI-R014	-
2	TSN-VI-R015	-
3	TSN-VI-T011	-
4	PSN-V-T002	-
5	PSV-V-R001	-
6	PPV	+
7	PSV-VI-R010.1	-
8	PSN-IV-T003	-
9	PSV-V-R002.1	-
10	PPV-VI-R010.1	-
11	PSV-V-R002.2	-
12	PSV-V-R002.3	-
13	PPV-VI-R009.1	-
14	PPV-VI-R009.2	-
15	PPV-VI-R010.2	-
16	PSV-VI-R010.2	-

หมายเหตุ : + เกิดฟองก๊าซในหลอด Durham tube จัดเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย  
- ไม่เกิดฟองก๊าซในหลอด Durham tube ไม่จัดเป็นโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

การทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยใช้อาหาร BGLB โดยในอาหารจะประกอบไปด้วย Oxgall ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและ Brilliant green ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด ถ้าสามารถสร้างก๊าซในการหมักน้ำตาลแลคโตสภายในหลอดดักก๊าซได้จะจัดเป็นฟีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Himedialabs, 2015) โดยการทดสอบที่เป็นผลบวกจะต้องเกิดความขุ่นของ

หลุดอาหารและเกิดการสร้างก๊าซ หากเกิดความขุ่นเพียงอย่างเดียวไม่จัดว่าเป็นผลบวกสำหรับการทดสอบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Hardy, 2009)

#### 4.5 ผลการจัดจำแนกเชื้อ

จากการศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น ซึ่งจากข้อมูลการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น คาดว่าเชื้อมีความใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล *Pseudomonas* โดยเชื้อมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างเป็นท่อน ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ ให้ผล catalase test เป็นบวก โดยบางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุเรืองแสงที่ละลายน้ำได้ (ดวงพร, 2537) ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ ไม่เกิดก๊าซและไม่เกิด  $H_2S$  (Aryal, 2015) ได้แก่ PSN-IV-T003 และเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรีย มีรูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ ให้ผล catalase test เป็นบวก มีทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ผล TSI test ของกลุ่มโคลิฟอร์ม เช่น *Klebsiella* และ *Enterobacter* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ เกิดก๊าซและไม่เกิด  $H_2S$  ได้แก่ PPV และเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ที่ให้ผล TSI test ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว ไม่เกิดก๊าซและไม่เกิด  $H_2S$  เช่น *Serratia* (Tankeshwar, 2013) ได้แก่ TSN-VI-R014 TSN-VI-R015 TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.2 PSV-V-R002.3 PPV-VI-R009.2 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2 รวมถึงใกล้เคียงสกุล *Aeromonas* ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อนตรง สามารถเคลื่อนที่ได้ ให้ผล catalase test เป็นบวก และผล TSI test สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส และหรือซูโครสได้ โดยไม่เกิดก๊าซและ  $H_2S$  (Tankeshwar, 2013) ได้แก่ PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.1 และ PPV-VI-R009.1

#### 4.6 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ผลจากการทดสอบความไวของเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลาชนิดทั้ง 16 ไอโซเลท ต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด ได้แก่ Cefoxitin (30  $\mu$ g) Gentamicin (10  $\mu$ g) Ampicillin (10  $\mu$ g) Norfloxacin (10  $\mu$ g) Sulphamethoxazole/Trimethoprim (25  $\mu$ g) และ Erythromycin (15 $\mu$ g) ด้วยวิธี Disk Diffusion ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้เชื้อที่ดี้อยา คือ เชื้อที่ไม่ปรากฏวงใส (clear zone) ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ พบว่า เชื้อที่มีความไวต่อยา Erythromycin มีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R015 และ PSN-IV-T003 และเชื้อที่มีความไวต่อยา Erythromycin ทั้งหมด 14 ไอโซเลท เชื้อที่มีความไวต่อยา Ampicillin มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R015 PPV PSN-IV-T003 และ PPV-VI-R009.2 โดยเชื้อที่ดี้อยา Ampicillin มีทั้งหมด 12 ไอโซเลท เชื้อที่มีความไวต่อยา Cefoxitin มี 5 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R015 PSN-IV-T003 PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.3 และ PPV-VI-R009.2 โดยเชื้อที่ดี้อยา Cefoxitin มีทั้งหมด 11 ไอโซเลท เชื้อที่มีความไวต่อยา Sulphamethoxazole/Trimethoprim มีทั้งหมด 14 ไอโซเลท โดยพบเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลทที่ดี้อยา Sulphamethoxazole/Trimethoprim ได้แก่ TSN-VI-R014 และ PSN-V-R001 และ

