



การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลวibriโอที่แยกได้จากปลากระพงขาว ที่เลี้ยงในฟาร์ม อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ

สิทธิชน รัตนจันทร์^{1,*} และสุกัญญา พลิตกุล²

¹ภาควิชาคลินิกสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: การสูญเสียผลผลิตปลากระพงขาวที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มพบว่าส่วนหนึ่งเกิดจากสาเหตุของโรคติดเชื้อ ซึ่งโรค vibrios (vibriosis) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียสกุลวibriโอ ทั้งนี้ปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถควบคุมได้ด้วยการให้ยาต้านจุลชีพแต่อย่างไรก็ตามหากมีการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสมย่อมส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียดังกล่าวได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงเป็นการสำรวจแบคทีเรียสกุลวibriโอที่แยกได้จากปลากระพงขาวที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ทั้งหมด 92 ตัวอย่าง เพื่อศึกษา ลักษณะของแบคทีเรียและทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ 7 ชนิด ได้แก่ cephalixin, sulfa-trimethoprim, chloramphenicol, tetracycline, nalidixic acid, oxytetracycline และ ampicillin ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS agar และพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลต (isolate) นั้นเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl ที่ 2% และ 4% เมื่อนำแบคทีเรียมาย้อมสีแกรมและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีลักษณะเป็น gram negative curved rods ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียให้ผลการทดสอบ oxidase test และ catalase test เป็นผลบวกทุก isolate และมีคุณสมบัติในการสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar ส่วนผลการทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ 7 ชนิด ดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีความไวรับต่อยาต้านจุลชีพชนิด tetracycline และ chloramphenicol มากที่สุดคิดเป็น 82.81% ของตัวอย่างทั้งหมดแต่พบว่าแบคทีเรียมีความต้านทานต่อยาต้านจุลชีพชนิด ampicillin มากที่สุดคิดเป็น 78.91%

คำสำคัญ: แบคทีเรียในสกุลวibriโอ ปลากระพงขาว สมุทรปราการ ยาต้านจุลชีพ

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2561. 13(1): 49-59.

E-mail address: rsitthich@mut.ac.th

Characterization and Qualification of *Vibrio* spp. Isolated from Farmed White Seabass in Phra Samut Chedi, Samut Prakan

Sitthichon Rattanachan^{1,#} and Sukanya Phalitakul²

¹Department of Aquatic Animal Clinic; ²Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok, 10530

Abstract: The most common disease that has been reported in estuarine animals is vibriosis, a bacteria of genus vibrio. Generally, the outbreak of vibriosis in fish can be controlled by using antimicrobial agents, however, improper use of medicines in fish farm might lead to overpopulation of antimicrobial resistant bacteria. Therefore, the objective of this study is to survey of bacteria of genus vibrio that can be isolated from 92 samples of farmed white seabass in Phra Samut Chedi, Samut Prakan, which focuses on biological characteristics and profiling of antimicrobial susceptibility pattern against 7 antimicrobial agents including cephalixin, sulfa-trimethoprim, chloramphenicol, tetracycline, nalidixic acid, oxytetracycline and ampicillin, respectively. The result shown that all isolated bacteria grew on a selective medium, TCBS agar. In addition, all isolates were grown properly in a medium enriched by 2% and 4% NaCl. Subsequently, bacteria were identified using a gram staining test and some biochemical tests. It found that all bacterial isolates are gram negative curved-rod and shown oxidase-positive and catalase- positive results, additionally, all sampling bacteria can hemolyse red blood cell on blood agar. From antimicrobial susceptibility test, it found that 82.81% of bacteria are susceptible to tetracycline and chloramphenicol but 78.91% are resistant to ampicillin.

Keywords: *Vibrio* spp., Sea bass, Samut Prakan, Antimicrobial agents

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(1): 49-59.

