



คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสรวย (*Pangasianodon hypophthalmus*)

แซ่แข็ง

Microbiological quality of sperm cryopreservation technique of striped
catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

ชยาภา นิลโกศล

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสร้อย (*Pangasianodon hypophthalmus*)
แช่แข็ง



ชยาภา นิลโกศล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

Microbiological quality of sperm cryopreservation technique of striped
catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)



CHAYAPA NINKOSON

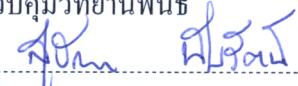
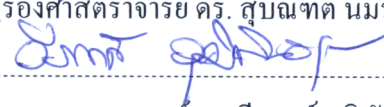
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN APPLIED MICROBIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2020

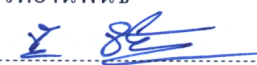

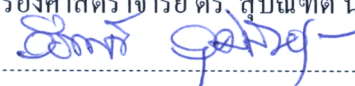
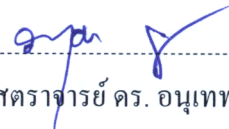
COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ชยาภา นิลโกศล ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิมรัตน์)
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิช่างกูร)
 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิมรัตน์)
 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)
 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุเทพ ภาสุระ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

 คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 1 เดือน กันยายน พ.ศ. 2563

60910018: สาขาวิชา: จุลชีววิทยาประยุกต์; วท.ม. (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คำสำคัญ: ปลาสาวย, การปนเปื้อนแบคทีเรีย, สารปฏิชีวนะ, การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ชยาภา นิลโกศล : คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสาวย

(*Pangasianodon hypophthalmus*) แช่แข็ง. (Microbiological quality of sperm cryopreservation technique of stripedcatfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุปันชาติ นิมรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย ปี พ.ศ. 2563.

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็งในหลอด 3 ขนาด ได้แก่ 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ที่ลดอุณหภูมิอย่างง่ายด้วยกล่องโฟมที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) ตู้แช่แข็ง -80 และ -20 °C ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว และศึกษาความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสาวย โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ตอน ได้แก่ ตอนที่ 1 เป็นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสาวยในถังไนโตรเจนเหลวนาน 6 วัน พบว่าน้ำเชื้อปลาสาวยในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ก่อนนำมาลดอุณหภูมิและน้ำเชื้อหลังแช่แข็งนาน 30 นาที มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดใกล้เคียงกัน ($3.83 \pm 0.26 - 4.35 \pm 0.49 \times 10^4$ CFU/mL) ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับน้ำเชื้อแช่แข็งตั้งแต่ 24 ชั่วโมง ถึง 6 วัน การทดลองในตอนที่ 2 ที่ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสาวยในหลอด 3 ขนาด ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 180 วัน พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดทั้ง 3 ขนาด โดยแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีปริมาณมากที่สุดตลอดระยะเวลา 180 วัน การศึกษาในตอนที่ 3 เป็นการเปรียบเทียบน้ำเชื้อปลาสาวยในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 °C นาน 90 วัน พบว่าอุณหภูมิ ($F=5.72$ และ $P=0.004$) และระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อ ($F=12.92$ และ $P=0.00$) เป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็ง และการศึกษาในตอนสุดท้ายที่ศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็ง พบว่าแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท คิดเป็น 44.5 เปอร์เซ็นต์ ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ ได้แก่ *P. aeruginosa* PA test, *P. fluorescens* PF, *P. putida* PPio1, *P. putida* PPio2, *P. oryzihabitans* PO, *A. baumannii* ABio1, *A. baumannii* ABio2 และ *A. baumannii* ABio3 และแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท คิดเป็น 38.9 เปอร์เซ็นต์ คือต่อสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิดที่ทดสอบ โดย *K. kristinae* KO, *S. maltophilia* SMio1, *S. maltophilia* SMio2 และ *S. maltophilia* SMio3 จัดเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด ส่วน *K. sedentarius* KSio1, *K. sedentarius* KSio2

และ *K. sedentarius* KSio3 จัดเป็นแบคทีเรียที่ต่อต้านสารปฏิชีวนะ 4 ชนิด การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคในปลาและแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคในมนุษย์ที่ดื้อยาหลายขนาน ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อที่สามารถกำจัดแบคทีเรียแต่ยังคงรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งให้มีคุณภาพดีต่อไป



60910018: MAJOR: APPLIED MICROBIOLOGY; M.Sc. (APPLIED MICROBIOLOGY)

KEYWORDS: STRIPED CATFISH BACTERIAL CONTAMINATION ANTIBIOTIC CRYOPRESERVATION

CHAYAPA NINKOSON : MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SPERM CRYOPRESERVATION TECHNIQUE OF STRIPEDCATFISH (*PANGASIANODON HYPOPTHALMUS*) . ADVISORY COMMITTEE: SUBUNTITH NIMRAT, , VERAPONG VUTHIPHANDCHAI 2020.

