แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

Pathogenic Bacteria in Marine Aquarium

โดย

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม

โดย : รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์*

การตรวจหาชนิดของแบคทีเรีย ที่ทำให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยนำน้ำในตู้เลี้ยงที่พบว่าปลาหรือสัตว์น้ำเริ่มแสดงอาการป่วยมาตรวจ พร้อมทั้งตัดชิ้นส่วนอวัยวะภายในของปลาป่วยที่ตายมาแยกเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* รวมทั้งหมด 5 species *Pseudomonas* และ *Aeromonas* อย่างละ 1 species คือ *V. alginolyticus*, *V. anguillarumI* และ *II*, *V. harveyi*, *V. para haemolyticus*, *V. vulnificus*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Aeromonas salmo nicida*.

* สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ABSTRACT

Title : Pathogenic Bacteria in Marine Aquarium

By : Rattanaporn Srivibool*

Water and dead fishes in the Marine Science Institute aquarium, Burapha University were screened for bacteria which are causing fish or animal deseases. Five strains of *Vibrio* : *V. alginolyticus*, *V. anguillarum I* และ *II*, *V. harveyi*, *V.parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were found. One strain of *Aeromonas salmonicida* and one strain of *Pseudomonas fluorescens* were also detected.

*Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทนำ

ในสถานที่ที่จำกัดของสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม ปลาหรือสัตว์น้ำอื่น ๆ ต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แออัดและต่างไปจากสภาพธรรมชาติ อาการป่วยและการเกิดโรคจึงเกิดขึ้นได้ง่าย การตรวจหาแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดกับสัตว์น้ำในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม เพื่อการรักษาอย่างถูกต้อง เนื่องจากอาการของโรคที่คล้าย ๆกันนั้น อาจมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียต่างชนิดกัน(Bullock,1971) ดังนั้นจึงไม่มีการวินิจฉัยที่ถูกต้องหากปราศจากการตรวจหาชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ ซึ่งเป็นความจำเป็นอันดับแรกที่ต้องทำ เพื่อให้การควบคุมดูแลเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และโรคต่างชนิดกัน การควบคุมดูแลก็จะต่างกันไปด้วย

แบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อปลาหลายชนิดเป็นพวกไซโครฟิลิค (Psychrophillic) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียพวกไซโครฟิลิคหลายชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเจริญเติบโตที่ 10 องศาเซลเซียส และสามารถเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้หลายชนิดสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มในช่วงกว้าง บางชนิดมีการเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์และสามารถเพิ่มจำนวนได้ที่ความเค็มเกิน 7.0 เปอร์เซ็นต์ (ชลอ,2528)

เกือบทั้งหมดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปลาเป็นพวกต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria) หรือเจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic bacteria) มีน้อยมากที่เป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria) อย่างแท้จริง และบางชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปลา เป็นพวกที่ต้องการใช้อาหารพิเศษในการเพาะเชื้อ (fastidious) เนื่องจากไม่สามารถเจริญได้ในอาหารปกติ (ชลอ, 2528)

Bullock(1971) ได้รายงานว่าส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคหลาย ๆชนิดในปลามักเป็นแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคปลา เช่น *Aeromonas salmonicida,H. piscium,Flavobacterium* spp., *Pseudomonas fluorescens, A. liquafaciens,Vibrio anquillarum,V. piscium, V. parahaemolyticus, Chondrococcus columnaris,Cytophaga psychrophila* ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มักพบในปลาที่เป็นโรคได้แก่ *Corynebacterium sp, Mycobacterium*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

marinum, *N. fortuitum*, *N. platypoecilus*, *Nocardia asteroides*, *Streptococcus* spp. และ *Micrococcus* spp.

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคปลาสามารถทำได้โดยอาศัยขั้นตอนการทดสอบต่าง ๆ เช่น ลักษณะรูปร่างของเซล การติดสีแกรม และการทดสอบชีวเคมีต่าง ๆ นอกจากนั้นบางกรณีอาจต้องมีการตรวจสอบที่ละเอียดมากขึ้น อาจต้องใช้แอนติซีรัม (antiserum) เช่น กรณีการทำ slide agglutination test หรือ immunodiffusion test แบคทีเรียบางชนิดต้องการจำแนกถึงระดับชนิด (species) เพื่อการวินิจฉัยและการรักษาโรค แต่บางชนิดต้องการรู้เพียงสกุล (genus) เท่านั้น

สำหรับการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค(pathogenic bacteria) แก่ปลาและสัตว์น้ำอื่นๆในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อจะได้ทราบชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับน้ำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยโรคและการรักษา รวมทั้งการควบคุมรักษาคุณภาพน้ำในตู้เลี้ยง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆที่ใช้ในการวิจัยส่วนใหญ่เป็นอุปกรณ์และสารเคมีที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ซึ่งเป็นสถานที่ที่ใช้ดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ

1.<u>การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย</u>

เก็บตัวอย่างน้ำจากตู้ปลาในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็มจากตู้ที่น้ำเริ่มขุ่น หรือเริ่มมีปลาป่วยและตายโดยนำมาเพาะเชื้อบนอาหาร TCBS LM TSA Mueller-Hinton ที่เติม Thiamine pyrophosphate (TPP) 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Pseudomonas Agar โดยใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างน้ำมา inoculate ลงในจานอาหารแต่ละชนิดโดยทำทั้งหมด 2 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟเกลี่ยตัวอย่างน้ำให้ทั่วจานอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ25- 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.<u>การนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด</u> (Total count)

เก็บตัวอย่างน้ำจากตู้ปลา จากตู้ที่น้ำเริ่มขุ่นหรือเริ่มมีปลาป่วย หรือตายลงมาเพาะลงบนอาหาร ORI โดยเจือจางตัวอย่างน้ำลงจนถึงความเจือจางที่ 1/100 หรือ 1/1000 เท่าแล้วใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างน้ำมา inoculate ลงในจานอาหาร ORI ความเจือจางละ 2 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟเกลี่ยตัวอย่างน้ำให้ทั่วจานอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ขึ้นบนจานอาหารโดยใช้เครื่องนับโคโลนี แล้วนำจำนวนที่นับได้มาคำนวณกลับเพื่อหาจำนวนโคโลนีทั้งหมด