พบว่าเชื้อทั้ง 16 ไอโซเลทมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Norfloxacin และ Gentamicin ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ขนาดวงใส (clear zone) (mm.)						
รหัส	Nor	Amp	Gen	Ery	Sul	Cef
TSN-VI-R014	26.4	-	20	-	-	-
	23	-	20.2	-	-	-
	26	-	20.2	-	-	-
เฉลี่ย	25.13	-	20.13	-	-	-
TSN-VI-R015	29	17.2	25.2	11.2	21.2	11.15
	32.2	16.2	23.3	11.2	21	11
	30.2	17.2	25.6	11.2	21	11
เฉลี่ย	30.46	16.86	24.7	11.2	21.06	11.05
TSN-VI-T011	18.35	-	14.25	-	23.3	-
	18.15	-	14.1	-	22	-
	18.15	-	14.1	-	26	-
เฉลี่ย	18.21	-	14.15	-	23.76	-
PSN-V-T002	25.45	-	17	-	26.4	-
	26	-	16	-	29.2	-
	26	-	16	-	28	-
เฉลี่ย	25.81	-	16.33	-	27.86	-
PSV-V-R001	23.2	-	22	-	-	-
	22	-	22	-	-	-
	22.25	-	21.15	-	-	-
เฉลี่ย	22.48	-	21.71	-	-	-
PPV	26	13	21	-	24	-
	28	13	21	-	25	-
	28	13	20.35	-	25	-
เฉลี่ย	27.33	13	20.78	-	24.66	-

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา

ขนาดวงใส (Clear zone) (mm.)						
รหัส	Nor	Amp	Gen	Ery	Sul	Cef
PSV-VI-R010.1	28	-	20	-	26	-
	27	-	20	-	26	-
	26	-	20	-	25	-
เฉลี่ย	27	-	20	-	25.66	-
PSN-IV-T003	29	34	27	23.25	32	30
	30	34	26	22	30	28.3
	29	35	26	23	34	32
เฉลี่ย	29.33	34.33	26.33	22.75	32	30.1
PSV-V-R002.1	26	-	22	-	26	18
	32	-	22	-	28	18
	28.35	-	22	-	30	17
เฉลี่ย	28.78	-	22	-	28	17.66
PPV-VI-R010.1	26.2	-	19	-	26	-
	26	-	19	-	25.3	-
	26	-	19	-	27	-
เฉลี่ย	26.06	-	19	-	26.1	-
PSV-V-R002.2	23.2	-	24	-	27	-
	21	-	23	-	23.2	-
	23	-	24	-	24	-
เฉลี่ย	22.43	-	23.66	-	24.73	-
PSV-V-R002.3	31	-	24	-	27.3	21
	30	-	22.2	-	22	18
	26	-	21	-	29.2	19.2
เฉลี่ย	29	-	22.4	-	26.16	19.4

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

วงใส (Clear zone) (mm.)						
รหัส	Nor	Amp	Gen	Ery	Sul	Cef
PPV-VI-R009.1	29.1	-	28	-	24.2	-
	30.1	-	26	-	23	-
	31	-	24.2	-	22	-
เฉลี่ย	30.06	-	26.06	-	23.06	-
PPV-VI-R009.2	22	12	23	-	28	22
	21	12	23	-	25	20
	21	12	24	-	27	19
เฉลี่ย	21.33	12	23.33	-	26.66	20.33
PPV-VI-R010.2	26.3	-	20	-	25.3	-
	25	-	20	-	23	-
	27	-	20	-	25	-
เฉลี่ย	26.1	-	20	-	24.43	-
PSV-VI-R010.2	26	-	20.2	-	25	-
	25	-	20	-	24	-
	29	-	20	-	24	-
เฉลี่ย	26.66	-	20.06	-	24.33	-

หมายเหตุ : Nor = Norfloxacin (10 µg), Amp = Ampicillin (10 µg), Gen = Gentamicin (10 µg), Ery = Erythromycin (15 µg), Sul = Sulphamethoxazole/ Trimethoprim (25 µg), Cef = Cefoxitin (30 µg)

พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 16 ไอโซเลท เชื้อที่ดื้อต่อยาได้ตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไปมี 10 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R014, TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.1 PSV-V-R002.2 PPV-VI-R009.1 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2 เชื้อที่ดื้อยา 1 และ 2 ชนิด มีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ PPV PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.3 PPV-VI-R009.2 และเชื้อที่ไม่ดื้อยาเลยมีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ TSN-VI-R015 และ PSN-IV-T003 ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับที่	รหัส	ความดื้อต่อยาปฏิชีวนะ	รูปแบบการดื้อยา
1	TSN-VI-R014	Amp Ery Sul และ Cef	MDR
2	TSN-VI-T011	Amp Ery และ Cef	MDR
3	PSN-V-T002	Amp Ery และ Cef	MDR
4	PSV-V-R001	Amp Ery Sul และ Cef	MDR
5	PSV-VI-R010.1	Amp Ery และ Cef	MDR
6	PPV-VI-R010.1	Amp Ery และ Cef	MDR
7	PSV-V-R002.2	Amp Ery และ Cef	MDR
8	PPV-VI-R009.1	Amp Ery และ Cef	MDR
9	PPV-VI-R010.2	Amp Ery และ Cef	MDR
10	PSV-VI-R010.2	Amp Ery และ Cef	MDR
11	PPV	Ery และ Cef	Normal
12	PSV-V-R002.1	Amp และ Ery	Normal
13	PSV-V-R002.3	Amp และ Ery	Normal
14	PPV-VI-R009.2	Ery	Normal
15	TSN-VI-R015	-	Non
16	PSN-IV-T003	-	Non