E-mail address: rsitthich@mut.ac.th

บทนำ จากการสำรวจในปัจจุบันพบว่าความนิยมในการบริโภคเนื้อปลามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั้งภายใน	และภายนอกประเทศไทย ซึ่งทำให้ปลากลายมาเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>) ซึ่งนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย
---	---

ในประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาที่โตเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย มีมูลค่าสูง จากข้อมูลรายงานของกรมประมงว่า ในช่วง ปี พ.ศ. 2550 - พ.ศ. 2554 พบว่าการผลิตจากการเพาะเลี้ยงมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มทั้งปริมาณและมูลค่าในอัตราร้อยละ 8.16 และร้อยละ 11.39 ต่อปี ตามลำดับ โดยในปี 2550 การผลิตมีปริมาณ 9,703 ตัน มูลค่า 1,069.84 ล้านบาท เพิ่มขึ้นเป็นปริมาณ 13,697 ตัน มูลค่า 1,720.75 ล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร ปี พ.ศ. 2557) แต่เนื่องจากปลากะพงขาวเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงในน้ำกร่อย หากการจัดการหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมนั้นย่อมเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรค vibriosis ได้ ซึ่งโรคดังกล่าวเป็นโรคติดเชื้ออันเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบในสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) เช่น *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. anguillarum* (ชาญณรงค์, 2550) โดยจะพบว่าปลาที่ได้รับเชือนั้นจะมีรอยโรคที่พบ ได้แก่ การพบจุดหรือปื้นเลือดตามผิวหนังและที่เหงือก ร่วมกับการพบแผลหลุมตามลำตัว นอกจากนี้เมื่อผ่าชันสูตรโรคในปลาที่แสดงอาการป่วยหรือตายนั้นพบว่า มีจุดเลือดออกกระจายตามอวัยวะภายใน มีขนาดโตขยาย พบการอักเสบของทางเดินอาหาร และพบภาวะโลหิตจางอันเนื่องมาจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย ได้แก่ hemolysin (Bullock, 1977) และจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจะพบว่า มีจุดเนื้อตายที่ม้าม ไต และตับ ซึ่งปลาที่มีการติดเชื้อจะมีการกินอาหารลดลงและทยอยตาย โดยพบว่าอัตราการติดเชื้อและอัตราการตายของปลานั้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อน้ำมีความเค็มประมาณ 20-30 กรัมต่อลิตร (ชาญณรงค์, 2550) ทั้งนี้เกษตรกรสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้ด้วยการเพาะเลี้ยงและการ

จัดการฟาร์มอย่างเหมาะสม เช่น มีการควบคุมปริมาณอาหารที่ให้แก่ปลากะพงในระดับที่เหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงการตกค้างและการเน่าบูดของอาหารในแหล่งน้ำที่เพาะเลี้ยง ร่วมกับการควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำดังกล่าว และโรค vibriosis ในปลากะพงขาวที่เพาะเลี้ยงนั้นสามารถควบคุมได้ด้วยการให้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่มักจะหาซื้อยาต้านจุลชีพมาใช้รักษาเอง จึงทำให้สัตว์อาจได้รับยาไม่ตรงกับเชื้อที่เป็นสาเหตุ หรือได้รับในปริมาณที่ไม่ถูกต้อง (Cabello, 2006) ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการื้อยาของแบคทีเรียตามมา ทำให้การรักษาโรค vibriosis ทำได้ยากขึ้น จึงเป็นผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังอาจก่อให้เกิดการตกค้างของยาต้านจุลชีพในสัตว์และสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งปลาหรือสัตว์น้ำที่ติดเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติต้านต่อยาต้านจุลชีพนี้จะเป็นพาหะเหนี่ยวนำให้เกิดการแพร่ระบาดของแบคทีเรียดังกล่าวในแหล่งน้ำ และตลอดจนผู้บริโภคซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ได้เนื่องจากได้รับแบคทีเรียหรือยีนส์ (genes) ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อยาต้านจุลชีพที่ปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำได้ (Sarter *et al.*, 2006)