3.<u>การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์</u>

เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานอาหาร ORI TCBS LM TSA Mueller-Hinton ที่เติม TPP และ Pseudomonas Agar มาเลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยนำมาลาก(Streak) ลงบนอาหาร ORI หลาย ๆ ครั้งจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture) แล้วนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาเลี้ยงเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงเพื่อเป็น stock culture สำหรับนำไปทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีต่อไป

4.<u>การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียจากปลาที่ป่วยหรือตาย</u>

ทำความสะอาดบริเวณที่จะผ่าปลาใช้มีดผ่าตัด และกรรไกรที่สะอาดผ่า และตัดตามแนวด้านข้างตัวปลาโดยเริ่มจากส่วนท้องเรื่อยขึ้นไปทางส่วนหัว แล้วเปิดออกเพื่อตัดเอาชิ้นส่วนของหัวใจ ตับ และไตที่ผิดปกติมาตรวจหาแบคทีเรีย โดยฆ่าเชื้อผิวนอกของชิ้นส่วนอวัยวะก่อนใส่ในอาหารเหลว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ25- 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมา streak ลงบนอาหาร selective medium เช่นเดียวกับการตรวจหาแบคทีเรียจากนั้นแล้วแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ไว้ตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.<u>การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา</u>

นำแบคทีเรียทุก ๆ ไอโซเลต (isolate) ที่แยกได้จากอาหารวุ้นเอียงมาตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาต่อไปนี้

1. ย้อมสีแกรม (Gram's Method, Hucker's modification) เพื่อศึกษาขนาด ลักษณะรูปร่างของเซลล์ และการติดสีแกรม

2. ตรวจดูลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนจานอาหาร วัดขนาด สังเกตลักษณะของผิวหน้าของสี ความมัน ความโปร่งใส กลิ่น และความหนืดของโคโลนี

6.<u>การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี</u>

นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วจากอาหารวุ้นเอียงมา inoculate ลงในอาหารเหลว (broth) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมงแล้วจึงนำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วจากอาหารเหลวมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่าง ๆ ตามวิธีการของ Krieg และ Holt (1984) ยกเว้นการทดสอบ เอ็นไซม์ออกซิเดส และเอ็นไซม์ คาตาเลส ทดสอบจากอาหารวุ้นเอียง

คุณสมบัติทางชีวเคมีที่ทดสอบ เช่น การทดสอบเอ็นไซม์ออกซิเดส (oxidase) และคาตาเลส (catalase) เจลาติเนส (gelatinase) ยูเรียเลส (urease) อาร์จินีน ดีคาร์บอกซิเลส (Arginine decarboxylase) ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (Lysine decarboxylase) ไลซีนดีแอมมิเนส (Lysine deaminase) ออร์นีธีน ดีคาร์บอกซิเลส (Ornithine decarboxylase) การทดสอบเมธิล เรด (Methyl Red) การสร้างอะเซติล เมธิล คาร์บินอล (Acetyl metyl carbinol) การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) อินโดล (indole) การใช้ ซิเตรต (citrate) ไนเตรต (NO_3-N) การใช้น้ำตาล ดี-ไซโลส (D-xylose) แอล-อะราบิโนส (L-Arabinose) ดี-แมนโนส (D-Mannose) ดี-แกแลคโทส (D-Galactose) ซูโครส (Sucrose) ทรีฮาโลส (Trehalose) แลคโทส (Lactose) และแมนนิทอล (Mannitol) ทดสอบการเจริญใน NaCl ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อให้ทราบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Aerobic bacteria หรือ Facultative bacteria

7.<u>การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ</u> (Antimicrobial sensitivity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคแก่ปลาหรือสัตว์น้ำอื่น ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ได้มาทดสอบเพื่อหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพบางชนิด เช่น กรดนาลิดิซิก (Nalidixic acid) คานามัยซิน (Kanamycin) คลอเตตราไซคลีน (Chlotetracycline) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenical) ซัลฟาไดอาซีน (Sulfadiazine) เตตราไซคลีน (Tetracycline) เบซิตราซิน (Bacitracin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) อีรีโธรมัยซิน (erythromycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) และออกซี่เตตราไซคลีน (Oxytetracycline) โดยใช้สำลีพันปลายไม้ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ 8-12 ชั่วโมงจากอาหารเหลวกวาดลงบนอาหาร Mueller-Hinton ให้ทั่วจานใช้ปากคีบปลายแหลมเผาไฟคีบแผ่นทดสอบของยาแต่ละชนิดลงบนจานอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

8.<u>การทดสอบความไวต่อสาร 2,4-ไดอะมิโน-6,7-ไดไอโซโพรพิลเทอริดีน</u> (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate)

สำหรับแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* นอกจากการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีแล้วยังนำมาทดสอบความไวต่อสาร 2-4-ไดอะมิโน-6,7-ไดไอโซโพรพิลเทอริดีน (0/129) ซึ่งเป็นสาร vibriostat ในความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมและ 150 ไมโครกรัมต่อ 1 แผ่นทดสอบ (disc) โดย streak แล้วลงบนจานอาหาร Mueller-Hinton แล้ววางแผ่นทดสอบที่มี 0/129 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมและ 150 ไมโครกรัมตรงรอย streak นั้นเชื้อที่มีความไว (sensitive) ต่อ 0/129 จะไม่มีการเจริญที่ด้านข้างของแผ่นทดสอบ หลังจากที่นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแล้ว ส่วนเชื้อที่ต้านต่อยา (resistant)จะสังเกตเห็นการเจริญที่ด้านข้างแผ่นทดสอบตามปกติ