หมายเหตุ : MDR = Multidrug resistance  
 Normal = Normal resistance  
 Non = Non resistance

รูปแบบการดื้อยาแบบ MDR คือ เชื้อสามารถดื้อยาได้ตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (วิชัย และคณะ, 2552) ซึ่งพบว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปแบบการดื้อยาแบบ MDR ดื้อต่อยา Erythromycin Ampicillin Cefoxitin และ Sulphamethoxazole/ Trimethoprim โดยยา Erythromycin จัดอยู่ในกลุ่ม Macrolide ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียและสารตั้งต้นทางพันธุกรรมของไรโบโซม (50s) ทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต (Bacteriostatic) (อภิย, 2556) ซึ่งกลไกที่สามารถทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ได้ นั้น เกิดจากกลไกการลดการนำยาเข้าสู่เซลล์โดยลดการสร้าง Porins เนื่องจากเป็นโครงสร้างสำคัญที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ (วิชัย และคณะ, 2552) และการขับยาออกนอกเซลล์โดยการสร้าง efflux pump ซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae (สุนัดดา, 2556) ทำหน้าที่ขับยาที่เข้ามาในเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ระดับความเข้มข้นของยาในเซลล์ลดลงจนไม่สามารถยับยั้งเชื่อนั้นได้ ซึ่งการดื้อยาต่อก่อนี้จะเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง (วิชัย และคณะ, 2552)

ส่วนยา Ampicillin และ Cefoxitin ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Penicillin และ Cephalospolin ตามลำดับ ยาทั้งสองกลุ่มนี้มีการออกฤทธิ์คล้ายกัน คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางและทำลายการสร้างผนังเซลล์ทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย (Bactericidal) (วีรวรรณ, 2549) เนื่องจากยาทั้งสองกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนกัน คือ beta-lactam ring ดังนั้นกลไกที่สามารถทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ได้ นั้น คือ เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ทำลายยาได้ เช่น แบคทีเรียบางชนิดจะสามารถผลิตเอนไซม์ Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL) ขึ้นมาทำลายเบต้าแลคแทมในยาปฏิชีวนะ และ Sulphamethoxazole/ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่ม Sulfonamide ออกฤทธิ์ขัดขวางขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของแบคทีเรีย (Greenabhud, 2013) โดยกลไกที่สามารถทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ คือ การเปลี่ยนโครงสร้างเป้าหมายที่จะจับ (Target site) โดยวิธีการนี้ยาจะสามารถเข้าไปในผนังเซลล์ไปถึง target site ได้แต่ไม่สามารถจับกับ target site ได้เพราะมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง molecule จึงทำให้ยาออกฤทธิ์ต่อไม่ได้ (วีรวรรณ, 2549)

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 16 ไอโซเลท พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีลักษณะโคโลนีทึบแสง มันวาว สีครีม รูปร่างกลม ความหนูนยักตัว และขอบเรียบ ( ได้แก่ PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-V-R002. PPV-VI-R009.1 PPV-VI-R009.2 และ PSV-VI-R010.2) โดยเชื้อทั้ง 16 ไอโซเลท ติดสีแดงของ safranin มีรูปร่างท่อนสั้น และให้ผล catalase test เป็นบวก พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ ( ได้แก่ TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PPV PSN-IV-T003 PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.2 PSV-V-R002.3 PPV-VI-R009.1 และ PPV-VI-R009.2) และเชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส ไม่สร้างก๊าซและไม่สร้าง H<sub>2</sub>S ( ได้แก่ TSN-VI-R014 TSN-VI-R015 TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-V-R002.1 PSV-V-R002.2 PSV-V-R002.3 PPV-VI-R009.2 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2)

จากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด พบว่า เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ 10 ไอโซเลท ( ได้แก่ TSN-VI-R014, TSN-VI-T011 PSN-V-T002 PSV-V-R001 PSV-VI-R010.1 PPV-VI-R010.1 PSV-V-R002.2 PPV-VI-R009.1 PPV-VI-R010.2 และ PSV-VI-R010.2) มีรูปแบบการดื้อยาแบบ MDR เชื้อมีอัตราการดื้อสูงสุดต่อยาปฏิชีวนะ Erythromycin รองลงมา คือ Ampicillin และ Cefoxitin และเชื้อมีความไวสูงสุดต่อยาปฏิชีวนะ Norfloxacin และ Gentamicin รองลงมา คือ Sulphamethoxazole/ Trimethoprim

