

บทที่ 4

ผลการทดลอง

เต่าตนุที่มีแผลเปื่อยบริเวณผิวหนังภายนอกทั่วไปตามร่างกายเช่น บริเวณคอโดยรอบ ขา ทั้งคู่หน้าและหลัง ดังแสดงในภาพที่ 4-1 ถูกนำมาวินิจฉัยการเกิดความผิดปกติโดยคาดว่า แบคทีเรียน่าจะมีสาเหตุมาของบาดแผลเหล่านี้ โดยทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิดของแบคทีเรียก่อโรคแผลเปื่อย ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลงในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ศึกษาโอกาสก่อโรคของแบคทีเรีย รวมทั้งศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ และการรักษาโรคแผลเปื่อยโดยใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4-1 แผลที่คอกและขาคู่หน้า (ซ้าย) และแผลที่โคนและแพนขาคู่หลัง (ขวา)

1. การแยกเชื้อและจำแนกชนิดแบคทีเรียก่อโรคแผลเปื่อยจากบาดแผลของเต่าตนุ

นำเต่าตนุที่มีอาการป่วยมาเช็ดเชื้อแบคทีเรียจากบาดแผลตามผิวหนัง และส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยวิธีปราศจากเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar), MacConkey และ TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt) ที่มีเกลือ 2% จากการแยกเชื้อพบแบคทีเรียทั้งหมด 4 ชนิดโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะโคโลนี (Colony Morphology) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียจากเต่าตนุที่มีแผลเปื่อยโดยทำการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชีวเคมีพื้นฐานเช่น ทดสอบ Cytochrome Oxidase, Motility, MR, VP, Indole และ Catalase ร่วมกับชุดทดสอบ API 20E (บริษัท Biomerieux) และยืนยันชนิดแบคทีเรีย

ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร จากผลการทดสอบแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดคือ

1.1 *Bacillus sphaericus* คุณสมบัติเบื้องต้นคือ เจริญบนอาหารทั่วไป TSA (Tryptic Soy Agar) ที่มีเกลือ 2% ได้ดี โคลนนิ่งขึ้น สีครีม ขอบโคโลนีเป็นรอยหยัก ไม่เจริญบนอาหาร MacConkey และอาหารพิเศษ TCBS รูปร่างเซลล์แบบท่อน ติดสีน้ำเงิน จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 4-1

1.2 *Vibrio fluvialis* คุณสมบัติเบื้องต้นคือ เจริญบนอาหารทั่วไป TSA ที่มีเกลือ 2% ได้ดี โคลนนิ่งขึ้น สีครีม ขอบโคโลนีเรียบ เจริญบนอาหาร MacConkey ได้ และเจริญบนอาหารพิเศษ TCBS ได้โคโลนีสีเหลือง รูปร่างเซลล์แบบท่อนโค้ง ติดสีแดง จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 4-2

1.3 *Acinetobacter junii* คุณสมบัติเบื้องต้นคือ เจริญบนอาหารทั่วไป TSA ที่มีเกลือ 2% ได้ดี โคลนนิ่งขึ้น สีครีม ขอบโคโลนีเรียบ เจริญบนอาหาร MacConkey ได้ และไม่เจริญบนอาหารพิเศษ TCBS รูปร่างเซลล์แบบท่อนโค้ง ย้อมสีแกรมติดสีแดง จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 4-3

1.4 *Vibrio alginolyticus* คุณสมบัติเบื้องต้นคือ เจริญบนอาหารทั่วไป ที่มีเกลือ 2% ได้ดี โคลนนิ่งขึ้น สีครีม ขอบโคโลนีเรียบ เจริญบนอาหาร MacConkey ได้ และเจริญบนอาหารพิเศษ TCBS ได้โคโลนีสีเหลือง รูปร่างเซลล์แบบท่อนโค้ง ย้อมสีแกรมติดสีแดง จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus sphaericus*

Lab No. GP 1358/49 NIH 13-49-21540

รายการที่ทดสอบ		ผลการทดสอบ Nf 712/49
Gram Strain		Positive
Hemolysis		γ
Anaerobic Growth		+
Catalase		+
Oxidase		+
Motility		+
Citrate		+
Urease		+ ^w
Nitrate		-
Esculin		-
VP		-
Gelatinase		-
Egg Yolk		-
BASE:ASS	Glucose/Gas	+
	Mannitol	-
	D-Xylose	-
	L-Arabinose	-
	Trehalose	-
	MU(Starch Hydrolysis)	-
Arginine		NO

หมายเหตุ : ASS= Ammonium Salt Sugar Base, W= Weak Reaction

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Vibrio fluvialis*

Lab No.V.157/49 NIH 13-49-21541

รายการที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ V.157/49
Oxidase	+
TSI	A/A
H ₂ S	-
GAS	
Indole	+
Motility	+
VP + 1% NaCl	-
Mannital + 1% NaCl	+
Inositol + 1% NaCl	-
Mannose + 1% NaCl	+
Arabinose + 1% NaCl	+
Salicin	-
Cellobiose	-
Esculin	-
Xylose	-
Malonate	-
Fructose	+
Acetate	+
Nitrate	+
Sorbitol	-
Dextrose	+
Sucrose	+
Lactose	-
NB + 0% NaCl	-
NB + 1% NaCl	+

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Vibrio fluvialis* (ต่อ)

Lab No.V.157/49 NIH 13-49-21541

รายการที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ V.157/49
NB + 3% NaCl	+
NB + 8% NaCl	+
Lysine + 1% NaCl	-
Ornithine + 1% NaCl	-
Arginine + 1% NaCl	+
ONPG	-
Polymyxin B	S
O129 (150µg)	S
Gram's Stain	Negative, Curve Rod

หมายเหตุ : A= Acid, S= sensitivity

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Acinetobacter junii*

Lab No.Nf 712/49 NIH 13-49-2542

รายการที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ Nf 712/49
Gram Strain	Negative
TSI	K/N
Oxidase	-
3% KOH	+
Motility	-
Indole	-
Citrate	-
Urease	-
Nitrate	-
N ₂ Gas	-

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Acinetobacter junii* (ต่อ)

Lab No.Nf 712/49 NIH 13-49-2542

รายการที่ทดสอบ		ผลการทดสอบ Nf 712/49
Esculin		-
41° C (Growth)		+
42° C (Growth)		-
44° C (Growth)		-
Malonate		-
Acetate		+
Gelatinase		-
BASE:OF	Glucose/Gas	-
	Lactose	-
	Maltose	-
	Mannitol	-
	D-Xylose	-
	Sucrose	-
	Adonitol	-
	Fructose	-
	Lysine	-
Arginine		-
Ornithine		-