เนื่องจากในพื้นที่อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการนั้นเป็นบริเวณที่มีกลุ่มของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากะพงขาวอยู่ค่อนข้างมาก ด้วยเหตุนี้จึงมีความสนใจที่จะทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียในสกุลวิบริโอในพื้นที่ดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลนำเสนอลงถึงปัญหาของการใช้ยาต้านจุลชีพโดยเกษตรกรในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กลุ่มประชากรที่ศึกษา การสุ่ม และการคำนวณขนาดตัวอย่าง

กลุ่มประชากรที่นำมาศึกษา คือ ปลากระพงขาวน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม จากฟาร์มในพื้นที่อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ที่เลี้ยงในบ่อดิน โดยเลือกจากบ่อเพาะเลี้ยงที่มีค่าความเค็ม (salinity) ของน้ำเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยตรวจความเค็มของน้ำด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง (Extech Portable Salinity Refractometer, 0-100 ppt, Sigma-Aldrich®, Germany) ซึ่งการศึกษานี้ดำเนินการศึกษาในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2559 ถึง มกราคม พ.ศ.2560 โดยเก็บตัวอย่างด้วยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบ purposive sampling ซึ่งกลุ่มตัวอย่างเป้าหมาย คือ ปลาที่พบรอยโรคเป็นแผลหลุมและครีมีลักษณะเป็นสีแดง จำนวนปลาทั้งหมด 92 ตัว ซึ่งได้จากการคำนวณขนาดตัวอย่างที่ไม่ทราบจำนวนประชากรที่แน่นอน โดยกำหนดความชุกที่คาดหวังของปลาที่พบรอยโรคที่ร้อยละ 61 (Yong และ Seng, 1990) และกำหนดให้ค่าคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ที่ร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

การเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย

ทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากตัวอย่างปลากระพงขาวที่มีรอยโรคโดยการ swab ที่รอยโรคบนลำตัวของปลาป่วยและเก็บลงใน transport media คือ alkaline peptone water ที่มี NaCl 3% จากนั้นจึงนำหลอดเก็บตัวอย่างจากฟาร์มนำไป บ่มในตู้อบ (Memmert™) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย แล้วจึงนำแบคทีเรียที่บ่มได้มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบหลอดกล้วครั้งละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) และนำแบคทีเรียที่เจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงบน

ผิวของอาหารวุ้นแข็งในจานเพาะเชื้อที่เป็น selective media ของแบคทีเรียสกุล vibrio ได้แก่ TCBS agar (Oxoid™, UK) และนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงเลือกโคโลนีตามสีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนำมาบ่มเพาะในอาหารวุ้นแข็งชนิด Tryptone Soya agar (TSA, Oxoid™, UK) ที่มี NaCl เท่ากับ 3% เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างแบคทีเรียสำหรับทดสอบคุณลักษณะในห้องปฏิบัติการต่อไป

การตรวจคุณลักษณะของแบคทีเรีย

การตรวจคุณลักษณะของแบคทีเรียในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ การย้อมสีแกรม (gram stain) ด้วยชุดสีย้อมแกรม (Gram-Stain kit, Himedia® India) และจึงนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อใช้ดูรูปร่างลักษณะของแบคทีเรียและการย้อมติดสีแกรม นอกจากนี้ได้การตรวจทางชีวเคมีพื้นฐาน ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase (catalase test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase (oxidase test) และการตรวจทดสอบคุณสมบัติการสลายเม็ดเลือดแดงบน TSA agar ที่มีเกลือ NaCl เท่ากับ 3% และเลือดแกะที่ 5% (blood agar) โดยสุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากระพงขาวในห้องปฏิบัติการมาจากทั้งหมด 128 โคโลนี มาจำนวน 32 โคโลนี (คิดเป็น 25%) จาก TSA agar ที่มีเกลือ NaCl เท่ากับ 3 % มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูการสลายของเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ได้มีการทดสอบคุณสมบัติการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกัน โดยนำแบคทีเรียสกุล vibrio

แต่ละไอโซเลทมาเพาะลงใน alkaline peptone water ที่มีระดับความเข้มข้นเกลือที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นจึงนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ซึ่งหลังจากที่ incubate แบคทีเรียที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เพื่อบันทึกผลการทดลอง