โดยประโยชน์ของงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางรณรงค์การควบคุมและป้องกันการดื้อยาปฏิชีวนะ และยังใช้เป็นข้อมูลติดตามประเมินประสิทธิผลของการควบคุมและป้องกันการดื้อยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรจะมีการทดสอบทางชีวเคมีควบคู่กับการทดสอบในระดับชีวโมเลกุลเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อให้สามารถระบุได้ชัดเจนว่ารูปแบบการดื้อยาแบบ MDR พบได้ในเชื้อสายพันธุ์ใด

## เอกสารอ้างอิง

- กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2548. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บุญศิริการพิมพ์
- กรมประมง. 2556. การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <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=5>
- กระทรวงสาธารณสุข. 2553. อภ.แนะวิธีรับประทานยาปฏิชีวนะ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : [http://pr.moph.go.th/iprg/include/admin\\_hotnew/show\\_hotnew.php?idHot\\_new=47708](http://pr.moph.go.th/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=47708)
- จूरีย์รัตน์ สีสmith. 2548. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- เจริญ เจริญชัย. 2556. การระบุชนิดจุลินทรีย์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <https://ajarncharoen.wordpress.com/2011/09/07/identify/>
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- ชัยพงศ์ ธรรมบรรหาร. 2558. วิวัฒนาการของยาปฏิชีวนะสู่การดื้อยาในปัจจุบัน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.gpo.or.th/Portals/6/Newsletter/RDINewsYr22No4-5.pdf>
- ธีระชัย ธนानันต์. 2540. ปฏิบัติการ : แบคทีเรียวิทยา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://digi.library.tu.ac.th/textbook/009/08chapter5.pdf>
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบอส. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- นิธิตา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทจจิตต์, สิตานันท์ พูลผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ขวนชื่น และภูษิต ประคองสาย. 2558. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.fda.moph.go.th/sites/drug/Shared%20Documents/AMR/06.pdf>
- บรมพจน์ พฤตวิวัฒนาสันต์ และลีณา สุนทรสุข. 2560. อันตรายจากยาดกค้างในสิ่งแวดล้อม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/390>
- บุญชูธรรม วัชร์อุตสาห. 2558. เชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรีตั้งแต่ปี 2552-2556. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.ayhosp.go.th/ayh/images/Knowledge/JOHS/johs-y17v03s08.pdf>

- วสุ อมฤตสุทธิ. 2547. การพัฒนาวิธีการประเมินความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยวิธีเตตราโซเลียม. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : [http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/1682/2/wasu\\_fulltext.pdf](http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/1682/2/wasu_fulltext.pdf)
- วันทนีย์ โลหะประภิตกุล. 2559. วิภฤติเชื้อดื้อยา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://haamor.com/th>
- วิชัย สันติมาลีวรกุล, สุทธิพร ภัทรชยากุล และโพยม วงศ์ภูวรักษ์. 2552. สถานการณ์การติดเชื้อและกลไกการดื้อยาโดยเชื้อ *Acinetobacter baumannii*. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : [http://www.prachanath.su.ac.th/tbps/tbps2007\\_1/tbps2007\\_1\\_161-176.pdf](http://www.prachanath.su.ac.th/tbps/tbps2007_1/tbps2007_1_161-176.pdf)
- วิพรพรรณ เนื่องเม็ก, วัฒนศักดิ์ จำละคร และอนิรุช เนื่องเม็ก. 2555. การแยกเชื้อและความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟิลาที่แยกได้จากปลานิลปกติในกว๊านพะเยา. แก่นเกษตร. (40) : 355-361
- วิชณู ธรรมลิขิตกุล. 2560. โครงการควบคุมและป้องกันการดื้อยาด้านจุลชีพในประเทศไทย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : [http://doi.nrct.go.th/ListDoi/Download/376590/7ad3cd39f885019a6e1d1a8455e98349?Resolve\\_DOI=10.14457/MU.res.2017.1](http://doi.nrct.go.th/ListDoi/Download/376590/7ad3cd39f885019a6e1d1a8455e98349?Resolve_DOI=10.14457/MU.res.2017.1)
- วีรวรรณ ลูวิระ. 2549. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : [http://medinfo.psu.ac.th/smj2/smj24\\_5/pdf24\\_5/07veravan.pdf](http://medinfo.psu.ac.th/smj2/smj24_5/pdf24_5/07veravan.pdf)
- วีระชัย โชควิณญ. 2530. เทคนิคการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำด้านแบคทีเรีย. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- ศรายุทธ นามพุทธา และปิยวัฒน์ สายพันธุ์. 2560. การดื้อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของเชื้อแอโรโมนาส ไฮโดรฟิลาที่แยกได้จากปลานิล. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : [https://www.tci-thaijo.org/index.php/snru\\_journal/article/download/104422](https://www.tci-thaijo.org/index.php/snru_journal/article/download/104422)
- ศิริพร วงศ์ดินดำ. 2549. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา ESBLs และ AmpC และอุบัติการณ์ของ CTX-M gene ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลรามาริบัติ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <https://ctxm.wordpress.com/>
- ศิริลักษณ์ อนันต์ณัฐศิริ และเพลินจันทร์ เซษฐ์โชติศักดิ์. 2555. การบริหารยาในกลุ่ม Aminoglycosides. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://disphangnga.blogspot.com/2012/03/aminoglycosides.html?m=1>
- สมหมาย ยุพานิชสัมพันธ์. 2550. โรคติดเชื้อแอโรโมนาสในปลา. จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 6(6): 1-3.
- สุนัดดา โยมญาติ. 2556. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://biology.ipst.ac.th/?p=981>
- สุวณี สุภเวทย์ และมาลัย วรจิตร. 2540. แบคทีเรียพื้นฐาน = Basic bacteriology. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิริยอด

- อภัย ราชภูริจิตร. 2556. ยาอีริโทรมัยซิน (Erythromycin). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://haamor.com/th/>
- อภิญญา จันทรวัดนะ. 2556. จุลชีววิทยา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://anonmicrobiology.blogspot.com/>
- อรดี แจ่มอุติรัตน์. 2554. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย และพีคัลโคลิฟอร์มแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://reo06.mnre.go.th/home/images/upload/file/report/work2554/ordee02.pdf>
- อัมพร อยู่บาง. 2552. อยากรู้ใหม่ ทำไมถึงดื้อยา. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.yourhealthyguide.com/article/ag-medicine-obstruct.html>
- A. M. Tihamiyu, M.O. Soladoye, T.T. Adegboyega, M.O. Adetona. 2015. "Occurrence and Antibiotic Sensitivity of Bacterial Strains Isolated from Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Obtained in Ibadan, Southwest Nigeria" 3 : 19-26.
- Al-Bahry, S.N., I.Y. Mahmoud, K.I.A. Al-Belushi, A.E. Elshafie, A. Al-Harthy, and C.K. Bakheit. 2009. Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere* 77(11): 1534 –1539.
- Calomiris, J.J., J.L. Armstrong, and R.J. Seidler. 1984. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1238 – 1242.
- Dalynn. 2014. **Motility agar (TTC)**. [Online]. Available : [http://www.dalynn.com/dyn/ck\\_assets/files/tech/TM80.pdf](http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM80.pdf)
- Erin R. Sanders. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J Vis Exp* ; (63): 3064
- G. Szita, G. Biro, *Acta Vet. Hung.* 1986. Brilliant Green Bile Lactose Broth. 34, 145
- Goni-Urriza, M., M. Capdepuy, C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette and C. Quentin. 2000. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 6(1): 125 – 132.
- Greenabhud. 2013. **Antimicrobial** . [Online]. Available : <https://geenabhud.wordpress.com/2013/04/13>

- Hardy. 2009. **Brilliant Green Bile Broth with Durham Tube** [Online]. Available : [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/content/hugo/brillgrnbilebrthd.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/brillgrnbilebrthd.htm)
- Henry R. J. 1943. The mode of action of sulfonamides. *Bacteriol. Rev.* 7(4):175-262.
- Himedialabs. 2015. **Brilliant Green Bile Broth 2%**. [Online]. Available : <http://himedialabs.com/TD/M121.pdf>
- Holten K. B. & Onusko E. M. 2000. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *Am. Fam. Physician.* 62(3): 611-620
- Honestdocs. 2018. **Range of action of the drug**. [Online]. Available : <https://www.honestdocs.co/range-of-action-of-the-drug>
- Jae Kyun Hur. (2008). The use of fluoroquinolone in children. *Korean J Pediatr;* 51(10): 1042-1046
- Juliana Alves Resende, Vânia L. Silva, 2012. “Multidrug-Resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System” *Microbes Environ.* 27(4) : 449–455.
- Ma. Carmen E. Delgado-Gardea, Patricia Tamez-Guerra. 2016. “Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico” *J Environ Res Public Health.* 13(6) : 1-15.
- MacFaddin, Williams and Wilkins, Baltimore, Tittsler R.P., and L.A. Sandhoizer, J. *Bacteriol.* 1936. “Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria” 31 : 575,
- Nature. 2017. **Antibiotic resistance gram negative**. [Online]. Available : <https://lungwee.com/tag/>
- Pathak, S.P. and K. Gopal. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research* 98(1): 100 – 103.
- Pegler S. & Healy B. (2007). In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *BMJ.* 335(7627): 991.
- Piumsombun, S. (2003). Analysis of demand for fish consumed at home in Thailand. *Fisheries Gazette,* 56, 113–121.
- Prescott MI, Harle JD, Klein DA. (2002). *Microbiology of Food.* 5th ed. McGraw-Hill Ltd, New York, USA. pp. 964-976.