หมายเหตุ : OF= OF Basal Medium , K= Alkaline , N= ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *Vibrio alginolyticus*

Lab No.V.153/49 NIH 13-49-21545

รายการที่ทดสอบ		ผลการทดสอบ V.159/49
Oxidase		+
TSI		A/A
VP+ 1% NaCl		+
LIM	LDC	+
	Indole	+
	Motile	+
HIB + 1% NaCl		+
Mannital		÷
Inositol		-
Mannose		+
Arabinose		-
Urea		-
Citrate		-
Salicin		-
Cellobinose		-
Esculin		-
Dextrose Acid	Acid	+
	Gas	-
Sucrose		+
Lactose		-
Nitrate		÷
ONPG		-
NB + 0% NaCl		-
NB + 1% NaCl		+
NB + 3% NaCl		+

2. การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เรียด้อยปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเค็มที่ระดับต่างๆ

2.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เรียด้อยความเป็นกรด-ด่าง

ผลการทดลองการเจริญเติบโต ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *B. sphaericus*, *V. fluvialis*, *A. junii* และ *V. alginolyticus* ที่มีต่อความเป็นกรดด่าง ในระดับที่แตกต่างกัน คือ pH 4, 5, 6, 8 และ 9 โดยเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตที่ถือว่าเหมาะสมของแบคทีเรียโดยทั่วไปคือที่ pH เป็นกลางเท่ากับ 7 และ วัดค่าความขุ่น ณ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30 และ 42 ชั่วโมง จากผลการทดลองการวัดความขุ่นของการเจริญเติบโตพบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดจะมีการเจริญเติบโตได้ดีใน pH 7 ตามเวลาที่เพิ่มขึ้นภายใน 42 ชั่วโมง

การทนต่อความเป็นกรด แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมีแนวโน้มไม่ชอบและไม่ทนต่อความเป็นกรด โดย 3 ชนิดคือ *B. sphaericus*, *V. fluvialis* และ *A. junii* เจริญเติบโตช้า ที่ pH 6 มีค่าความขุ่น 1.1402, 0.9039 และ 1.335 ณ 42 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-5, 4-6 และ 4-7) และไม่เจริญเลยที่ pH 4 และ 5 ส่วน *V. alginolyticus* สามารถเจริญเติบโตทนต่อความเป็นกรดที่ pH 5 และ 6 แต่ไม่ทนต่อความเป็นกรดที่ pH 4 (ตารางที่ 4-8)

การทนต่อความเป็นด่างแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด สามารถทนต่อความเป็นด่างคือช่วง pH 8-9 และสามารถเจริญเติบโตได้ดีมาตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป โดยเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus* จะเจริญเติบโตได้ดีใน pH 8 และ 9 มีค่าความขุ่นที่วัดได้เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจาก pH 7 และค่าความขุ่นสูงสุด ณ 42 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-3) ส่วนเชื้อที่เหลือทั้งสามชนิดคือ *V. fluvialis*, *A. junii* และ *V. alginolyticus* พบว่าเจริญได้ทั้ง pH 8 และ 9 สามารถเจริญเติบโตได้ดีมาตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไปและมีค่าความขุ่นสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 1.9300 (ตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-4) 2.0030 (ตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-5) และ 2.0225 (ตารางที่ 4-8 และภาพที่ 4-6) ตามลำดับ จากนั้นความขุ่นจะเริ่มลดลง

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Three Way ANOVA โดยทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เรียด้อยความเป็นกรด-ด่าง ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดพบว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีผลมาจาก pH จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (OD) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวก ข) ดังนั้นความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง (OD) จะขึ้นอยู่กับ เวลา และชนิดของเชื้อที่ทำการศึกษา

2.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่ออุณหภูมิ

ผลการทดลองการเจริญเติบโต ณ เวลาต่าง ๆ ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30 และ 42 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *B. sphaericus*, *V. fluvialis*, *A. junii* และ *V. alginolyticus* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับที่แตกต่างกัน คือ 4, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *B. sphaericus* และ *V. alginolyticus* สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูง 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะ *V. alginolyticus* เจริญในอาหารให้ค่าความขุ่นสูงใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 4-12 และตารางที่ 4-9 ส่วน *V. fluvialis* และ *A. junii* ทนได้น้อยต่ออุณหภูมิที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เพราะค่าความขุ่นต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แม้เมื่อเวลาผ่านไป 42 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4-10 และ ตารางที่ 4-11

การทนต่ออุณหภูมิที่ต่ำ 4 องศาเซลเซียสพบว่า *B. sphaericus* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเวลาผ่านไป 42 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4-9 และภาพที่ 4-7 สำหรับ *V. fluvialis* สามารถทนและเจริญได้ดีมีค่าความขุ่นปกติเหมือนกับที่เจริญที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรียอีก 2 ชนิดสามารถเจริญเติบโตได้แต่ช้า และให้ค่าความขุ่นต่ำกว่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใน 42 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4-10 และภาพที่ 4-8, ตารางที่ 4-11 และภาพที่ 4-9 และ ตารางที่ 4-12 และภาพที่ 4-10

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Three Way ANOVA โดยทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่ออุณหภูมิ ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดพบว่า การเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีผลมาจากอุณหภูมิ จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (OD) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวก ข) ดังนั้นความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง (OD) จะขึ้นอยู่กับเวลา และ ชนิดของเชื้อที่ทำการศึกษา

2.3 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อความเค็ม

ผลการทดลองการเจริญเติบโต ณ เวลาต่าง ๆ ที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30 และ 42 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *B. sphaericus*, *V. fluvialis*, *A. junii* และ *V. alginolyticus* ที่มีผลต่อความเค็มในระดับที่แตกต่างกัน คือ ใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10% จากผลการทดลองแบคทีเรียทนต่อความเค็มในเกลือระดับสูงพบว่า *B. sphaericus* เจริญได้ดีในเกลือ 2 และ 4 % ดังตารางที่ 4-13 และภาพที่ 4-11 สำหรับ *V. fluvialis* และ *A. junii* เจริญได้ดีในเกลือ 2, 4 และ 6 % ดังตารางที่ 4-14 และภาพที่ 4-12 และ ตารางที่ 4-15 และภาพที่ 4-13 ส่วน *V. alginolyticus* เจริญได้ดีในเกลือ 2, 4, 6 และ 8 % ดังตารางที่ 4-16 และภาพที่ 4-14 สำหรับการทนและเจริญในเกลือที่ 10% แบคทีเรียทั้ง *V. fluvialis* และ *A. junii* ไม่สามารถเจริญได้ภายใน 42