This study aimed to investigate bacterial contaminants in stripped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) semen loaded in 0.5-, 2.5-, and 4.0-mL straws, frozen with a simple protocol using a Styrofoam box, and cryopreserved in a liquid nitrogen tank (-196 °C), a deep freezer (-80 °C), and a freezer (-20 °C) for short-term and long-term storage, and study antibiotic susceptibility of bacteria isolated from stripped catfish semen. The experimental design was divided into 4 sections. In the first experiment related to cryopreservation of stripped catfish semen in a liquid nitrogen tank for 6 days, pre-frozen semen and 30-min post-frozen semen loaded in 0.5, 2.5 and 4.0-mL straws had comparatively similar number of total heterotrophic bacteria (THB) in the ranges of 3.83 ± 0.26 to $4.35 \pm 0.49 \times 10^4$ CFU/mL, which was significantly higher than those in post-frozen semen for 24 h to 6 days. In the second focused on cryopreservation of stripped catfish semen in a liquid nitrogen tank for 180 days, storage duration had no effect on THB number in the semen loaded in the three different sizes of straws and the highest THB number seemed to observe in the semen filled in 4.0-mL straw during a 180-day storage. In the third experiment in regard to comparison of bacterial change in stripped catfish semen loaded in 0.5, 2.5 and 4.0-mL straws and frozen at -20, -80 and -196 °C for 90 days, storage temperature ($F=5.72$ and $P=0.004$) and storage duration ($F=12.92$ and $P=0.00$) were identified as the main effect on THB number in cryostored stripped catfish semen. In the last experiment pertaining to antibiotic susceptibility of 18 bacterial strains isolated from cryostored semen of stripped catfish, eight isolates (44.5%) were susceptible to all tested antibiotics including *P. aeruginosa* PA test, *P. fluorescens* PF, *P. putida* PPio1, *P. putida* PPio2, *P. oryzihabitans* PO, *A. baumannii* ABio1, *A. baumannii* ABio2 and *A. baumannii* ABio3 while

seven isolates (38.9%) were resistant to at least 3 tested antibiotics. *K. kristinae* KO, *S. maltophilia* SMio1, *S. maltophilia* SMio2 and *S. maltophilia* SMio3 were classified as three multi-drug resistant (MDR3) strains whereas MDR4 strain was assigned to *K. sedentarius* KSio1, *K. sedentarius* KSio2 and *K. sedentarius* KSio3. This study suggests that stripped catfish semen was contaminated with MDR strains of fish pathogens and human opportunistic pathogens. Therefore, development of cryopreservation technique for stripped catfish semen to eliminate bacterial contaminants together with retaining sperm quality should be further established.



กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒน์จิต นิ่มรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้คอยให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่ถูกต้องและเป็นประโยชน์ คอยตรวจสอบและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวาริชศาสตร์ และศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกทางด้านอุปกรณ์และเครื่องมือตลอดการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ ๆ น้อง ๆ ที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจให้กับผู้วิจัยเสมอมา
สุดท้ายนี้ขอโน้มรำลึกถึงบารมีคุณพระศรีรัตนตรัย ที่เป็นที่พึ่งทางสติช่วยให้ผู้วิจัยสำเร็จจัดทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ชยาภา นิลโกศล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฅ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ฅ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ค
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
บทที่ 2	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชีวิตวัยของปลาสาวย	4
2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลา	6
2.3 ลักษณะของสเปิร์มปลา	7
2.4 อุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง	8
2.5 การแช่แข็งน้ำเชื้อ	10
2.6 การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลา.....	13
2.7 ยาด้านจุลชีพ	15

บทที่ 3	37
วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
การคัดเลือกพ่อพันธุ์และการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ	39
การทดลองที่ 1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายที่เก็บรักษาในระยะสั้น	40
การทดลองที่ 2 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลาย	45
การทดลองที่ 3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลาย	47
การทดลองที่ 4 การตรวจสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรอปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง	49
การวิเคราะห์ทางสถิติ	51
บทที่ 4	52
ผลการทดลอง	52
4.1 การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาดต่างกันและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส	52
4.2 การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่เก็บรักษาในระยะยาวในถังไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส	67
4.3 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งในหลอดบรรจุแต่ละขนาดที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	74
4.4 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรอปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง	95
บทที่ 5	109
สรุปและอภิปรายผล	109
สรุปผลการทดลอง.....	109