9.<u>การทดสอบการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน</u>

ทดสอบได้โดยใช้อาหารเหลวทริปโตน (Tryptone broth) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่ต้องการแล้ว inoculate เชื้อที่จะทดสอบลงไปโดยใช้เชื้อที่เตรียมใหม่จากอาหารเหลวที่เจริญได้ 3-6 ชั่วโมงโดย inoculate ในปริมาณ 25 ไมโครลิตรแล้วบ่มเชื้อไว้ 2 วันที่ 35 องศาเซลเซียส เชื้อที่สามารถเจริญได้จะสังเกตเห็นความขุ่นได้ชัดเจนต่างจากเชื้อที่ไม่สามารถเจริญ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการวิจัย

การศึกษาแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม ได้เริ่มศึกษาตั้งแต่เดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนสิงหาคม 2536 โดยศึกษาทั้งในน้ำตัวอย่างและจากปลาที่ตายและได้ผลดังต่อไปนี้

1. <u>การตรวจหาชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค</u>

การนำน้ำจากตู้เลี้ยงมาแยกเชื้อหาแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแก่ปลาหรือสัตว์น้ำอื่น ๆ พบแบคทีเรียที่ให้โทษได้ทุกตู้เลี้ยงที่มีปลาแสดงอาการป่วยหรือตายและแบคทีเรียที่ตรวจพบทุกชนิดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ยกเว้น *Aeromonas* เท่านั้นที่มีรูปร่างเกือบกลม (coccobacillus) แบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* พบได้ทุกตู้เลี้ยง ส่วนแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* และ *Aeromonas* พบเฉพาะตู้เลี้ยง E1 และ E7 เชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่ที่พบเป็น *V. vulnificus, V. anguillarum, V. parahaemolyticus, v. harvey*และ *V. alginolyticus* ส่วน *Vibrio* ที่พบได้บ่อย ๆและเป็นจำนวนมากแต่ยังไม่มีรายงานว่าเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำหรือทำให้เกิดโรคคือ *V. nigripulchritudo* ซึ่งสร้างให้โคโลนีสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดูตารางที่1)

ส่วนน้ำในบ่อกรองที่นำมาตรวจหาเชื้อ ก็พบว่ามีแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับที่ตรวจพบในตู้เลี้ยง และจากการนำตับ ไต และหัวใจของปลาที่ตายใหม่ๆจากตู้เลี้ยง E2, E4 และ G3 มาตรวจ โดยมีอาการจุดแดง ๆ(hemorrhage) ตามตัว อวัยวะภายในตกเลือด และบางตัวพบมีน้ำเลือดอยู่ในช่องท้อง พบว่ามี *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* อยู่ในอวัยวะเหล่านั้นด้วย ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่ตรวจพบจากน้ำในตู้เลี้ยงและบ่อกรอง

ปลาจากตู้เลี้ยง C3 และ F1 ซึ่งอาการก่อนตายคือมีแผลตามลำตัว และที่ครีบหาง เมื่อแยกเชื้อตรวจดูพบว่ามีเชื้อ *V.vulnificus* ปลาจากตู้เลี้ยง E7 ที่พบว่ามีแผลตามโคนครีบ เกล็ดถลอก ผอม และไม่กินอาหาร ผลการตรวจจากน้ำตัวอย่างพบว่ามีเชื้อ *Pseudomonas fluorescens ,Aeromonas salmonicida, V. anguillarumI และ V. vulnificus* ส่วนปลาที่มีอาการรังไข่ตกเลือด ตรวจพบเชื้อ *V. anguillarum I* ปลาจากตู้เลี้ยง G1 ซึ่งมีอาการเป็นแผลที่ลำตัว บางตัวมีอาการเกล็ดพอง ท้องบวม มีถุงน้ำใส ๆตามลำตัว และบางตัวพบว่าเป็นแผลจุดแดง ๆ (hemorrhage) ที่ลำตัว พบเชื้อ *V. alginolyticus, V. fluvialis I*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และ *V. parahaemolyticus* ส่วนปลาจากตู้เลี้ยง G3 มีอาการที่พบบ่อยๆ คือ หอบ (ปลาช่อนทะเล) เกล็ดถลอก และอาการจุดเลือดตามลำตัว พบว่าในน้ำมีเชื้อ *V. parahaemolyticus* อยู่เป็นปริมาณมาก แต่บางครั้งก็พบว่าปลาตายโดยไม่แสดงอาการใด ๆ เช่นปลาจากตู้เลี้ยง D1 E9,F2 และ G1ในบางครั้ง

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบจากน้ำในตู้เลี้ยงต่าง ๆ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนสิงหาคม 2536

ตู้เลี้ยง	ชนิดแบคทีเรีย	อาการปลาป่วย	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total count)cell/ml
C3	*V. vulnificus*	แผลตามตัว	-
D1	*V. harveyi, V. vulnificus* *A. salmonicida*	-	5,201
E1	*A. salmonicida, V. harveyi* *P. fluorescens,V.anguillarumI* *V. nigripulchritudo,V. vulnificus,* *V. parahaemolyticus-*	ตับช้ำ รังไข่ตกเลือด	1,523
E2	*V. nigripulchritudo,V. vulnificus,* *V. parahaemolyticus*	จุดเลือดที่ลำตัว หัว แก้ม ช้ำ	2,200
E4	*V. parahaemolyticus,V.anguillarum,* *V.nigripulchritudo,V. vulnificus*	หอบ แผลหลุมตามตัว หาง มุมปาก มีจุดเลือด	5,070
E5	*V. parahaemolyticus, V. vulnificus,* *V. nigripulchritudo*	เป็นแผล จุดแดงตามตัว	3,614
E7	*A.salmonicida,P.fluorescens,* *V. anguillarumI,V. vulnificus*	โดนครีบเป็นแผล เกล็ดถลอก ท้องมีลม รังไข่ตกเลือด	4,243
E8	*V. fluvialisII, V. vulnificus*	ปลาผอม ไม่กิน	44,250