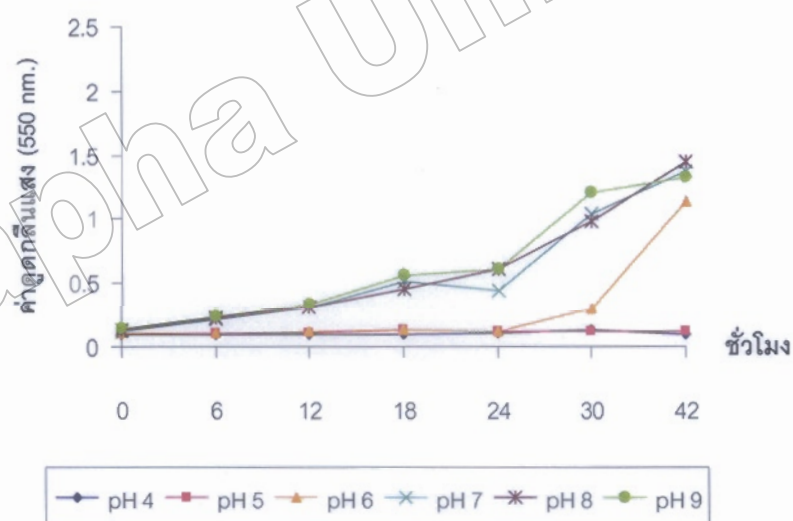
ชั่วโมง แต่ *V. alginolyticus* เจริญได้ค่อนข้างช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเกลือที่ต่ำกว่า และ *B. sphaericus* เจริญช้าให้ค่าความขุ่นสูงเล็กน้อยที่ 42 ชั่วโมง

แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดอาศัยอยู่ในทะเล การทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ความเค็มน้อยลงได้ถูกทดสอบว่ามีการเจริญเติบโตในเกลือ 0.5% ได้หรือไม่ ผลการทดลองมีดังนี้คือ *B. sphaericus* และ *V. alginolyticus* สามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ค่าความขุ่นได้เหมือนเจริญในเกลือช่วง 2-4% ตลอด 42 ชั่วโมง แต่ *V. fluvialis* และ *A. junii* เจริญในเกลือ 0.5% ให้ค่าความขุ่นปานกลางที่ 6 ชั่วโมง และหยุดการเจริญเติบโตเมื่อเวลาผ่านไปถึง 42 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Three Way ANOVA โดยทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อความเค็ม ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดพบว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีผลมาจากความเค็ม จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสง (OD) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวก ข) ดังนั้นความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง (OD) จะขึ้นอยู่กับเวลา และชนิดของเชื้อที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 4-5 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีต่อ
ความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ

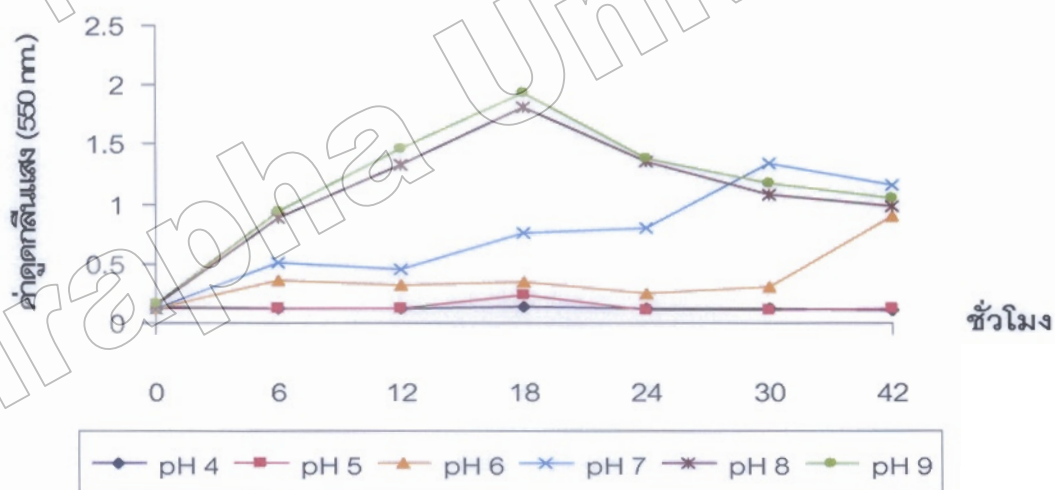
pH	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
pH 4	0.0963	0.0974	0.0978	0.1011	0.1107	0.1293	0.0926
pH 5	0.104	0.1063	0.1077	0.1301	0.1182	0.1189	0.1213
pH 6	0.1071	0.1127	0.1157	0.1258	0.1205	0.299	1.1402
pH 7	0.1142	0.2199	0.3128	0.5177	0.4378	1.0406	1.3748
pH 8	0.1263	0.2271	0.3159	0.4517	0.6086	0.9788	1.4523
pH 9	0.1379	0.2417	0.3298	0.5657	0.6117	1.2096	1.3297



ภาพที่ 4-3 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus*
ที่มีต่อความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-6 การเจริญเติบโตที่เวลาต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio fluvialis* ที่มีต่อความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่างๆ