อภิปรายผลการทดลอง.....	111
ข้อเสนอแนะ	125
บรรณานุกรม	126
ภาคผนวก	141
ภาคผนวก ก	142
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	142
ภาคผนวก ข	144
ชุดทดสอบ API test kit.....	144
ภาคผนวก ค	145
การข้อมสีแกรม.....	145
ภาคผนวก ง.....	146
การทดสอบทางชีวเคมี.....	146
ภาคผนวก จ.....	147
การเตรียมสารเคมีและน้ำยา.....	147
ภาคผนวก ฉ	148
ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์	148
ภาคผนวก ฉ	203
ผลการวิเคราะห์ความไวต่อสารปฏิชีวนะ	203
ภาคผนวก ช	247
ภาพผลการทดลอง	247
ประวัติย่อของผู้วิจัย	266

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ต่อการการติดเชื้อแบคทีเรีย.....	16
ตารางที่ 2	อุณหภูมิของน้ำและระยะเวลาที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร	47
ตารางที่ 3	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสดที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน	54
ตารางที่ 4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20NE ของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง	56
ตารางที่ 5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20E ของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง	58
ตารางที่ 6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API Staph ของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง	60
ตารางที่ 7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50CH ของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง	62
ตารางที่ 8	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสด ที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน	66
ตารางที่ 9	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสด ที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 180 วัน	69
ตารางที่ 10	ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสด ที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 180 วัน	71
ตารางที่ 11	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัส โทโรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งด้วยกล่องโฟมที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง	76

ตารางที่ 12 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็งด้วยกล่องโฟม ที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง	78
ตารางที่ 13 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็งด้วยกล่องโฟม ที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง	80
ตารางที่ 14 ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพล ปฏิสัมพันธ์ของปัจจัย และความแปรปรวนร่วมของปัจจัยต่อ ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็งที่ บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บ รักษา 90 วันของการทดลอง	82
ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็งที่ บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง	83
ตารางที่ 16 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อพลาสติกสวย ที่แช่แข็งด้วยกล่อง โฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน	85
ตารางที่ 17 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อพลาสติกสวย ที่แช่แข็งด้วยกล่อง โฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน	89
ตารางที่ 18 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อพลาสติกสวย ที่แช่แข็งด้วยกล่อง โฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน	93
ตารางที่ 19 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่แยกได้จากน้ำเชื้อพลาสติกสวย แช่แข็ง	96
ตารางที่ 20 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>B. cereus</i> ที่แยกได้จากน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็ง.....	98
ตารางที่ 21 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน กลุ่มไม่หมักย่อน้ำตาล กลูโคส ในสกุล <i>Pseudomonas</i> ที่แยกได้จากน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็ง.....	100
ตารางที่ 22 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>S. maltophilia</i> ที่แยกได้จากน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็ง	102
ตารางที่ 23 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>A. baumannii</i> ที่แยกได้จากน้ำเชื้อพลาสติกสวยแช่แข็ง.....	104

ตารางที่ 24 รูปแบบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา สวายแช่แข็ง.....	106
ตารางที่ 25 รูปแบบการคือต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา สวายแช่แข็ง.....	107
ตารางที่ 26 ความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของแบคทีเรียแกรม บวกที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง.....	108
ตารางที่ 27 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ก่อนนำไปแช่แข็ง	148
ตารางที่ 28 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน น้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน.....	150
ตารางที่ 29 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน น้ำเชื้อปลาสวาย ที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 180 วัน	161
ตารางที่ 30 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน น้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษา ที่ อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน.....	178
ตารางที่ 31 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปัจจัยหลักที่มีอิทธิพล ปฏิสัมพันธ์ของปัจจัย ความ แปรปรวนร่วมของปัจจัย และความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลา สวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง.....	196
ตารางที่ 32 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Micrococcus</i> โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	203
ตารางที่ 33 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>Ko. kristinae</i> (ไอโซเลท 1) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	204
ตารางที่ 34 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>K. sedentarius</i> (ไอโซเลท 2) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	207
ตารางที่ 35 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>K. sedentarius</i> (ไอโซเลท 3) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	209