- Rhodes, G., G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, and R.W. Pickup. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of xTn 1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3883 – 3890.
- S. P. Wamala, K. K. Mugimba, S. Mutoloki, Ø. Evensen, R. Mdegela, D. K. Byarugaba and H. Sørum. 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
- Sagar Aryal. 2015. **Biochemical Test and Identification of *Pseudomonas aeruginosa*.** [Online]. Available : <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-pseudomonas-aeruginosa/>
- Sagar Aryal. 2015. **Catalase Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation with Precautions.** [Online]. Available : <https://microbiologyinfo.com/catalase-test-principle-uses-procedure-result-interpretation-with-precautions/>
- Salvador Alvarez-Elcoro M.D., Mark J. Enzler M.D. 1999. **The Macrolides: Erythromycin, Clarithromycin, and Azithromycin.** [Online]. Available : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025619611641402>
- Tankeshwar Acharya. 2013. **Enterobacteriaceae Family: Common Characteristics.** [Online]. Available : <https://microbeonline.com/seven-common-characteristics-family-enterobacteriaceae/>
- Tankeshwar Acharya. 2013. ***Vibrio cholerae* laboratory diagnosis and confirmation.** [Online]. Available : <https://microbeonline.com/vibrio-cholerae-laboratory-diagnosis-confirmation/>
- Zembower TR, Noskin GA, Postelnick MJ, Nguyen C, Peterson LR. 1998. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance. *Int J Antimicrob Agents*; 10: 96.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

#### Stock culture medium

##### Brain Heart Infusion Broth

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

Brain heart infusion	37	กรัม
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	150	มิลลิลิตร

การเตรียม : ชั่งสารตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใส่ลงในขวด นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

##### Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) broth

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Oxgall	20.0	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสารตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง บรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) ในหลอดอาหารในลักษณะคว่ำ นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

##### Motility medium

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

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

การเตรียม : ชั่งสารตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใส่หลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## Mueller Hinton Agar (MHA)

## ส่วนประกอบต่อลิตร

Beef extract power	2	กรัม
Acid Digest of Casein	17.5	กรัม
Soluble starch	1.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
pH	7.3 ± 0.1	

การเตรียม : ชั่งสารตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วใส่ในขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## Nutrient Agar (NA)

## ส่วนประกอบต่อลิตร

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

การเตรียม : ชั่งสารตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วใส่ในขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## 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	0.2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Agar	12	กรัม

Phenol red	0.024	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม : ชั่งสารตามปริมาณที่กำหนด ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใส่หลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

## ภาคผนวก ข

ผลการทดลองการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลบนอาหาร TSI

Stain	TSI Tests				
	สีอาหาร		เกิด	เกิด	การแปลผล
	Slant	button	H <sub>2</sub> S	gas	
TSN-VI-R014	แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
					