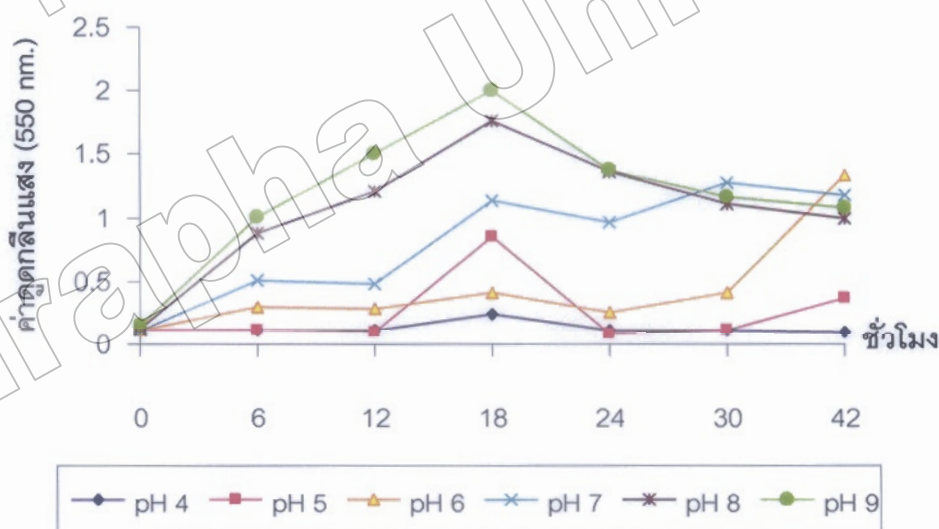
pH	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
pH 4	0.1315	0.1203	0.1249	0.1387	0.1185	0.127	0.1134
pH 5	0.1293	0.1244	0.1261	0.2344	0.1094	0.1057	0.1298
pH 6	0.1257	0.3538	0.3223	0.3503	0.2549	0.2988	0.9039
pH 7	0.1288	0.511	0.4612	0.7638	0.8017	1.3383	1.1591
pH 8	0.1489	0.8783	1.3214	1.8114	1.3539	1.0789	0.9738
pH 9	0.1605	0.9386	1.4593	1.93	1.3776	1.175	1.0535



ภาพที่ 4-4 การเจริญเติบโตที่เวลาต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. fluvialis* ที่มีต่อความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่างๆ

ตารางที่ 4-7 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *A. junii* ที่มีต่อ
ความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ

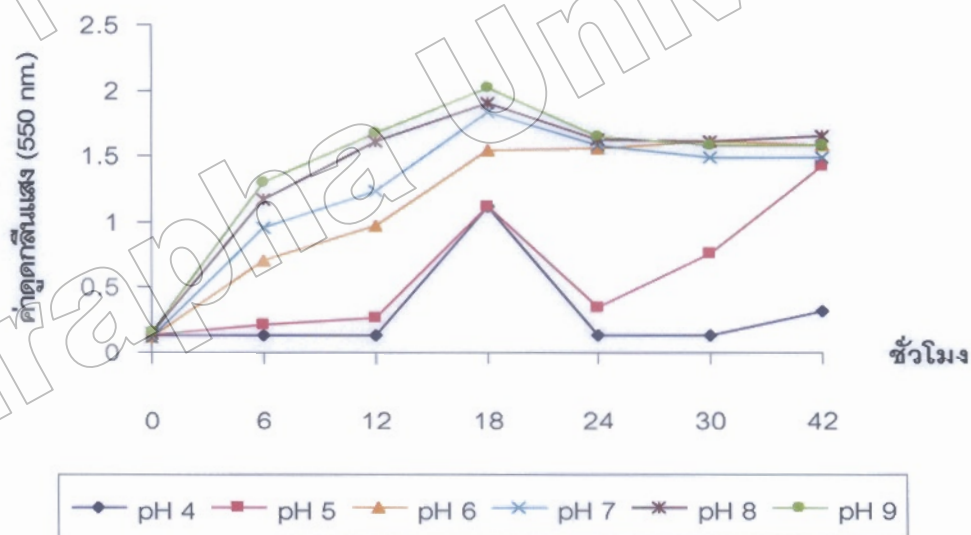
pH	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
pH 4	0.1192	0.1158	0.1166	0.2486	0.1132	0.1135	0.1003
pH 5	0.115	0.1088	0.0992	0.0854	0.0839	0.1075	0.367
pH 6	0.113	0.3025	0.283	0.4172	0.2572	0.4087	1.335
pH 7	0.1119	0.5068	0.4804	1.1298	0.9721	1.2724	1.1761
pH 8	0.1326	0.8791	1.2097	1.7663	1.3628	1.1091	0.9894
pH 9	0.1492	1.0128	1.5	2.003	1.3715	1.1684	1.0748



ภาพที่ 4-5 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *A. junii* ที่มีต่อ
ความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-8 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่มีต่อความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ

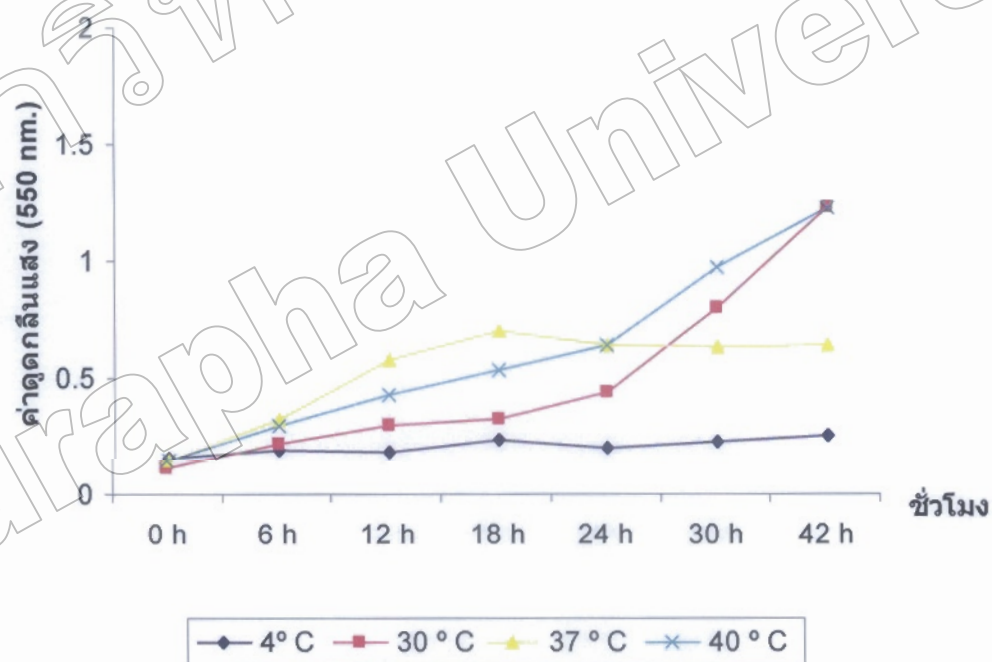
pH	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
pH 4	0.1394	0.1274	0.1298	1.1233	0.137	0.1269	0.3211
pH 5	0.1325	0.2153	0.272	1.1131	0.3493	0.754	1.4199
pH 6	0.1233	0.7041	0.9731	1.5392	1.5509	1.6097	1.5883
pH 7	0.1251	0.9605	1.2352	1.8374	1.5831	1.4939	1.483
pH 8	0.1455	1.1642	1.609	1.9062	1.6234	1.6067	1.65
pH 9	0.1594	1.3032	1.6701	2.0225	1.6431	1.5888	1.5815