ตารางที่ 36 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>K. sedentarius</i> (ไอโซเลท 4) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	213
ตารางที่ 37 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i> โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	216
ตารางที่ 38 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>B. cereus</i> (ไอโซเลท 5) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	217
ตารางที่ 39 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>B. cereus</i> (ไอโซเลท 6) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	220
ตารางที่ 40 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>B. cereus</i> (ไอโซเลท 7) โดยมี <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม	223
ตารางที่ 41 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	226
ตารางที่ 42 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>P. aeruginosa</i> (ไอโซเลท 8) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	227
ตารางที่ 43 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>P. fluorescens</i> (ไอโซเลท 9) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	228
ตารางที่ 44 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>P. putida</i> (ไอโซเลท 10) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	229
ตารางที่ 45 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>P. putida</i> (ไอโซเลท 11) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	230
ตารางที่ 46 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>P. oryzihabitans</i> (ไอโซเลท 12) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	231
ตารางที่ 47 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Stenophotomonas</i> โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	232
ตารางที่ 48 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>S. maltophilia</i> (ไอโซเลท 13) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	233
ตารางที่ 49 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>S. maltophilia</i> (ไอโซเลท 14) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	235
ตารางที่ 50 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>S. maltophili</i> (ไอโซเลท 15) โดยมี <i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม	237

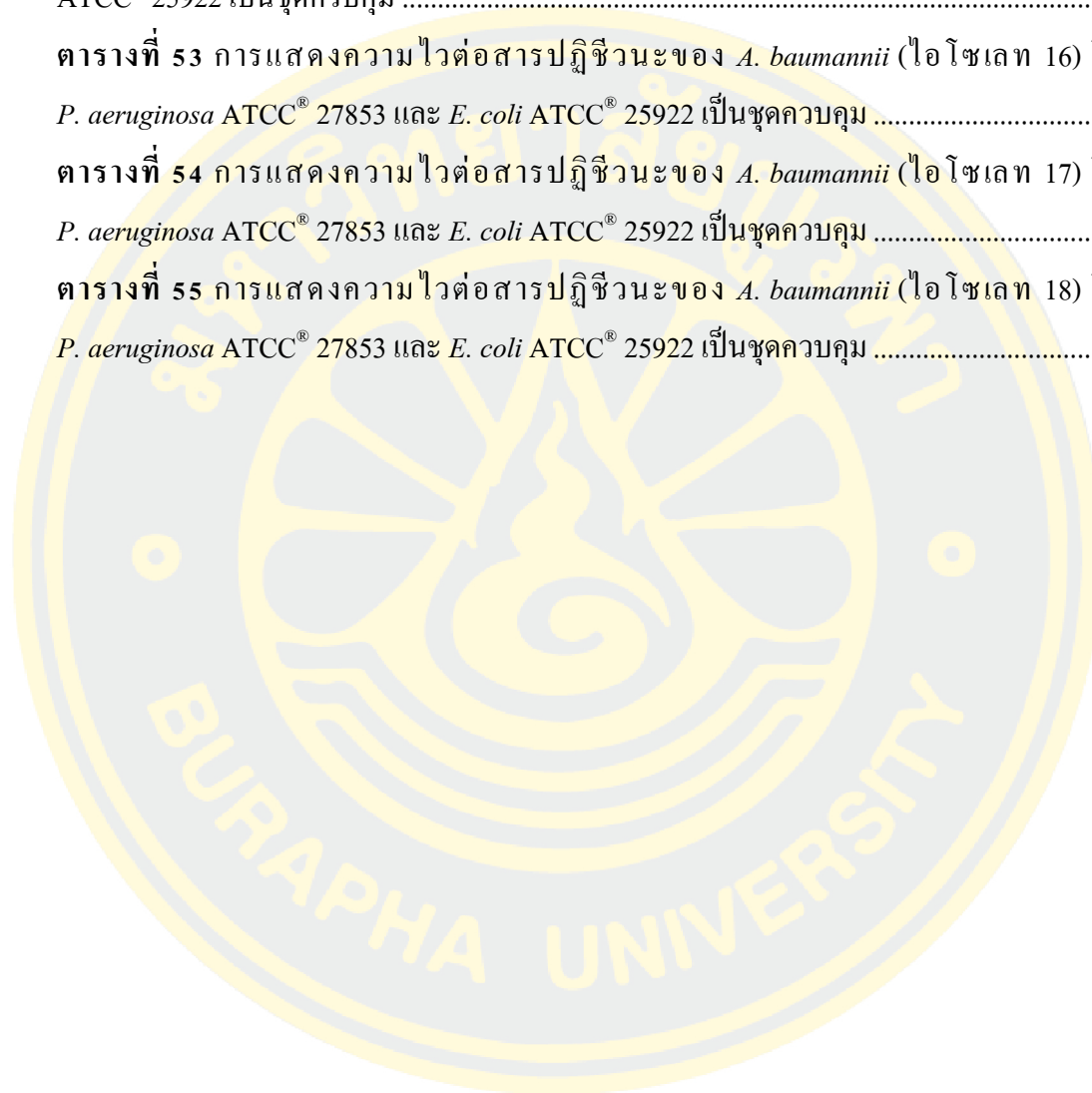
ตารางที่ 51 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Acinetobacter* โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม239