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

	V. nigripulchritudo	อาหาร	
E9	*V. anguillarumII, V. harveyi,*	-	3,928
	v. nigripulchritudo, V. vulnificus		
F1	*V. nigripulchritudo, V. vulnificus*	แผลตามตัว หาง	
F2	*V. anguillarumII, V. vulnificus*	-	5,760
	V. parahaemolyticus, V. alginolyticus		
G1	*V. alginolyticus, V. fluvialisI*	แผลตามตัว เกล็ด	2,121
	V. parahaemolyticus	พอง ท้องบวม มี	
		ถุงน้ำใสๆตามตัว	
G3	*V. alginolyticus, V parahaemolyticus,*	หอบ เกล็ดกลอก	28,160
	V. alginolyticus, V. vulnificus	บางตัวมีแผลจุดแดง	

สำหรับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total count)ของน้ำในตู้เลี้ยงทุกตู้ที่นำมาตรวจ พบว่ามีปริมาณที่ค่อนข้างสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตู้เลี้ยง E8 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงถึง 44,250 เซล/1มิลลิลิตร หรือ 4.425×10^{6} เซล/100 มิลลิลิตร นับว่าเป็นปริมาณที่สูงมาก

2.<u>การทดสอบความไว(Sensitivity test)ต่อยาต้านจุลชีพ</u>

ผลจากการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพและยาซัลฟารวมทั้งหมด 10 ชนิด คือ กรดนาลิดิซิก คลอเตตราไซคลีน คลอแรมเฟนิคอล คานามัยซิน เตตราไซคลีน สเตรปโตมัยซิน อีรีโธรมัยซิน ออกซีเตตราไซคลีน แอมพิซิลลิน และซัลฟาไดอาซีน พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบทั้งหมดมีความไวต่อกรดนาลิดิซิกและคลอแรมเฟนิคอล (ตารางที่ 7) ส่วนกับยาต้านจุลชีพอื่น ๆเชื้อแบคทีเรียมีความไวปานกลางเป็นส่วนใหญ่ พบเฉพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus*และ *P. fluorescens* เท่านั้นที่ต้านต่อยาแอมพิซิลลิน โดยฤทธิ์ยาที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *V. alginolyticus, V. harveyi* และ *A. salmonicida* ให้ผลการทดสอบที่ค่อนข้างต้านต่อยา เตตราไซคลีน แอมพิซิลลิน และ ยาซัลฟาไดอาซีนตามลำดับ ส่วนเชื้อ *V. anguillarumII* และ *V. vulnificus* มีความไวต่อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ยกเว้นกับยาเตตราไซคลีนและยาออกซีเตตราไซคลีนที่ให้ผลการทดสอบค่อนข้างต้านทาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่แยกได้จากตู้เลี้ยง

Bacteria	Antibiotics (ug/disc)									
	SD 300	TE 30	E 15	AM 10	S 10	NA 30	C 30	T 30	K 30	A 30
V. alginolyticus	11	8	21	22	17	30	22	12	20	10
V. anguillarumII	17	10	15	14	17	20	30	10	16	10
V. harveyi	9	17	15	9	20	21	30	17	16	12
V. nigripulchritudo	10	17	22	20	22	24	24	10	18	17
V. parahaemolyticus	19	21	22	6	12	24	30	20	16	21
V. vulnificus	14	9	16	17	19	16	30	10	19	10
P. fluorescens	15	20	17	6	11	24	27	20	17	22
A. salmonicida	9	15	19	20	18	22	24	15	19	16

<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลขที่แสดงในตารางหมายถึง เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการยับยั้งของยาต้านจุลชีพจากแผ่นทดสอบ (antibiotic disc) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

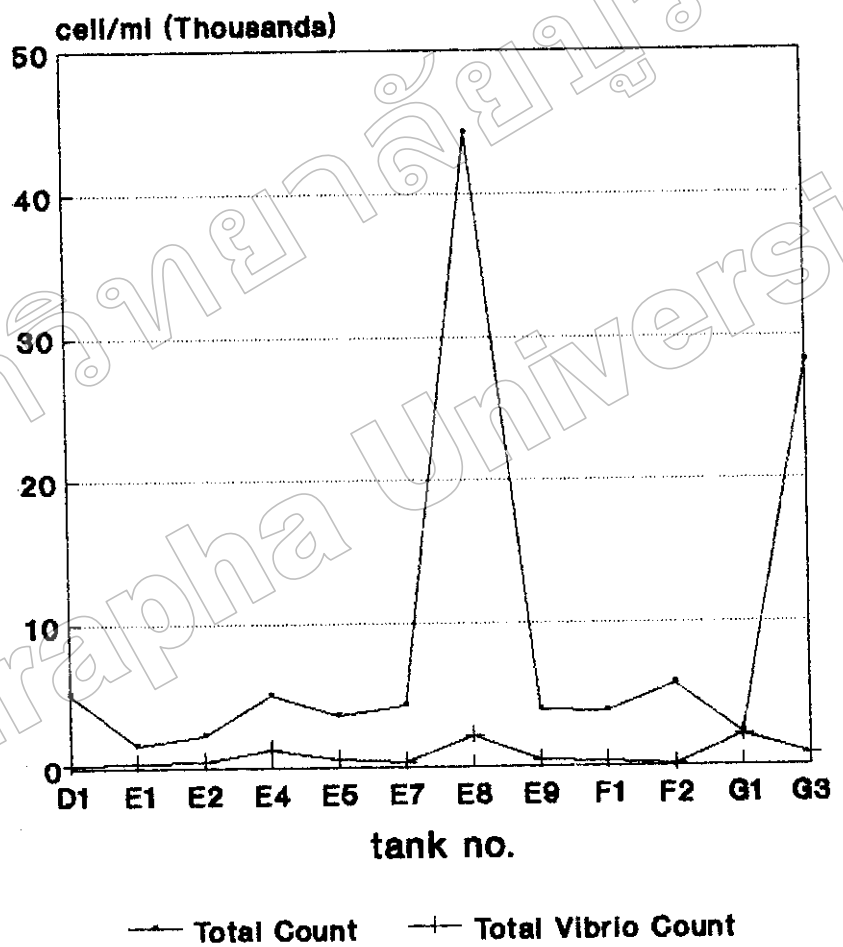
SD-Sulfadiazine Te-Tetracycline E -Erythromycin AM-Ampicillin