ภาพที่ 4-6 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่มีต่อความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-9 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับต่าง ๆ

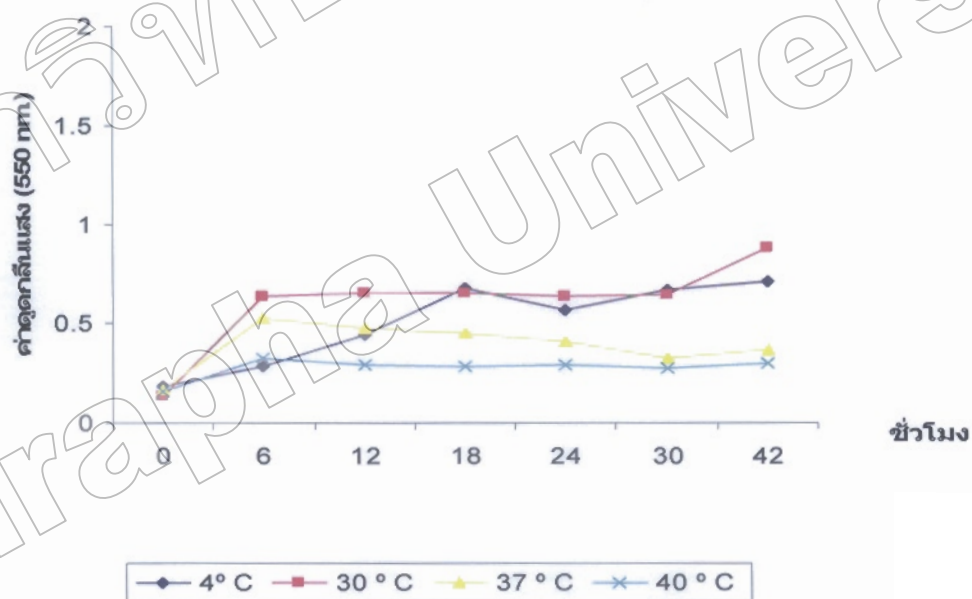
Temp. (°C)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
4	0.1553	0.1899	0.1836	0.2396	0.199	0.229	0.2532
30	0.111	0.2205	0.3011	0.3212	0.4382	0.7959	1.2251
37	0.1466	0.3267	0.5819	0.7046	0.6397	0.6301	0.6368
40	0.1497	0.2964	0.4278	0.538	0.6378	0.9703	1.2294



ภาพที่ 4-7 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-10 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. fluvialis* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับต่าง ๆ

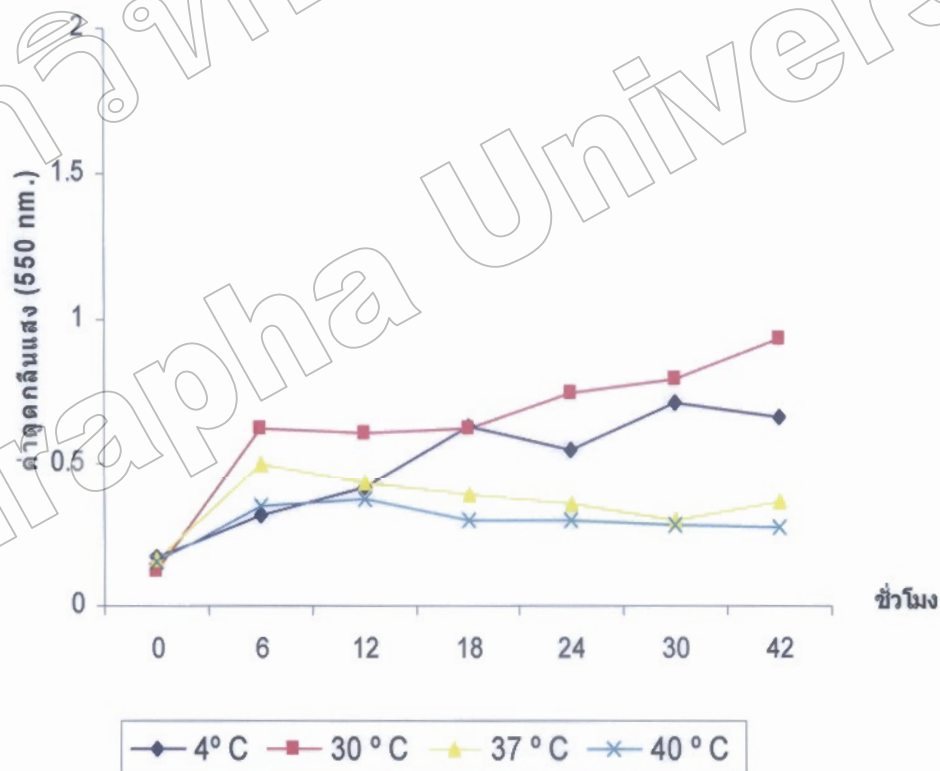
Temp. (°C)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
4	0.1852	0.2815	0.4461	0.6781	0.5715	0.666	0.7124
30	0.1346	0.6362	0.6517	0.6544	0.6375	0.6431	0.8805
37	0.1715	0.5254	0.474	0.449	0.4133	0.3274	0.3721
40	0.1625	0.3296	0.295	0.2815	0.2898	0.2791	0.2986



ภาพที่ 4-8 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. fluvialis* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-11 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *A. junii* ที่มีต่ออุณหภูมิ
ในระดับต่าง ๆ