ตารางที่ 52 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Acinetobacter* โดยมี *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุดควบคุม240

ตารางที่ 53 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 16) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุดควบคุม241

ตารางที่ 54 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 17) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุดควบคุม243

ตารางที่ 55 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 18) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุดควบคุม245



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ลักษณะของปลาสวาย (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>).....	5
ภาพ 2 ปลาสวายที่เลี้ยงในกระชัง, ปลาสวายที่เลี้ยงในบ่อดิน	5
ภาพ 3 ความแตกต่างระหว่างปลาสวายเพศผู้และปลาสวายเพศเมีย	6
ภาพ 4 ลักษณะรูปร่างของสเปิร์มปลา	8
ภาพ 5 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยถังไนโตรเจนเหลว.....	10
ภาพ 6 วิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยการกดเบา ๆ บริเวณท้องปลา.....	11
ภาพ 7 ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4.00 มิลลิลิตร, ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.50 มิลลิลิตร, ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร	13
ภาพ 8 แผนภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายอย่างง่ายด้วยไอไนโตรเจนเหลวและการเก็บรักษา.....	41
ภาพ 9 แผนภาพการตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสวาย.....	42
ภาพ 10 แผนภาพการตรวจสอบการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit	44
ภาพ 11 แผนภาพการตรวจสอบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลาย.....	46
ภาพ 12 แผนภาพการประเมินผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสวายหลังการละลาย.....	48
ภาพ 13 แผนภาพการตรวจสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง.....	50
ภาพ 14 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย ที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน	67
ภาพ 15 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 180 วัน	73
ภาพ 16 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน	87

ภาพ 17 สกัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสที่พบในน้ำเชื่อมปลาสดแช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 2.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน	91
ภาพ 18 สกัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสที่พบในน้ำเชื่อมปลาสดแช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน	95
ภาพ 19 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>Ko. kristinae</i> ด้วยวิธี disk diffusion.....	97
ภาพ 20 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>B. cereus</i> (BSi03) ด้วยวิธี disk diffusion.....	99
ภาพ 21 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>P. fluorescens</i> (PF) ด้วยวิธี disk diffusion.....	101
ภาพ 22 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>S. maltophilia</i> (SMi03) ด้วยวิธี disk diffusion	103
ภาพ 23 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>A. baumannii</i> (ABi01) ด้วยวิธี disk diffusion	105
ภาพ 24 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>Ko. kristinae</i>	247
ภาพ 25 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>K. sedentarius</i>	247
ภาพ 26 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>B. cereus</i>	248
ภาพ 27 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>P. aeruginosa</i>	248
ภาพ 28 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>P. fluorescens</i>	249
ภาพ 29 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>P. putida</i>	249
ภาพ 30 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>P. oryzihabitans</i>	250
ภาพ 31 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>S. maltophilia</i>	250
ภาพ 32 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ <i>A. baumannii</i>	251
ภาพ 33 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ <i>Ko. kristinae</i> ด้วยวิธี disk diffusion.....	252

ภาพ 34 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (KSi01) ด้วยวิธี disk diffusion253

ภาพ 35 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (KSi02) ด้วยวิธี disk diffusion254

ภาพ 36 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (KSi03) ด้วยวิธี disk diffusion255

ภาพ 37 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi01) ด้วยวิธี disk diffusion256

ภาพ 38 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi02) ด้วยวิธี disk diffusion257

ภาพ 39 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi03) ด้วยวิธี disk diffusion258

ภาพ 40 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* (PA test) ด้วยวิธี disk diffusion259

ภาพ 41 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. fluorescens* (PF) ด้วยวิธี disk diffusion259

ภาพ 42 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. putida* (PPio1) ด้วยวิธี disk diffusion260

ภาพ 43 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. putida* (PPio2) ด้วยวิธี disk diffusion260

ภาพ 44 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. oryzae* (PO) ด้วยวิธี disk diffusion261

ภาพ 45 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi01) ด้วยวิธี disk diffusion261

ภาพ 46 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi02) ด้วยวิธี disk diffusion262

ภาพ 47 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi03) ด้วยวิธี disk diffusion262

ภาพ 48 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi01) ด้วยวิธี disk diffusion263

ภาพ 49 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi02) ด้วยวิธี disk diffusion264

ภาพ 50 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi03) ด้วยวิธี disk diffusion265