การทดสอบความไวรับของแบคทีเรียสกุล วิปริโอต่อยาต้านจุลชีพ

แบคทีเรียจากตัวอย่างปลากระพงขาวในฟาร์ม นั้นจะนำมาทดสอบความไวรับ (susceptibility test) (รสมา และคณะ, 2560) ของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 7 ชนิด (Oxoid™, UK) ได้แก่ 1) cephalexin (30 µg) 2) sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg) 3) chloramphenicol (30 µg) 4) tetracycline (30 µg) 5) nalidixic acid (25 µg) 6) oxytetracycline (30 µg) และ 7) ampicillin (10 µg) ตามลำดับ โดยใช้วิธี Kirby-Bauer disc diffusion test (Bauer *et al.*, 1966) โดยนำแบคทีเรียแต่ละ isolate ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพาะลงบน Mueller-Hinton agar (Oxoid™, UK) จากนั้นจึงนำแผ่นยา (antimicrobial disc) ทั้ง 7 ชนิด วางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลการทดลองโดยวัด inhibition zone ของแบคทีเรียและแปลผลตามวิธีของ Bauer *et al.* (1966) และตามคำแนะนำของ CLSI, EUCAST, BSAC (Oxoid™, UK) และ CDC เป็นต้น

การวิเคราะห์ผลการทดลองและข้อมูลทางสถิติ

เก็บข้อมูลการทดลองโดยตรวจดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบน TCBS agar สีของโคโลนีที่เกิดขึ้น การติดสีแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย และผลทดสอบชีวเคมี ได้แก่ catalase test และ oxidase test ร่วมกับตรวจหาแบคทีเรียที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (blood hemolysis) บน blood agar การนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0 – 10% และนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียต่ออาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 1 มิลลิลิตร (CFU/ml) และนำไปหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่อไป สำหรับการอ่านผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทำได้โดยการวัด inhibition zone เป็นหน่วยมิลลิเมตร หลังจากนั้นจะนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง Kirby-Bauer เพื่อแปลผลข้อมูลออกมาเป็น susceptible (S) intermediate (I) หรือ resistant (R) และเก็บข้อมูลโดยการแยกนับจำนวน isolate ของแบคทีเรียที่ให้ผลในสามรูปแบบดังกล่าวโดยจะแสดงข้อมูลในรูปของร้อยละหรือเปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์การทดลอง