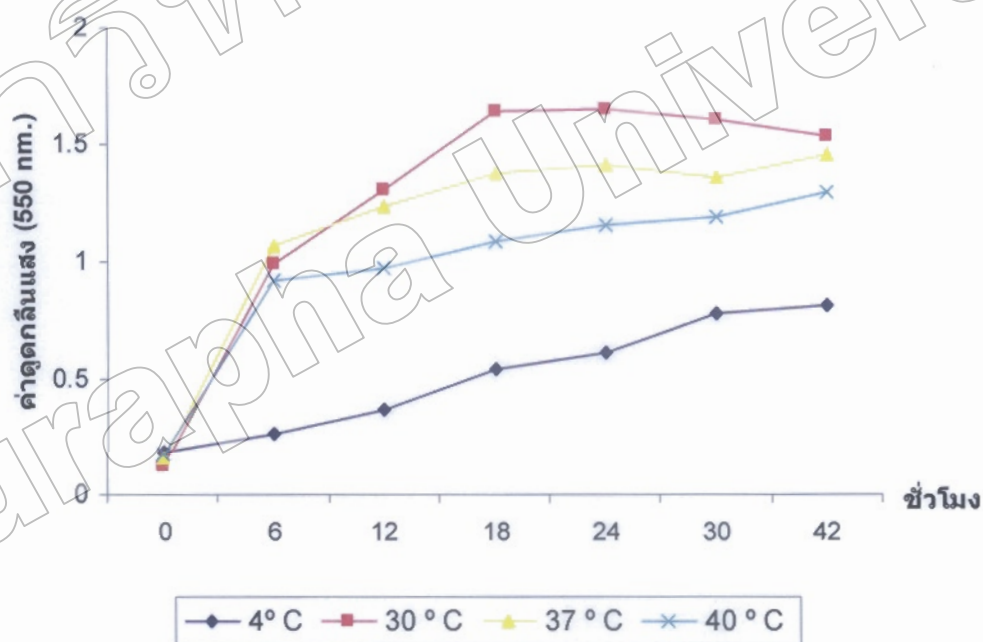
Temp. (°C)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
4	0.1751	0.3176	0.4192	0.6344	0.5512	0.7111	0.6678
30	0.1206	0.6255	0.61	0.6254	0.7448	0.7963	0.9376
37	0.1654	0.4994	0.4359	0.3906	0.3626	0.3057	0.3655
40	0.1577	0.3525	0.3758	0.3012	0.3002	0.2874	0.2757



ภาพที่ 4-9 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *A. junii* ที่มีต่ออุณหภูมิ
ในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-12 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับต่าง ๆ

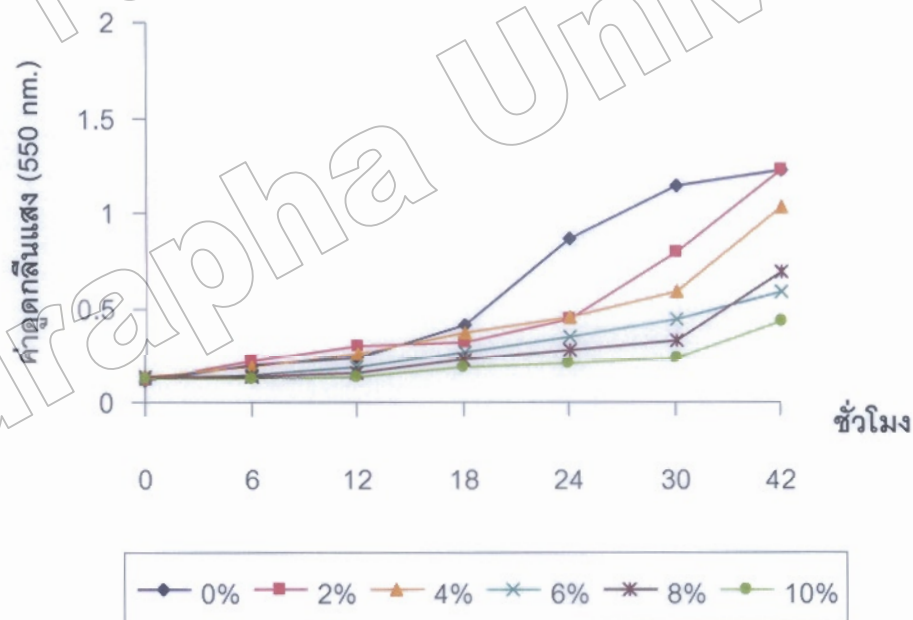
Temp. (°C)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
4	0.1801	0.2654	0.3665	0.5435	0.6166	0.7802	0.8143
30	0.1257	0.9908	1.308	1.6416	1.6498	1.6034	1.5331
37	0.1615	1.0663	1.235	1.3778	1.4103	1.3632	1.4535
40	0.175	0.922	0.9736	1.0915	1.1581	1.1939	1.3014



ภาพที่ 4-10 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่มีต่ออุณหภูมิในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-13 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีต่อความเค็มในระดับต่าง ๆ

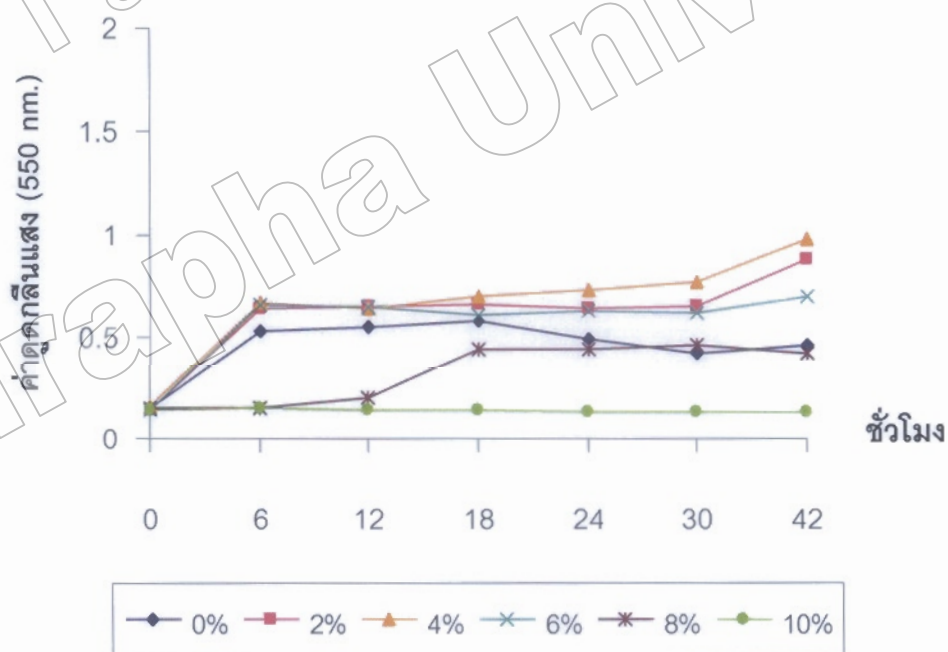
Salinity (%)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
0.5	0.1185	0.1944	0.2416	0.4074	0.871	1.1477	1.2309
2	0.111	0.2205	0.3011	0.3212	0.4382	0.7959	1.2251
4	0.1366	0.1881	0.2629	0.3696	0.4565	0.5885	1.0342
6	0.1253	0.1493	0.1893	0.2659	0.346	0.447	0.5887
8	0.1306	0.1381	0.1583	0.2271	0.2758	0.3343	0.6951
10	0.1203	0.1211	0.1391	0.1888	0.2105	0.2389	0.4341