S -Streptomycin NA-Nalidixic acid C-Chloramphenicol T-Oxytetracycline

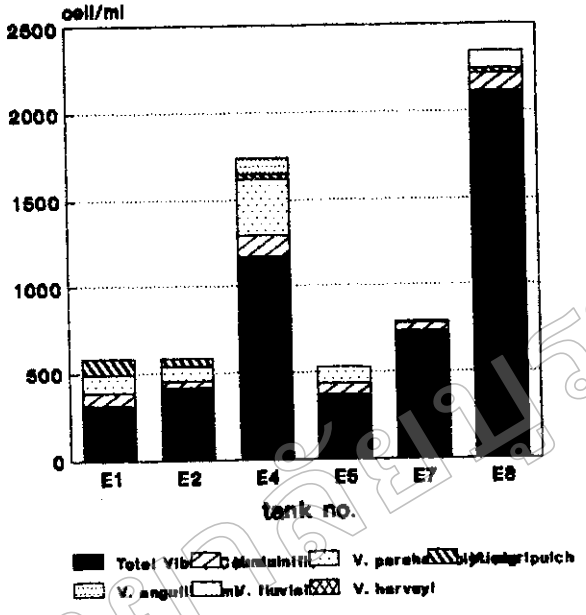
K-Kanamycin A-Chlortetracyclin

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

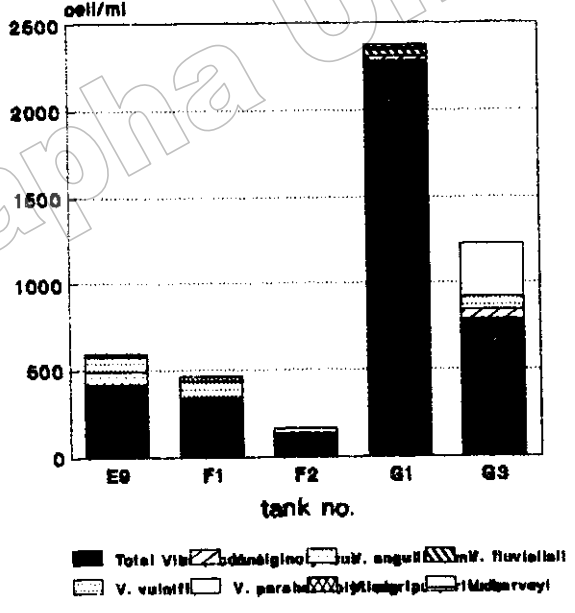
ภาพที่ 1 กราฟแสดงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด(total count bacteria) เปรียบเทียบกับจำนวน Vibrio ทั้งหมด (total vibrio count) ของน้ำในตู้เลี้ยงต่าง ๆ



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

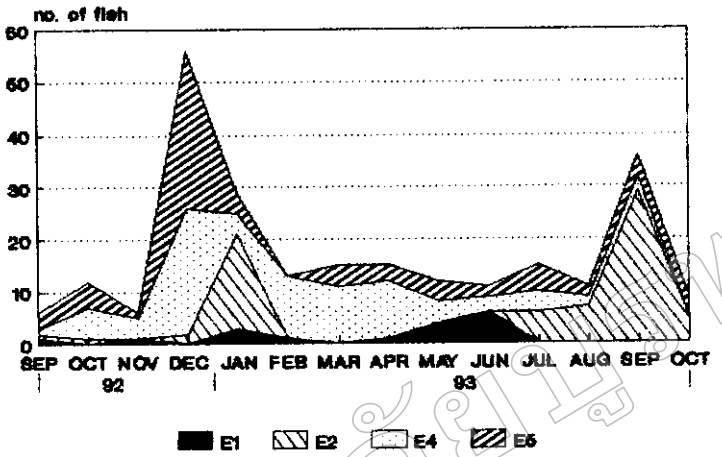


ภาพที่ 2 กราฟแสดงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรค เปรียบเทียบกับปริมาณ *Vibrio* ทั้งหมดในตู้เลี้ยง E1 E2 E4 E5 E7 และE8



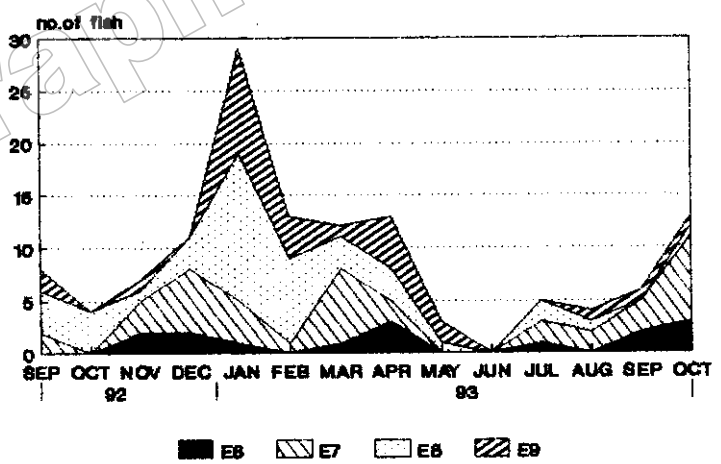
ภาพที่ 3 กราฟแสดงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรค เปรียบเทียบกับ ปริมาณ *Vibrio* ทั้งหมดในตู้เลี้ยง E9 F1 F2 G1 และ G3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

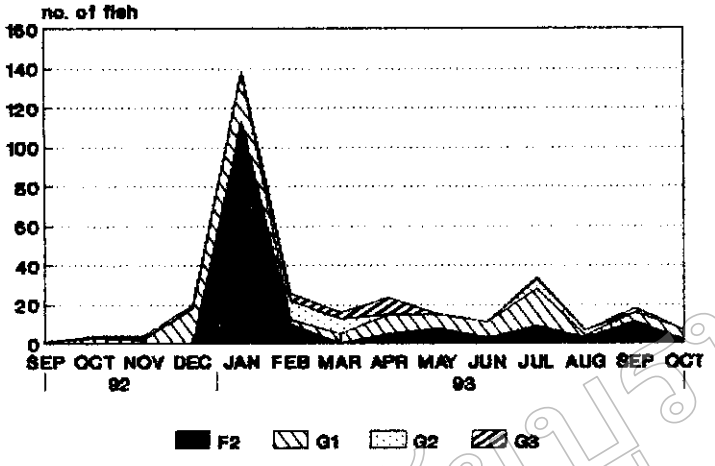


ภาพที่ 4 กราฟแสดงจำนวนปลาที่ตายในตู้เลี้ยง E1 E2 E4 และ E5 ตั้งแต่เดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนตุลาคม 2536