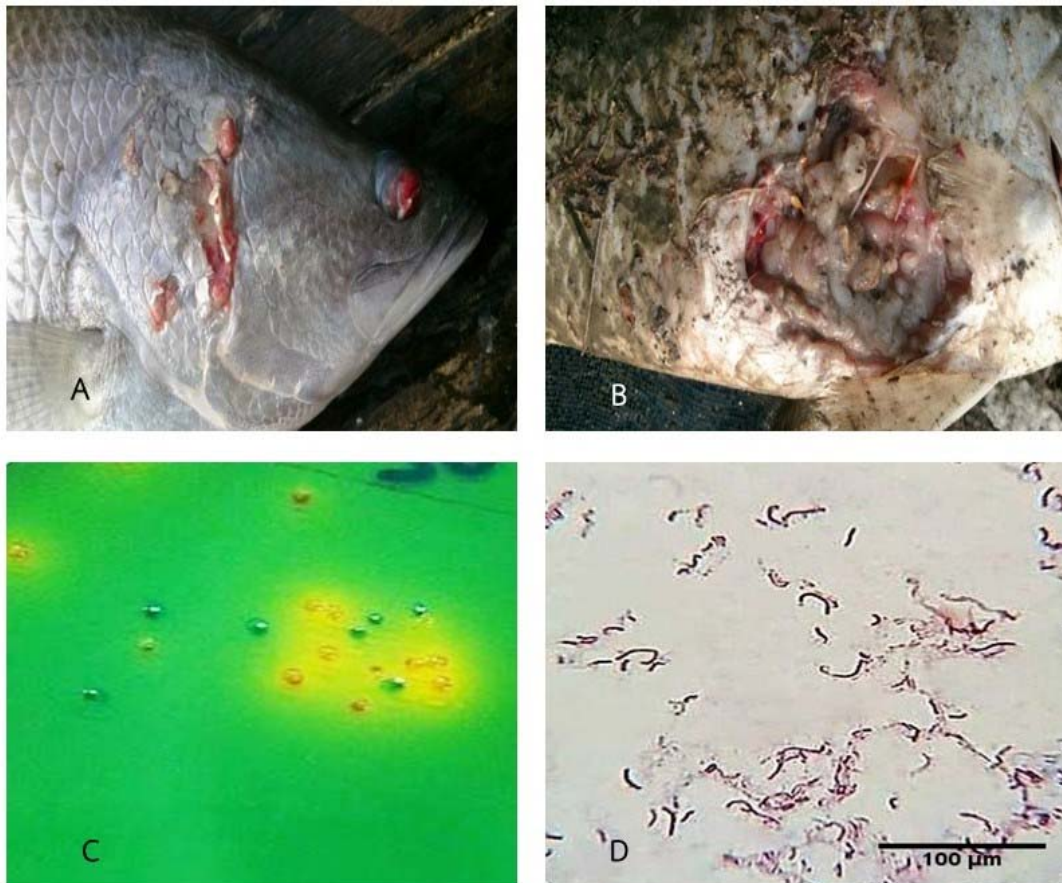
จากการสำรวจฟาร์มเลี้ยงปลากระพงขาวในเขตพื้นที่อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ที่เลี้ยงในบ่อดิน พบว่าปลามีชีวิตขนาดจับขายในช่วงเวลาที่เข้าไปเก็บตัวอย่างจะมีน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 1 กิโลกรัม พบว่าปลาส่วนใหญ่จะมีรอยโรคเป็นแผลหลุมและครีบมีลักษณะเป็นสีแดง (รูปที่ 1 A และ B) และเมื่อนำแบคทีเรียที่เจอจากมาเพาะบน

ชนิด selective media คือ TCBS agar และเมื่อตรวจดูลักษณะโคโลนี (colony) ของแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบน TCBS agar จะพบว่ามีลักษณะกลม ขอบเรียบมีสีของโคโลนีทั้งสีเหลืองและสีเขียว (รูปที่ 1 C) ซึ่งขึ้นอยู่กับการใช้น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของแบคทีเรีย หากแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลได้ (sucrose fermenter) จะพบโคโลนีสีเหลือง โดยแบคทีเรียที่สกุล vibrio ที่พบลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลืองได้แก่ *V. alginolyticus* *V. cholerae* *V. furnissii* และ *V. fluvialis* (Woodring et al., 2012) ส่วนแบคทีเรียชนิดที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลได้จะพบโคโลนีสีเขียวหรือสีเขียวอมน้ำเงิน ได้แก่ *V. Parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. mimicus* (Woodring et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า TCBS agar สามารถใช้เพื่อจำแนกแบคทีเรียสกุล vibrio ได้เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบของ TCBS agar มีความเข้มข้นของ thiosulfate และ citrate ที่สูง และมีค่า alkalinity ที่สูง ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆ ที่จำเป็นต้องใช้กลูโคสในการเจริญเติบโต (glucose fermenters) ซึ่งใน TCBS จะมีเฉพาะน้ำตาลซูโครส (sucrose) เท่านั้น (Hervert et al., 2016) แต่ที่น่าสนใจคือจากงานวิจัยของ Woodring (2012) และ Kumaran (2010) พบว่าแบคทีเรียบางชนิดที่มีก่อโรคในปลา กะพงและสามารถเจริญเติบโตบน TCBS agar ได้แก่ *Aeromonas* spp. (Woodring et al., 2012) และ *Pseudomonas* spp. (Kumaran et al., 2010) เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมว่าแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา กะพงจากฟาร์มที่เก็บตัวอย่างนั้น คือ แบคทีเรียในสกุล vibrio ซึ่งปัจจุบันมีชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการ

การจำแนก species ของแบคทีเรียโดยตามโปรไฟล์ผลทดสอบทางชีวเคมี เช่น API (Analytical Profile Index) และอีกวิธีหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ PCR เป็นต้น (Kaysner และ DePaola, 2004)

จากผลการย้อมสีแกรมและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแบคทีเรียทุกตัวอย่างมีลักษณะเป็นแท่ง โค้งเล็กน้อย ย้อมติดสีแดงซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative curved rod bacteria) (รูปที่ 1 D) และจากการตรวจทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ catalase test และ oxidase test พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เตรียมได้ 128 โคโลนีให้ผลบวกต่อการทดสอบดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่สุ่มมา 25% นั้นมีการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ทั้งหมด ซึ่งทำให้ทราบว่าตัวอย่างแบคทีเรียที่ได้นั้นสามารถสร้าง exotoxin บางชนิดที่สามารถทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (Zhang and Austin, 2004) ดังตารางที่ 1

เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมด 128 โคโลนี มาทดสอบคุณสมบัติการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือที่แตกต่างกันพบว่าที่ความเข้มข้น 0% ของ NaCl ไม่มีโคโลนีจากตัวอย่างใดเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการทดสอบที่ความเข้มข้น 2% และ 4% ของ NaCl พบว่าทุกตัวอย่างมีโคโลนีที่เจริญอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีซึ่งคิดเป็น 100% ขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่มีความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 6% พบว่าตัวอย่างที่มีโคโลนีเจริญอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี มีทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 31.25% และที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 8% พบว่าตัวอย่างที่มีโคโลนีเจริญอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี มีทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 4.69%



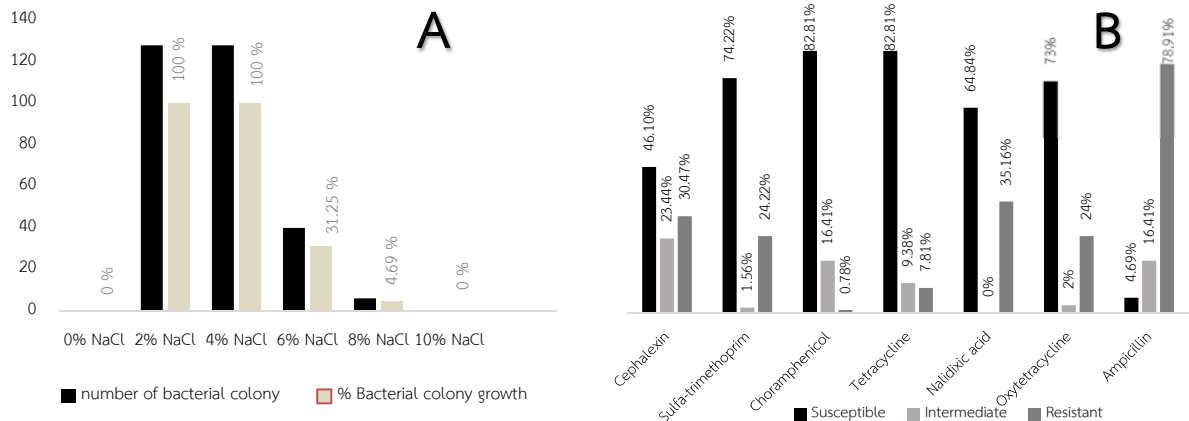
รูปที่ 1 ปลากระพงที่พบรอยโรคบริเวณผิวหนัง (A) และปลาที่ตายในบ่อเลี้ยง (B) โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญเติบโตบน TCBS agar (C) รูปร่างเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมสีแกรมเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า (D)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ catalase test oxidase test gram stain และ blood hemolysis test ของแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

Sample	สีโคโลนีบน TCBS agar		Gram stain		Catalase test		Oxidase test		Hemolysis test	
	Green	Yellow	+	-	+	-	+	-	+	-
128 bacterial colonies	46	82	0	128	128	0	128	0	32	0
Percent (%)	36%	64%	0	100%	100%	0	100%	0	100%	