ภาพที่ 4-11 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีต่อความเค็มในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-14 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. fluvialis* ที่มีต่อความเค็มในระดับต่าง ๆ

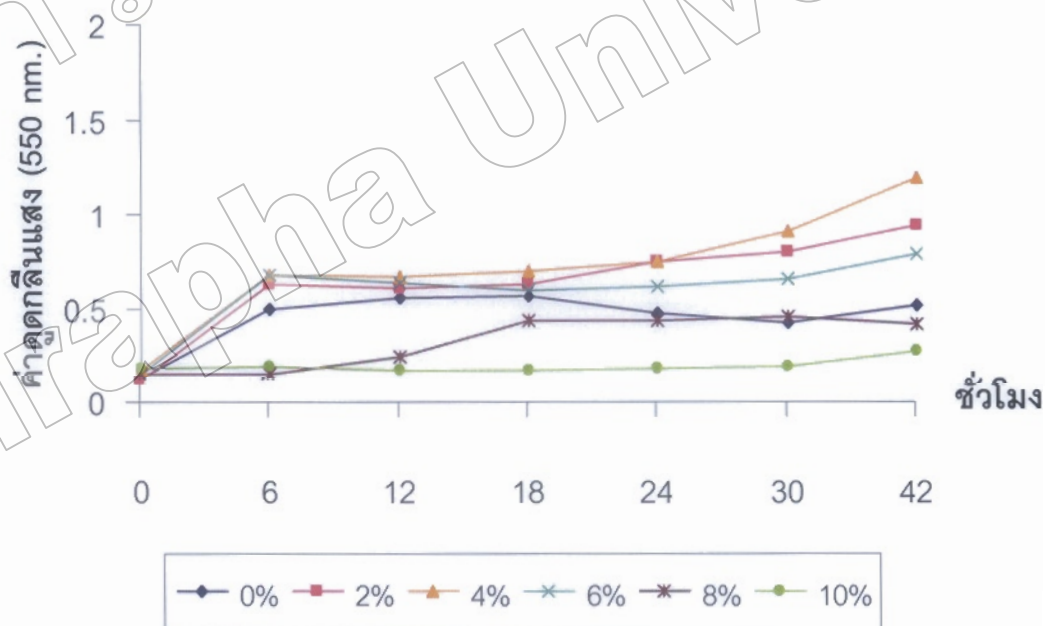
Salinity (%)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
0.5	0.1443	0.5275	0.5471	0.573	0.4916	0.4225	0.4544
2	0.1346	0.6362	0.6517	0.6544	0.6375	0.6431	0.8805
4	0.1573	0.6683	0.6352	0.7011	0.7307	0.7671	0.9774
6	0.1435	0.6545	0.6465	0.6037	0.6239	0.6134	0.6999
8	0.1503	0.1487	0.2023	0.4339	0.44	0.4555	0.4178
10	0.1437	0.1454	0.1369	0.1362	0.1313	0.1278	0.1266



ภาพที่ 4-12 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. fluvialis* ที่มีต่อความเค็มในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-15 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *A. junii* ที่มีต่อความเค็ม
ในระดับต่าง ๆ

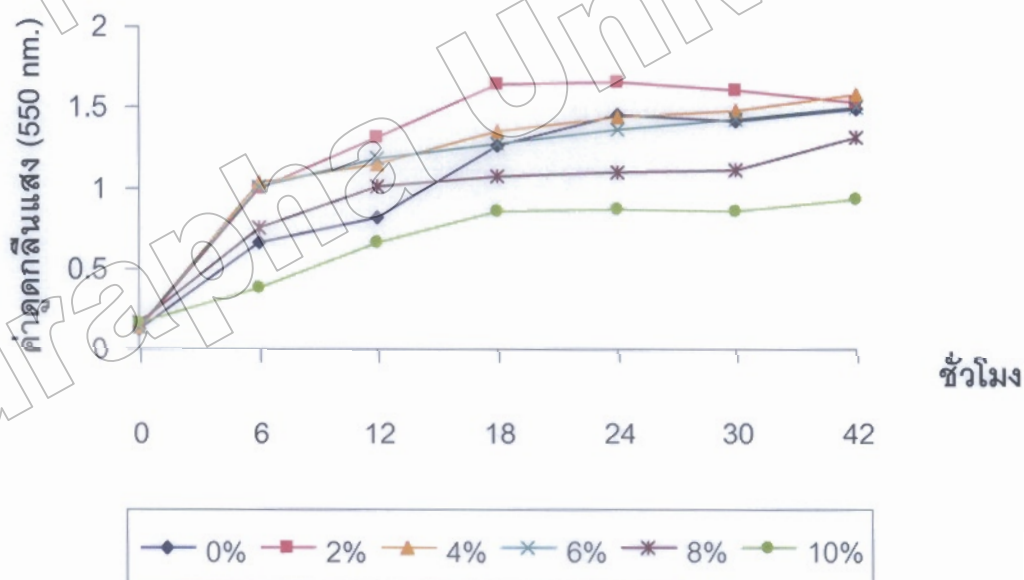
Salinity (%)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
0.5	0.132	0.4997	0.556	0.5628	0.4708	0.4279	0.5185
2	0.1206	0.6255	0.61	0.6254	0.7448	0.7963	0.9376
4	0.1705	0.6814	0.6631	0.7002	0.7441	0.9049	1.1939
6	0.1536	0.6808	0.6362	0.5965	0.6187	0.6582	0.7873
8	0.1528	0.1565	0.2395	0.4385	0.4357	0.45	0.419
10	0.1769	0.191	0.171	0.1683	0.1775	0.1956	0.2753



ภาพที่ 4-13 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *A. junii* ที่มีต่อความเค็ม
ในระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 4-16 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่มีต่อความเค็มในระดับต่าง ๆ

Salinity (%)	Optical Density (550 nm)						
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	42 hr
0.5	0.1331	0.6606	0.8215	1.2674	1.4528	1.4177	1.4925
2	0.1257	0.9908	1.308	1.6416	1.6498	1.6034	1.5331
4	0.1452	1.032	1.1526	1.3476	1.4392	1.4825	1.5818
6	0.1446	1.0116	1.1834	1.278	1.3619	1.425	1.4978
8	0.1702	0.7561	1.0046	1.0757	1.0908	1.108	1.3061
10	0.1667	0.3849	0.6678	0.8528	0.8681	0.8519	0.9314