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 5 กราฟแสดงจำนวนปลาที่ตายในตู้เลี้ยง E6 E7 E8 และ E9 ตั้งแต่เดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนตุลาคม 2536



ภาพที่ 6 กราฟแสดงจำนวนปลาและสัตว์น้ำที่ตายในตู้เลี้ยง F2 G1 G2 และ G3 9ตั้งแต่เดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนตุลาคม 2536

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

589 9
ร377ป
ฉบ

วิจารณ์ผล

การตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคต่อปลาหรือสัตว์น้ำอื่น ๆในสถานเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม พบแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล และยังพบแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Aeromonas salmonicida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้จากปลาที่เป็นโรค (Bullock,1971) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. salmonicida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคฟูรังคูโรซิส(Furunculosis) ในกลุ่มปลาแซลมอน (Popoff,1984)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียว่าเป็นชนิดใด โดยอาศัยหลักการและวิธีการตาม Bergey's Manual of Systemic Bacteriology นั้น เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยสังเกตลักษณะของโคโลนีบนอาหาร TCBS และการทดสอบการเจริญใน NaCl ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในการใช้อาหารชนิดต่าง ๆ หรือความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์บางชนิดเป็นสิ่งที่ต้องทดสอบเพื่อความแน่ใจ ส่วนการทดสอบความไวของเชื้อต่อสาร 2,4- ไดอะมิโน 6,7- ไดไอโซโพรพิลเทอริดีน ฟอสเฟต (O/129) ที่มีความเข้มข้น 10 และ 150 ไมโครกรัม นั้น เป็นการทดสอบที่ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* และ *Aeromonas* ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่คล้ายกันออกจากกันได้ เนื่องจาก *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารนี้มากกว่า *Aeromonas* ความเข้มข้นของสารนี้ 10 -150 ไมโครกรัม ก็สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* ได้ แต่สำหรับ *Aeromonas* จะถูกยับยั้งด้วยสารนี้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 320 ไมโครกรัมขึ้นไป (Howard,1987)

โดยปกติแล้วนอกจากความไวต่อการติดเชื้อ(susceptibility)ของโฮสเอง และความรุนแรงของเชื้อ (pathogen virulence) ปัจจัยที่สำคัญที่จะเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาป่วยและเป็นโรคได้ก็คือปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิของน้ำที่ไม่เหมาะสม ปลาหรือสัตว์น้ำอยู่กันหนาแน่นมากเกินไป ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีน้อย ปริมาณแอมโมเนียและสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆในน้ำมีมากเกินไป ซึ่งแต่ละปัจจัยเหล่านี้อาจแปรผันตามกันหรืออาจแปรผันอย่างอิสระกับอีกสองปัจจัยที่เหลือก็ขึ้นอยู่กับอีกหลาย ๆสภาวะการณ์ที่เป็นอยู่ในขณะนั้น เช่น ถ้าประชากรปลากลุ่มหนึ่งมีความต้านทานต่อโรค

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ฟูรังคูโลซิส ไม่ว่าจะเนื่องจากมียีนส์ต้านทานหรือเพราะมีภูมิคุ้มกันอยู่แล้วก็ตาม การได้รับเชื้อที่มีความรุนแรงอย่าง *Aeromonas salmonicida* ก็อาจจะไม่ทำให้ปลาเกิดโรค อย่างไรก็ตาม โดยปลากลุ่มเดียวกันนี้อาจจะเกิดการติดเชื้อและเป็นโรคได้ถ้าเกิดความเครียด ซึ่งอาจจะมีสาเหตุเพียงแค่สิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม(Bullock,1971)

อย่างไรก็ดีผลจากการตรวจน้ำตัวอย่าง พบแบคทีเรียทั่วๆไปที่ไม่ทำให้เกิดโรคด้วยหลายชนิดและมีปริมาณมากโดยดูจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (total count) และปริมาณ *Vibrio*ทั้งหมด ถ้าคุณภาพน้ำด้านอื่นๆไม่ดีในขณะนั้นและมีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปะปนอยู่ด้วย จะเป็นภาวะที่ทำให้ปลาอ่อนแอและติดเชื้อง่าย และอาจติดเชื้อหลาย ๆชนิดจากแบคทีเรียที่เป็น Opportunistic pathogenด้วย จนยากที่จะวินิจฉัยเมื่อดูจากอาการที่เกิดขึ้น

และจากข้อมูลสถิติของจำนวนปลาที่ป่วยและตายในตู้เลี้ยงตั้งแต่ช่วงเดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนตุลาคม 2536 พบว่าจำนวนชนิดของปลาในตู้เลี้ยงที่มากขึ้น ไม่ได้มีส่วนทำให้ปลาป่วยและตายบ่อยครั้ง หรือจำนวนชนิดปลาในตู้เลี้ยงน้อย ก็ไม่ได้ทำให้ปลาป่วยหรือตายน้อยลง เพราะจากสถิติไม่ว่าปลาในตู้เลี้ยงจะมีมากชนิดหรือน้อยชนิดก็พบว่ามีการป่วยและตายบ่อยครั้งได้เช่นกัน (ดูตารางที่5 และภาพที่ 4-6) แต่ส่วนใหญ่แล้วพบว่าปลาป่วยและตายบ่อย ๆหลังจากที่นำปลาใหม่มาใส่ในตู้เลี้ยง บางครั้งมีการตายอย่างต่อเนื่องจนหมดหรือเกือบหมด เช่นตู้เลี้ยง E4, E5 ในเดือนธันวาคม 2535 และตู้เลี้ยง F2 ในเดือนมกราคม 2536 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ปลาใหม่มีการติดเชื้ออยู่ก่อนและทำให้ปลาที่มีอยู่เดิมติดเชื้อตามไปด้วยในกรณีนี้ อย่างไรก็ตามบ่อยครั้งที่พบว่าปลาอินเดียนแดงจากตู้เลี้ยง G1 ตายอย่างสม่ำเสมอโดยที่ไม่มีพยาธิสภาพจากการติดเชื้อใด ๆ จึงอาจเป็นไปได้ที่พิษจากดอกไม้ทะเลซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากมีผลร่วมด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สรุปและข้อเสนอแนะ