ส่วนการทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 10% นั้นพบว่าไม่มีโคโลนีจากตัวอย่างใดเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 2 A) ดังนั้นจึงอาจยืนยันได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากระพงขาวเป็นแบคทีเรีย

ในสกุลวิบริโอเนื่องจากแบคทีเรียมีความต้องการ NaCl ในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะ *V. parahaemolyticus* ต้องการ NaCl ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-8% ในการเจริญเติบโต (Whitaker *et al.*, 2010)



รูปที่ 2 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อและเปอร์เซ็นต์ (%) เมื่อทดสอบด้วยการเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0% ถึง 10% (A) และผลทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากปลากะพงขาวโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (B)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความไวรับของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ต่อยาต้านจุลชีพ

Antimicrobial agent	Number of bacterial isolate	Result					
		Susceptible	%	Intermediate	%	Resistant	%
		(S)		(I)		(R)	
Cephalexin	128	59	46.1	30	23.44	39	30.47
Sulfa-trimethoprim	128	95	74.22	2	1.56	31	24.22
Chloramphenicol	128	106	82.81	21	16.41	1	0.78
Tetracycline	128	106	82.81	12	9.38	10	7.81
Oxytetracycline	128	94	73.44	3	2.34	31	24.22
Nalidixic	128	6	4.69	21	16.41	101	78.91
Ampicillin	128	6	4.69	21	16.41	101	78.91

หมายเหตุ: % คือ ร้อยละของจำนวนแบคทีเรียที่ตอบสนองต่อยาต้านจุลชีพเมื่อทดสอบด้วย disc diffusion test

จากผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 7 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion test พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 128 โคโลนี ให้ผลความไวรับ (susceptible) ต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ tetracycline เท่ากับ 82.81% chloramphenicol เท่ากับ 82.81% sulfamethoxazole-trimethoprim เท่ากับ 74.22% และ oxytetracycline เท่ากับ 73% ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากหอยแครง (สุดสายชล และธดาภรณ์,

2549) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียให้ผลทดสอบความไวรับในระดับที่ต่ำถึงปานกลาง (resistant) ต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 3 ชนิด คือ ampicillin เท่ากับ 78.91 % nalidixic เท่ากับ 35.16 % และ cephalexin เท่ากับ 30.47 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2 B) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Damir *et al.* (2013) และ Ottaviani *et al.* (2001) ที่สำรวจพบว่า *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio cholerae* ตามลำดับ นั้น ให้ผลความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทั้งสามชนิด

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียที่เก็บได้จากรอยโรคของปลากระพงขาวในฟาร์มที่อยู่ในเขตพื้นที่อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการนั้นเป็นแบคทีเรียในสกุล*Vibrio* ส่วนผลการทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 7 ชนิด โดยพบว่าแบคทีเรียให้ผลความไวรับ ต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ tetracycline, chloramphenicol, sulfamethoxazole-trimethoprim และ oxytetracycline ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรียให้ผลความไวรับในระดับต่ำถึงปานกลาง ต่อยาต้านจุลชีพทั้งหมด 3 ชนิด คือ ampicillin, nalidixic และ cephalixin ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากทางคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและดูแลโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร และขอขอบคุณ ผศ.น.สพ.ดร. สำราญ บรรณจิรกุล ในการให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะ ตลอดจนอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัย และต้องขอขอบคุณนักศึกษาสัตวแพทย์ทั้งสี่คน ได้แก่ นางสาวพิมพ์ชนก สิทธิวงศ์ไพบูลย์ นายเชษฐา บุญศิริ นางสาวสุปรีย์รัตน์ นุชบัว และนายปรีชญา สุภากรเดช ที่ช่วยเหลือในการร่วมดำเนินการวิจัยด้วยความตั้งใจ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2557 (สืบค้นข้อมูลเมื่อ 5 พฤษภาคม 2561). ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial agent). เข้าถึงได้จาก : www.fisheries.go.th/quality/ยาต้านจุลชีพ.pdf, 17 ตุลาคม 2559.