ภาพที่ 4-14 การเจริญเติบโตที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* มีต่อความเค็มในระดับต่าง ๆ

3. โอกาสการก่อแผลเปื่อยของแบคทีเรียบนผิวหนังของเต่าตนุ

จากการฉีดแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ที่แยกได้จากแผลเปื่อย ปริมาณ 0.1 mL (จำนวน 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) เข้าบริเวณผิวหนังของเต่าตนุที่สุขภาพดี ผลการทดลองไม่พบโอกาสของแบคทีเรียทั้ง *B. sphaericus*, *V. fluvialis*, *A. junii* และ *V. alginolyticus* ในการก่อโรคในเต่าตนุ จำนวน 5 ตัว ต่อแบคทีเรีย ที่สังเกตภายใน 15 วัน เต่าที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรียและชนิดไม่ปรากฏบาดแผลในบริเวณที่ฉีดหรือบริเวณผิวหนัง และไม่แสดงอาการป่วยเลย แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้ไม่มีความสามารถในการรุกรานเข้าบ้านด้วยตัวเอง

4. ความไวของแบคทีเรียก่อโรคแผลเปื่อยต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

ทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด บนจานอาหาร Muller Hinton Agar กับยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด โดยใช้เทคนิค Disc Diffusion Method (ภาพที่ 4-15) และเมื่อเปรียบเทียบเส้นกึ่งกลางของแบคทีเรียที่เจริญหรือไม่เจริญรอบวง ได้ผลการทดลองมีดังนี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดมีการดื้อต่อยา Sulfadiazine สำหรับ *A. junii* ด้านยาเกือบทุกชนิด ยกเว้น Oxolinic acid แบคทีเรียที่ไวต่อยามากที่สุด 9 ชนิด ยกเว้น Sulfadiazine คือ *V. alginolyticus* ส่วน *B. sphaericus* ด้านทานต่อยา Ampicillin, Oxolinic Acid และ Sulfadiazine สำหรับผลทดสอบยาต่อ *V. fluvialis* พบว่ามีความสามารถต้านทานและไวต่อยาอย่างละ 5 ชนิด ผลของการต้านทานและไวต่อยาทั้ง 10 ชนิดที่ทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-17

5. รักษาโรคแผลเปื่อยในเต่าตนุ โดยใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี

เต่าตนุที่มีแผลเปื่อยถูกนำมาทดสอบรักษา โดยแบ่งเต่าตนุออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง พบว่า เต่าป่วยกลุ่ม 1 และ กลุ่ม 3 จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด ระยะเวลาที่แผลหายขึ้นอยู่กับความลึกของแผล แบบแผลตื้นใช้เวลา 5-10 วัน เต่าป่วยส่วนใหญ่หายจากการมีแผล 3 ตัว จาก 5 ตัว (ดังภาพที่ 4-16) แบบแผลหลุมลึกใช้เวลา 15 วัน เต่าป่วยทุกตัวหายจากการมีบาดแผล (ดังภาพที่ 4-17) การรักษาด้วยการให้กินยาออกซิเตตราไซคลินอย่างเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพด้อย เนื่องจากเต่าป่วย 3 ตัว จาก 5 ตัวเท่านั้นที่บาดแผลหายเป็นปกติภายใน 15 วัน ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา เต่าทุกตัวจะยังมีแผลเปื่อยตามร่างกายอยู่ทั่วไป ดังตารางที่ 4-18

ตารางที่ 4-17 ผลของความไวของแบคทีเรีย 4 ชนิด ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

Antimicrobial agents	Reactivity (mm)				
	Disk potency	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Acinetobacter junii</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
0/129	10 µg	S (35)	S (19)	R (6)	S (24)
Ampicillin (AM)	10 µg	R (0)	R (0)	R (0)	S (31)
Kanamycin (K)	30 µg	S (23)	S (23)	R (0)	S (22)
Nitrofurantoin (F)	300 µg	S (25)	R (14)	MS (15)	S (30)
Sulphamethoxazole /trimethoprim (SXT)	25 µg	S (35)	S (23)	R (11)	S (32)
Chloramphenicol (C)	30 µg	S (21)	MS (14)	R (0)	S (33)
Oxolinic acid (OA)	2 µg	R (13)	MS (18)	MS (16)	S (25)
Novobiocin (NB)	30 µg	S (23)	R (15)	R (0)	S (25)
Oxytetracycline (OT)	30 µg	S (35)	S (33)	R (10)	S (26)
Sulfadiazine (SD)	300 µg	R (13)	R (0)	R (8)	R (13)

หมายเหตุ R = Resistant S = Sensitive MS = Mildly Sensitive



ภาพที่ 4-15 ทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหาร Muller Hinton Agar กับยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 4-18 ผลการรักษาเต่าตนุที่เป็นโรคแผลเปื่อยด้วยยาปฏิชีวนะ และสารเคมี

กลุ่มที่	การรักษา	จำนวนเต่าป่วย (ตัว)	จำนวนตัวที่ไม่มีแผลตามระยะเวลาที่รักษา	
			(5-10 วัน)	15 วัน
1	คอปเปอร์ซัลเฟตอย่างเดียว	5	3 จาก 5 ตัว	5 จาก 5 ตัว
2	กินยาออกซีเตตราไซคลินอย่างเดียว	5	1 จาก 5 ตัว	3 จาก 5 ตัว
3	แช่ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต ร่วมกับการกินยาออกซีเตตราไซคลิน	5	3 จาก 5 ตัว	5 จาก 5 ตัว
4	ไม่ได้รักษา	5	0 จาก 5 ตัว	0 จาก 5 ตัว



ภาพที่ 4-16 ลักษณะแผลตื้นบริเวณขาหน้าของเต่าตนุ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับวันที่ 3 หลังการรักษาบาดแผลโดยการแช่ในคอปเปอร์ซัลเฟต (ขวา) แผลหายเป็นปกติภายใน 5-10 วัน



ภาพที่ 4-17 ลักษณะแผลหลุมลึกบริเวณคอของเต่าตนุ (ซ้าย) เปรียบเทียบกับวันที่ 8 วัน หลังการรักษาบาดแผลโดยการแช่ในคอปเปอร์ซัลเฟต (ขวา) แผลหายเป็นปกติภายใน 15 วัน