TSN-VI-R015	แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
					
TSN-VI-T011	แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
					
PSN-V-T002	แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
					

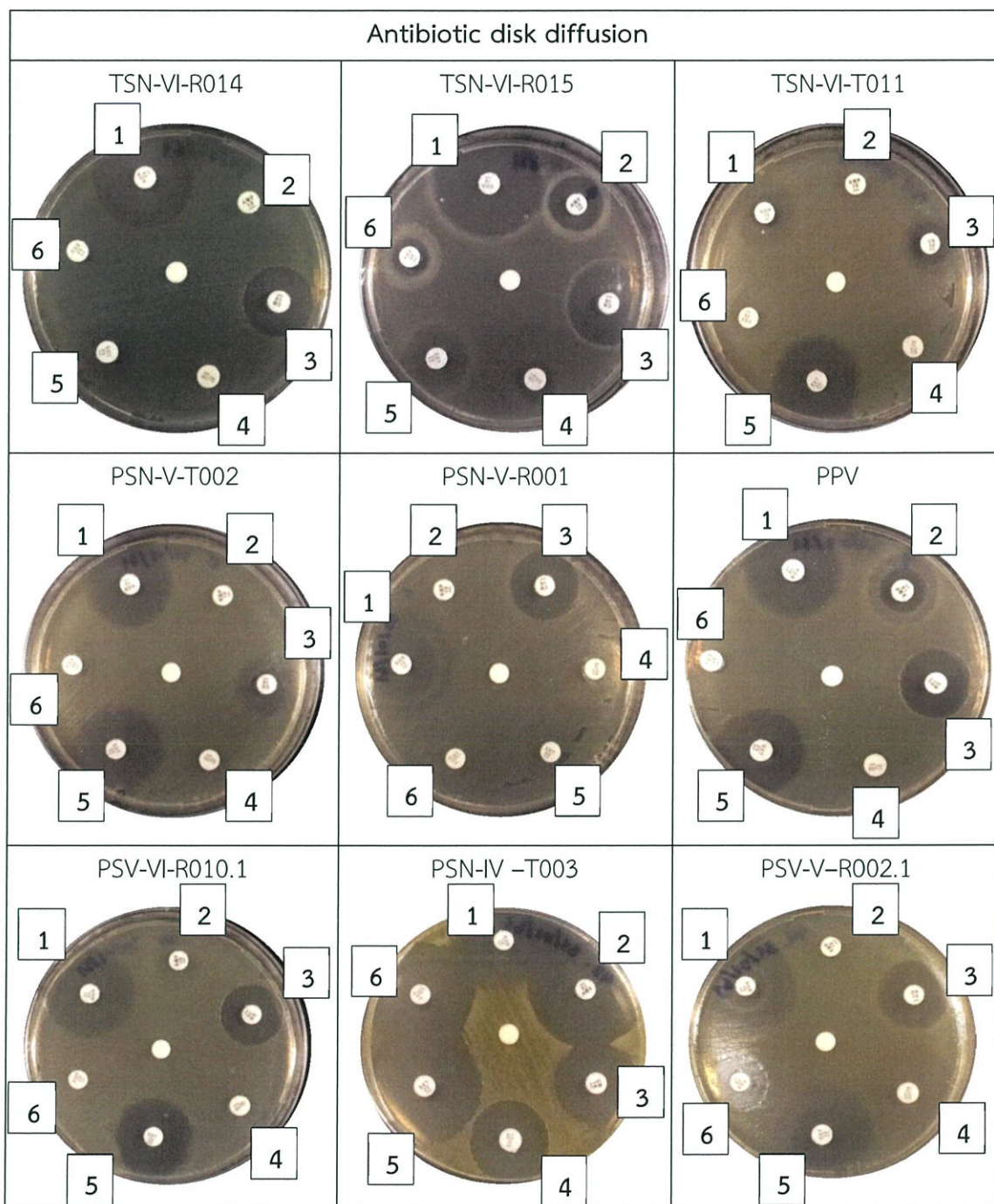
Stain		TSI Tests				การแปลผล
		สื่ออาหาร		เกิด	เกิด	
		Slant	button	H <sub>2</sub> S	gas	
PSV-V-R001		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						
PPV		เหลือง	เหลือง	-	+	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส แลคโตส และหรือ ซูโครส
						
PSV-VI-R010.1		เหลือง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส แลคโตส และหรือ ซูโครส
						
PSN-IV-T003		ส้ม	ส้ม	-	-	ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง
						

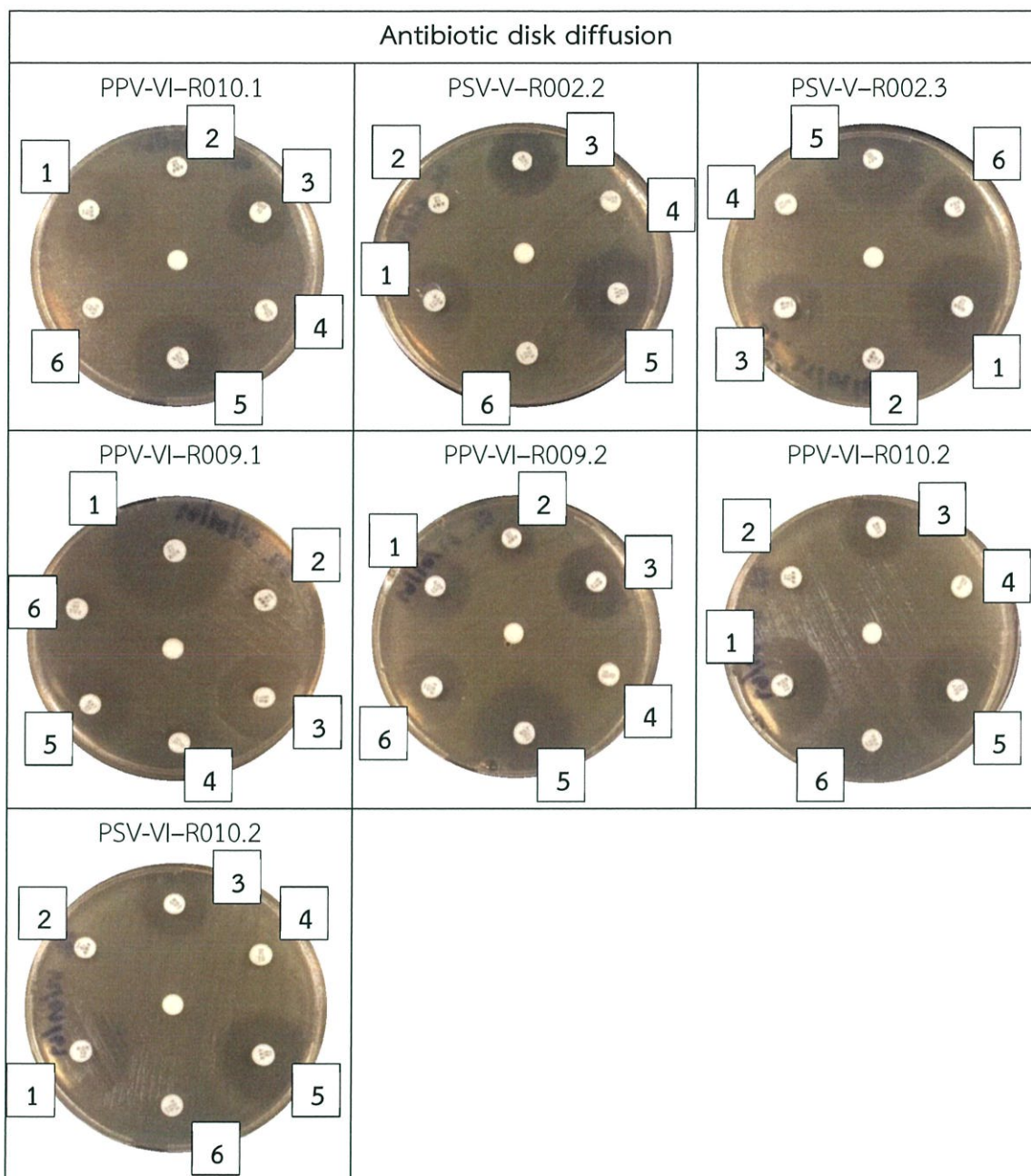
Stain		TSI Tests				การแปลผล
		สื่ออาหาร		เกิด	เกิด	
		Slant	button	H <sub>2</sub> S	gas	
PSV-V-R002.1		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						
PPV-VI-R010.1		เหลือง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส แลคโตส และหรือ ซูโครส
						