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นหนึ่งในประเทศที่มีความสำคัญในการผลิตสินค้าทางประมงของโลกเนื่องจากมีความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติเหมาะสำหรับการประมง (เรื่องไร โตกฤษณะ, กุลภา กุลคิดก, กุลภา บุญชูวงศ์, เบญจวรรณ คงชน และธัญธาดา มะวงศ์ไว, 2558) ซึ่งปลาสวายเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย โดยมีถิ่นที่อยู่อาศัยในแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำป่าสัก และแม่น้ำโขง รวมทั้งแหล่งน้ำขนาดใหญ่ที่มีทางติดต่อกับแม่น้ำดังกล่าว (นงศ์เยาว์ มณี, ผ่องใส จันทรศิริ และทิพย์สุตา ต่างประโคน, 2554) เนื่องจากปลาสวายในธรรมชาติมีอัตราการรอดชีวิตในระหว่างการพักตัวไม่มากนัก และมีการขาดแคลนลูกพันธุ์ปลาในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ รวมถึงคุณภาพน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำในบางช่วงของฤดูผสมพันธุ์ ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมเทียม ในหลาย ๆ ฟาร์มมีการเลี้ยงพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่ดีเพื่อใช้ในการผสมเทียม แต่ปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อปลาสวายที่มีคุณภาพดีก็ยังมีอยู่ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยการแช่แข็ง จึงเป็นวิธีการที่ควรทำการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยการแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นการยืดระยะเวลาการมีชีวิตรอดของสเปิร์มให้ให้มีระยะยาวนานมากขึ้น เนื่องจากไม่มีกิจกรรมทางชีวเคมีเกิดขึ้นภายในเซลล์ทำให้สามารถรักษาสภาพเซลล์ได้นาน (Fuller & Paynter, 2004) จากพ่อพันธุ์ที่แข็งแรงสมบูรณ์ หรือมีน้ำเชื้อเพียงพอในระหว่างที่แม่พันธุ์มีความพร้อมวางไข่ หรือไข่มีความสมบูรณ์ อีกทั้งยังสามารถช่วยในปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีความแข็งแรง ทนต่อโรค หรือผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ ๆ รวมถึงเพิ่มความสะดวกต่อการขนส่งระหว่างโรงเพาะฟัก (นิตา ไชยรักษ์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา, 2539) มีรายงานวิจัยหลายแห่งที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์น้ำ เช่น ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ปลาอุกเทศ (*Clarias gariepinus*) ปลาดตะเพียน (*Barbodes gonionotus*) ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) และปลากระพงแดงป่าชายเลน (*Lutjanus argentimaculatus*) เป็นต้น (Vuthiphandchai, Wilairattanadilok, Chomphuthawach, Sooksawat, & Nimrat, 2015; ศิริพร คชรัตน์, สุบดินจิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2548; วสันต์ ป้อมเสมา, 2552; เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ Bart, 2551; Vuthiphandchai, Chomphuthawach

& Nimrat, 2009; อนงคณ์ หัมพานนท์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา, 2539) แต่อย่างไรก็ตามการผสมพันธุ์เทียมในปลาบางชนิดที่มีไข่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจำเป็นจะต้องใช้น้ำเชื้อในปริมาณมากตามไปด้วย ดังนั้นในการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยใช้หลอดขนาดเล็ก (0.25 - 2.0 มิลลิลิตร) อาจไม่เพียงพอต่อปริมาณน้ำเชื้อที่ต้องการใช้หรือต้องใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อจำนวนมาก

มีรายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากครั้งแรก และต่อมาได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในปลา เช่น ปลาเทราต์สายรุ้ง (*Oncorhynchus mykiss*) (Cabrita, Robles, Alvarez & Herraez, 2001), ปลาฉลามปากเป็ด (*Polyodon spathula*) (Linhart et al., 2006), ปลาหิมะ (*Chalcalburnus chalcalburnus*) (Lahnsteiner, Berger & Weismann, 2003), ปลาไบรคอน (*Brycon opalinus*) (Viveiros, Orfão, Nascimento, Corrêa, & Caneppele, 2012), ปลาคาร์ป (*Cyprinus capio*) (Horvath et al., 2007), ปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) (Fauvel, Suquet, Dreanno, Zonno, & Menu, 1998) และปลาซาร์อาร์คติก (*Salvelinus alpinus*) (Richardson, Miller & McNiven, 2000) แต่ก็ยังพบว่ายังประสบปัญหาในด้านอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักตัวจากน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในหลอดขนาดใหญ่ โดยต้องคำนึงถึงอัตราการลดอุณหภูมิการแช่แข็ง และการละลายของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่ ซึ่งอุณหภูมิอาจไม่ทั่วถึงทั้งภายในหลอด ทำให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง (Bwanga, de Braganca, Einarsson & Rodriguez-Martinez, 1990; Bwanga, Einarsson & Rodriguez-Martinez, 1991)