การนำน้ำและอวัยวะภายในของปลาป่วยที่ตายในตู้เลี้ยงมาตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ พบแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* 5 ชนิด *Pseudomonas* และ *Aeromonas* อย่างละ 1 ชนิดคือ *V. alginolyticus*, *V.anguillarumI* และ *II*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *P. fluorescens* และ *A. salmonicida* โดยแบคทีเรียที่พบบ่อยมากจากน้ำตัวอย่างคือ *V. vulnificus* รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และแบคทีเรียที่ตรวจพบทุก strain มีความไวต่อกรดนาลิดิซิก และคลอแรมเฟนิคอล

ปกติเชื้อ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในทะเลและบริเวณน้ำกร่อย โดยพบที่ผิวน้ำและภายในลำไส้ของสัตว์ทะเล และหลาย ๆชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคน และสัตว์ทะเลทั่วไปทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง(Baumann et al.,1984) จึงเป็นไปได้มากที่อาจมีแบคทีเรียเหล่านี้ติดมากับอาหาร เมื่อปลากินแบคทีเรียเข้าไปพร้อมกับอาหาร เชื้อแบคทีเรียก็จะไปอยู่ที่ลำไส้ และอาจมีความสามารถที่จะทำอันตรายโรคสได้ภายใต้สภาวะที่เกิดความเครียดจากปัจจัยต่าง ๆ หรืออาจเป็นไปได้ที่ปลาในตู้เลี้ยงได้สัมผัสกับแบคทีเรียที่ติดมากับน้ำในตู้เลี้ยงตลอดเวลา เชื้อแบคทีเรียจึงสามารถเข้าสู่ตัวปลาที่อ่อนแอจากบาดแผลตามลำตัว หรือไม่ปรสิตที่อาศัยภายนอกอาจมีส่วนทำให้เชื้อเข้าไปทางผิวหนังได้ หลังจากเชื้อเข้าไปเข้าไปในร่างกายแล้วก็จะแพร่กระจายตามกระแสเลือด และไปยังไต ตับ และอวัยวะอื่น ๆ แบคทีเรียอาจออกมาปะปนกับอุจจาระลงไปในน้ำ และปลาที่ตายก็จะเป็นแหล่งถ่ายทอดเชื้อไปสู่ปลาตัวอื่น ๆได้

ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะป้องกันไม่ให้ปลาในตู้เลี้ยงติดเชื้อจากอาหารที่เลี้ยงหรือจากน้ำที่นำมาเปลี่ยน การแก้ไขการติดเชื้อที่ติดมากับมากับอาหาร เศษปลา หรืออวัยวะภายในของปลาที่มีแบคทีเรีย อาจจะต้องใช้วิธีฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนที่จะนำมาเลี้ยง และก่อนที่จะนำน้ำมาเปลี่ยนก็ควรจะมีการฆ่าเชื้อน้ำนั้นด้วยวิธีง่ายๆก่อน นอกจากนั้นปลาใหม่ที่นำมาปล่อยลงตู้เลี้ยงต้องแน่ใจว่าไม่ติดเชื้อใด ๆอยู่ก่อนหน้านั้น บางทีการฆ่าเชื้อแต่เพียงผิวนอกของตัวปลาอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากอาจมีแบคทีเรียที่เป็นอันตรายอยู่ภายในตัวหรือในลำไส้ อาจต้องใช้วิธีป้อนยาควบคู่ไปด้วย นอกจากนี้คุณภาพน้ำที่ดีก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพในการแก้ปัญหาการติดเชื้อ เป็นวิธีที่มีผลทำให้แบคทีเรียมีการดื้อยา และจะเป็นสิ่งตกค้างในสิ่งแวดล้อมในที่สุด ดังนั้นการควบคุมคุณภาพน้ำด้านอื่น ๆจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ การศึกษาปริมาณและความสมดุลของแบคทีเรียในถังกรองที่จะช่วยลดปริมาณของเสียในตู้เลี้ยงจึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ชลอ ลิ้มสุวรรณ 2528. โรคปลา (Fish Disease) เอกสารประกอบการสอนวิชาชีววิทยาประมง 444 คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 226 น.

Baross, J. and J. Liston.1970. Occurence of *V. parahaemolyticus* and related hemolytic *Vibrio* in marine environments of Washington State: Appl. Microbiol. 20:179-186.

Bauer, A. W., W. M. M.Kirby, J.C. Sherris and M. Turck.1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. The The Amer. J. of Clin.Path. 45:493-496.

Baumann, P., A. L. Furniss and J. V. Lee.1984. Genus **Vibrio** *Pacini 1854, 411*^{AL},pp.518-545 *In* N.R. Krieg and J. G. Holt(eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1. The Willium and Wilkins Co., Baltimore.

Bullock, G. L.1971.The identification of fish pathogenic bacteria. Book2B The Disease of fishes. Jersey City, N.J.,T.F.H.Pub.,Inc.

Bullock, G. L. and S. F. Snieszko.1969. Bacteria in the blood and kidney of apparently healthy hatchery trout. Amer. Fish Soc.,Trans.98:268-271

Howard J. Barbara.1987. Clinical and Pathogenic Microbiology The C.V.Mosby Company Missouri 625 p.

Krieg, N.R.and J.G. Holt.1984. Bergey's Manual of Systematic

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Bacteriology Vol.1.,The Williums and Wilkins Co., Baltimore. 964 p.

Lane, A.L.1984. Difco Manual Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology.10th Ed., Difco Laboratories, Detroit.,Michigan. 1155 p.