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559.

การสำรวจสถิติฟาร์มเลี้ยงปลาน้ำกร่อยในรอบปี 2557. สถิติฟาร์มเลี้ยงปลาน้ำกร่อยประจำปี 2557. 59(3): 7-17.

ชาญณรงค์ รอดคำ. 2550. โรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อกระเพาะอาหารและลำไส้ในปลาน้ำกร่อยในประเทศไทย. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชัน โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทาราแกรนด์ กรุงเทพฯ. 31 ตุลาคม – 2 พฤศจิกายน 2550. 319-326.

รสมา ภูสุนทรธรรม เกษกนก ศิริณฤมิตร นิภัตรา สอนไพรินทร์ สุกัญญา ผลิตกุล รุ่งโรจน์ โอสถานนท์ ญัฐวรรณ นิตติวัฒน์ชาญชัย ทศนีย์ เจริญทรง และสุชนา สุขกลัด. 2560. หลักการใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์เลี้ยง. บริษัท แอคทีฟ ฟรินท์ จำกัด. กรุงเทพฯ. 91 หน้า.

สุดสายชล หอมทอง และ ธดาภรณ์ วงศ์พัฒน์. 2549. ความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Vibrio* spp. จากหอยนางรมบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 8(1): 41-54.

Bullock, G.L. 1977. (cited 5 May 2018). Vibriosis in fish. Available from: <http://www.pdfsemanticscholar.org/d7be/ab8f40262caa97ee4292bafb4ae6945fcbf0.pdf>.

Cabello, F. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ. Microbiol. 8(7): 1137-1144.

- Centers for Disease Control and Prevention. 2014. (cited 5 May 2018). Isolation of *Vibrio cholerae* from fecal specimens. Available from: <http://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-4.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2016. (cited 15 December 2017). *Vibrio* Species Causing Vibriosis. Available from: <http://www.cdc.gov/vibrio/index.html>.
- Damir, K., Irena, V.S., Damir, V., and Emin, T. 2012. Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 75(1-2): 46-52.
- Hervet, C.J., Martin, N.H., Boor, K.J., Wiedmann, M. 2017. Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt. *J. Dairy Sci.* 100(2): 950-960.
- Kaysner, C.A. and DePaola, A. 2004. (cited 16 March 2018). Bacteriological Analytical Manual: Chapter 9 *Vibrio*. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm>.
- Kumaran, S., Deivasigamani, B., Alagappan, K.M. and Sakthivel, M. 2010. Infection and immunization trials of Asian seabass (*Lates calcarifer*) against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Environ. Biol.* 31(4): 539-541.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Canonico, C., Masini, L., Pianetti, A., Parlani, C., Luzzi, I., Caola, I., Paternoster, C., and Carraturo, A. 2011. Unusual case of necrotizing fasciitis caused by *Vibrio cholerae* O137. *J. Clin. Microbiol.* 49(2): 757-759.
- Sarter, S., Nguyen, H.N., Hung, L.T., Lazard, J. and Montet, D. 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control.* 18: 1391-1396.
- Whitaker, W.B., Parent, M.A., Naughton, L.M., Richards, G.P., Blumberman, S.L., & Boyd, E.F. 2010. Modulation of Responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and Temperature Stresses by Growth at Different Salt Concentrations. *Appl. Environ. Microbio.* 76(14): 4720-4729.
- Woodring, J., Srijan, A., Puripunyakom, P., Oransathid, W., Wongstitwilairoong, B. and Mason, C. 2012. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Vibrio*, *Salmonella*, and *Aeromonas* isolates from various uncooked seafoods in Thailand. *J. Food Prot.* 75(1): 41-47.
- Yong, W.S. and Seng, L.T. 1990. A comparative study of *Vibrio* infections in healthy and disease marine finfishes cultured in floating cages near Penang, Malaysia. *Asian Fish. Sci.* 3(30): 353-359.

Zhang, X.H. and Austin, B. 2005. Haemolysins
in *Vibrio* species. J. Appl. Microbiol.
98(5): 1011-1019.