การผสมพันธุ์เทียมเป็นที่นิยมในฟาร์มเพราะพันธุ์ปลาหลาย ๆ ฟาร์ม แต่ยังมีบางส่วนที่อาจจะไม่มีถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) สำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอุณหภูมิต่าง ๆ ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ เช่น ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 และ -80 องศาเซลเซียส เพื่อส่งเสริมให้มีการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งอย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์อย่างสูงสุด นอกจากนี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนแบคทีเรียจากเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อ เช่น วิธีการรีดน้ำเชื้อ ระหว่างขั้นตอนการแช่แข็ง หรือระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็ง Boonthai et al. (2016a) ได้ทำการศึกษาสาเหตุการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็ง พบว่า การปนเปื้อนส่วนใหญ่ของแบคทีเรียมักพบในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ครัวบริเวณช่องแช่ และน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ รวมถึงพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในถังเก็บไนโตรเจนเหลว พื้นที่ผิวของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ การปนเปื้อนของแบคทีเรียส่งผลให้สเปิร์มเกิดความเสียหายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์สเปิร์มเกิด apoptosis ด้วยสาร metabolites ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น และการสัมผัสโดยตรงระหว่างเซลล์สเปิร์มและแบคทีเรีย (Villegas, Schulz, Soto & Sanchez, 2005) Jenkins & Tiersch (1997) รายงานว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาคอดอเมริกัน

(*Ictalurus punctatus*) ที่ลดลงสอดคล้องกับอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรีย และพบแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* คิดเป็น 67 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมด ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาซวาย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งเพื่อให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพสำหรับการผสมพันธุ์เทียม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ตรวจสอบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อจากเทคนิคการแช่แข็งและการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลาซวายปริมาณมากในหลอดบรรจุขนาดต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์
2. ศึกษาผลแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาซวายที่เก็บรักษาในระยะยาว
3. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาซวายต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ
4. ตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาซวายแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เพื่อสามารถทราบถึงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ และในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในปริมาณมาก ทำให้นำมาซึ่งข้อมูลในการป้องกันและควบคุมปริมาณของแบคทีเรียในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ
2. เพื่อทราบถึงปริมาณและชนิดแบคทีเรียที่สามารถปนเปื้อนได้ในอุณหภูมิต่าง ๆ ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง
3. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพของเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาซวายให้มีประสิทธิภาพและลดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรียจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในระยะยาว

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาปริมาณของแบคทีเรียและชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาซวายในเชิงพาณิชย์ อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแตกต่างกัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยเรื่องคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งนั้น ต้องใช้ทฤษฎีและงานวิจัยเกี่ยวกับขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง และการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาสวาย ซึ่งมีดังต่อไปนี้

- 2.1 ชีววิทยาของปลาสวาย
- 2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลา
- 2.3 ลักษณะของสเปิร์มปลา
- 2.4 อุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง
- 2.5 การแช่แข็งน้ำเชื้อ
- 2.6 การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลา
- 2.7 ยาด้านจุลชีพ
- 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของปลาสวาย

ปลาสวายเป็นปลาหนัง ไม่มีเกล็ดเช่นเดียวกับปลาเทโพ เทพา และสังกะวาด อาศัยอยู่ในน้ำจืด จัดอยู่ในกลุ่ม Pangasiidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pangasianodon hypophthalmus* มีความยาวถึง 150 เซนติเมตร พบในแถบประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา เวียดนาม และไทย มีชื่อสามัญว่า Striped Catfish (กมลพร มาแสวง, 2549) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่ง โดยมีปริมาณที่จับได้ทั้งหมดในปี พ.ศ. 2560 ถึง 19,700 ตัน คิดเป็นมูลค่า 641.4 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2562) ลักษณะของปลาสวายจะมีลำตัวเรียวยาว สีขาวนวล ด้านข้างอวบกลม หน้าทู่ ปากค่อนข้างกว้าง และมีหนวด 2 คู่ สันหลังค่อนข้างตรง มีสีดำหม่น ครีบมีสีเหลืองอ่อน แต่ครีบปลายหาง ครีบหลัง และครีบอกจะมีสีค่อนข้างหม่น ความกว้างและความยาวของส่วนหัวมีอัตราส่วน 1:7.8-8.1 มีก้านอ่อนบริเวณครีบท้อง 8-9 ก้าน (ภาพ 1) ซึ่งต่างจากปลาเทโพและปลาสังกะวาดที่มีก้านอ่อนบริเวณครีบท้องเพียง 6 ก้าน และปลาสวายมีซี่เหงือกมากกว่า 12 ซี่ มักจะอยู่รวมกันเป็นฝูง หรืออยู่ร่วมกับปลาเทโพ (ปรียาภรณ์ เชาวจินวงศ์ และรัชนิบูลย์ ทิพย์เนตร, 2549)