PSV-V-R002.2		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						
PSV-V-R002.3		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						

Stain		TSI Tests				การแปลผล
		สื่ออาหาร		เกิด	เกิด	
		Slant	button	H <sub>2</sub> S	gas	
PPV-VI-R009.1		เหลือง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส แลคโตส และหรือ ซูโครส
						
PPV-VI-R009.2		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						
PPV-VI-R010.2		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						
PSV-VI-R010.2		แดง	เหลือง	-	-	สร้างกรด จากการหมัก น้ำตาล กลูโคส
						

## ภาคผนวก ค

แสดงภาพการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลา







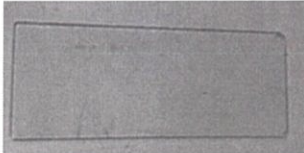


- |    |                                |    |    |
|----|--------------------------------|----|----|
| 1. | Norfloxacin                    | 10 | µg |
| 2. | Ampicillin                     | 10 | µg |
| 3. | Gentamicin                     | 10 | µg |
| 4. | Erythromycin                   | 15 | µg |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








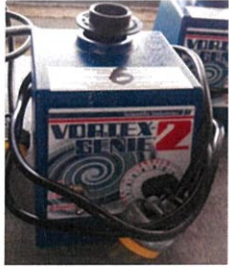
## ภาคผนวก ง

## อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	ภาพ	ชื่อ	ภาพ
Autoclave		Beaker	
Bunsen burner		Compound light microscope	
Cotton swabs		Cylinder	
Cork cotton		Cuvette	

ชื่อ	ภาพ	ชื่อ	ภาพ
Digital balance		Dropper	
Duran		Forcep	
Freezer -20 °C		Freezer -80 °C	
Glass Pipette		Glass slide	
Hot air oven		Incubator	

ชื่อ	ภาพ	ชื่อ	ภาพ
Loop and Needle		Laminar flow cabinet	
Lens cleaning paper		Microcentrifuge tube	
Micropipette		Microwave	
Petri dish		Rack	
Refrigerator		Rubber bulb	

ชื่อ	ภาพ	ชื่อ	ภาพ
Spatula		Stirring rod	
Spectrophotometer		Test tube	
Tips		Vernier Caliper	
Volumetric flask		Vortex mixer	

## ภาคผนวก จ

แสดงลำดับใน Stock และรหัสของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำฟาร์มเลี้ยงปลานิล

ลำดับ Stock	รหัส
2	TSN-VI-R014
4	TSN-VI-R015
T011	TSN-VI-T011
5	PSN-V-T002
6	PSV-V-R001
7	PPV
38	PSV-VI-R010.1
42	PSN-IV-T003
44	PSV-V-R002.1
46	PPV-VI-R010.1
49	PSV-V-R002.2
50	PSV-V-R002.3
54	PPV-VI-R009.1
56	PPV-VI-R009.2
57	PPV-VI-R010.2
58	PSV-VI-R010.2