Munro, A.L.S.1982. The pathenogensis of bacterial diseases of fishes,pp. 131-134. *In* R.J. Roberts(ed.) Microbial Diseases of Fish. Academic Press,London.

Palleroni,N.J.1984. Genus **Pseudomonas** *Migula 1894,237*[AL], pp.141-199. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt(eds.)Bergey's Manual of Bacteriology Vol.1,The Williums and Wilkins Co.,Baltimore.

Popoff, M.1984. Genus **Aeromonas** *Kluyver and van Niel.1936,398*[AL], pp. 545-548. *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1, The Williums and Wilkins Co., Baltimore.

Sands, D. C. and A.D. Rovira.1970. Isolation of fluorescent pseudomonads with a selective medium. Appl. Microbiol.20:513-514

Stanier,R,Y.,N.J.Palleroni and M. Doudoroff.1966.The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J.Gen.Microbiol.43:159-271.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 ตารางแสดงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ตรวจพบจากตู้เลี้ยงที่มีปลาป่วยและตายบ่อย ๆ

Bacteria	จำนวนแบคทีเรีย (เซล/1 มิลลิลิตร)										
	E1	E2	E4	E5	E7	E8	E9	F1	F2	G1	G3
V. alginolyticus									*15*	*25*	*58*
V. anguillarum I			94		8						
V. anguillarum II							69		21		
V. fluvialis						103				39	
V. harveyi	7						12		3		
V.nigripulchritudo	86	45	24			30	11	29		14	
V.parahaemolyticus	102	81	328	93					2	16	300
V. vulnificus	77	38	120	66	53		82	93			75
P. fluorescens	5		6		3						
A. salmonicida	8				5						

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ตรวจพบจากน้ำในตู้เลี้ยง C, D, E, F และ G

Characteristics	C3-1	D1-1	D1-2	E1-1	E1-2	E1-3	E1-4	E1-5	E1-6	E1-7	E2-1	E2-2	E2-3	E4-1	E4-2	E4-3	E4-4	E5-1	E5-2	E7-1	E7-2	E7-3	E7-4	E8-2	E8-3	E8-4	E9-1	E9-2	E9-4	F1-1	F1-2	F2-1	F2-2	F2-3	F2-4	G1-1	G1-2	G3-1	G3-2	G3-3
Blue-black pigment	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole							+	+									+				+	+																		
Reduction of No_3^- _ No_2^-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+		+		+		-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+		-	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+		+	d		d	+	+	+	d	+	+	+	d		+	+				+	+	d	d	+	+	+	+	d		d	+	+	+	+	+	d	+
Growth at: 4° C	-	-	-	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35° C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41° C							+										+					+																	
Ornithine decarboxyllase						+			+			+	+	+		+		+			+	+				+	+	+		+	+		+	+	+		+		+	
Lysine decarboxylase							+	+													+	+											+				+		+	
Arginine decarboxylase								+													+																			
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Urease								-								-					-																			
Utilization of:																																								
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Characteristics	C3-1	D1-1	D1-2	E1-1	E1-2	E1-3	E1-4	E1-5	E1-6	E1-7	E2-1	E2-2	E2-3	E4-1	E4-2	E4-3	E4-4	E5-1	E5-2	E7-1	E7-2	E7-3	E7-4	E8-2	E8-3	E8-4	E9-1	E9-2	E9-4	F1-1	F1-2	F2-1	F2-2	F2-3	F2-4	G1-1	G1-2	G3-1	G3-2	G3-3
D-Mannose	-					+			+	-		+	+	+	-	+		+	-				-	-				-			+		d	-	+	+	-	+	d	-
D-Galactose	+						+	+		+					+				+		+	+	+	+				+				-		+			d			+
D-Fructose	+	+	+	+	+		+	-		+	+				+		+		+	+	-	+	+	+			+	+	+	+				+						+
Maltose							+																																	
Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	d	d	+	-	-	d	-	d	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	d	+	d	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		+	+	+		+		+
Inhibition by 0/129																																								
10 ug	S	d	S	S	d			R	R	S	S		R	R	S		S	R	S	S	R		S	S	R		d	S	S	S		S	R	S	R	R	R	R	R	S
150 Ug	S	S	S	S	S			R	S	S	S		S	S	S		S	S	S	S	R		S	S	S		S	S	S	S		R	S	S	S	S	S	S	S	S
Growth in % NaCl																																								
0	-	-	-	d	-				-	-	-		-	-	-		d	-	-	d			-	-	-		-	-	d	-		d	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+				+	+	+		+	+	+		+	+	+	+			+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	d	+				+	+	+		+	+	+		d	+	+	d			+	+	d	+	+	+	d	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	d	-	-	d				+	-	-		-	-	-		-	+	-	-			-	-			d		-	-		-	+	-	+	-	+	-	+	-
10	-	-	-	-	-				-	-	-		-	-	-		-	-	-	-			-	-			-		-	-		-	+	-	-	-	+	-	+	-

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนปลาและสัตว์น้ำที่ตายในตู้เลี้ยงต่างๆ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2535 ถึงเดือนตุลาคม 2536

	2535									2536				
	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	ม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.
E1	1	0	1	0	3	1	0	1	4	6	0	0	0	0
E2	1	1	0	2	18	0	0	0	0	0	6	7	29	5
E4	1	6	4	24	4	12	11	11	4	3	4	2	3	0
E5	3	5	1	30	4	0	4	3	4	2	5	2	4	4
E6	0	0	2	2	1	0	1	3	0	0	1	0	2	3
E7	2	0	3	6	4	1	7	2	0	0	2	2	3	8
E8	4	4	1	3	14	8	3	3	1	0	2	1	0	1
E9	2	0	1	0	10	4	1	5	2	0	0	1	1	1
F2	0	0	0	0	113	10	0	5	8	3	9	3	11	2
G1	1	3	2	18	25	2	5	10	7	8	19	1	5	5
G2	0	0	1	0	1	10	8	0	0	0	5	3	0	0
G3	0	1	1	2	0	4	3	9	0	0	1	0	2	0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University