ภาพ 1 ลักษณะของปลาสาวย (*Pangasianodon hypophthalmus*)

ที่มา: ภัทรชัย กฤศทิวานนท์, 2561

ปลาสาวยเป็นปลาเลี้ยงง่าย กินได้ทั้งเนื้อสัตว์และพืช ทำให้มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงทางเศรษฐกิจ เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในบ่อดินและในกระชัง (ภาพ 2) และมีช่วงฤดูผสมอยู่ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม ในธรรมชาติปลาสาวยจะวางไข่ในบริเวณที่มีน้ำท่วม น้ำหลาก การสังเกตความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียจะสังเกตได้ง่ายเมื่อปลาโตเต็มวัย โดยลักษณะของปลาสาวยเพศเมียจะมีลำตัวสีขาวเงิน ท้องอูม กลมนูน พื้นท้องนูน ช่องเพศมีสีแดงเข้ม เมื่ออยู่ในช่วงฤดูวางไข่จะมีไข่สุกเต็มท้อง (ภาพ 3) ซึ่งแตกต่างจากปลาตัวผู้ที่มีหน้าท้องแบนเรียบ ไม่นูน พื้นท้องแข็ง ช่องเพศมีขนาดเล็กและสีอ่อนกว่าเพศเมีย เมื่อใช้มือกดบริเวณท้องจะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมา (ภาพ 3) (ปริยากรณ์ เชาวชินวงศ์ และ รัชนิบูลย์ ทิพย์เนตร, 2549)



ภาพ 2 ปลาสาวยที่เลี้ยงในกระชัง (a), ปลาสาวยที่เลี้ยงในบ่อดิน (b)

ที่มา: อมรเทพ ทองจันทร์ (2556); ภัทรชัย กฤศทิวานนท์



ภาพ 3 ความแตกต่างระหว่างปลาสายเพศผู้ (ชาย) และปลาสายเพศเมีย (ขวา)
ที่มา: ปรียาภรณ์ เศวตชินวงศ์ และ รัชนิบูลย์ ทิพย์เนตร (2549)

2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลา

เทคโนโลยีการเพาะพันธุ์ปลาได้มีการคิดค้นและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยการมีความรู้ความเข้าใจในระบบสืบพันธุ์ของปลาว่ามีลักษณะทางกายวิภาคอย่างไร มีโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์สืบพันธุ์ รวมถึงพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเพาะพันธุ์ปลา ปัจจุบันได้มีการนำความรู้ด้านในด้านต่าง ๆ ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลา เช่น การสังเคราะห์ฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาฉีดกระตุ้นการวางไข่ของปลา การฉีดสารพันธุกรรมหรือโครโมโซมแก่ไข่ปลา เพื่อผลิตลูกปลาที่ทนทานโรคและโตเร็ว และการเก็บรักษาไข่และน้ำเชื้อในระยะเวลาที่นานขึ้น เป็นต้น สิ่งเหล่านี้ก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ปลาเพศเมีย ได้แก่ รังไข่ (Ovary) และระบบสืบพันธุ์ปลาเพศผู้ ได้แก่ อัณฑะ (Testis) (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

รังไข่เป็นอวัยวะของปลาที่ประกอบด้วย ถุงรังไข่ (Ovarian follicle) เป็นจำนวนมาก โดยจะเรียงตัวแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา ถุงรังไข่จะสร้างใหม่เป็นชุด ๆ ตามระยะเวลา มีลักษณะเป็น 2 พู ทอดไปตามยาวของช่องท้องและเชื่อมต่อกับท่อนำไข่ (Oviduct) มีหน้าที่ ๆ สำคัญคือ ผลิตไข่ และฮอร์โมนในการสืบพันธุ์ (Reproductive hormone) (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) ระยะเวลาของเซลล์สืบพันธุ์ภายในรังไข่จะสามารถบอกความถี่ในการวางไข่ของปลาได้ ถ้าในรังไข่มีเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในระยะเดียวกันตลอดทั้งรังไข่ ปลาชนิดนั้นจะวางไข่เพียงครั้งเดียว แต่ถ้าภายในรังไข่

ของปลาที่มีไข่ที่สามารถแบ่งกลุ่มตามระยะการเจริญของไข่ได้น้อย 2 กลุ่ม ปลาชนิดนี้จะสามารถวางไข่ปีละครั้งและมีช่วงฤดูกาลวางไข่ที่สั้นมาก ปลาที่วางไข่ได้ตลอดทั้งปีหรือวางไข่ได้ในระยะเวลายาวนาน เช่น ปลาในเขตเมืองร้อนทั่วไป ภายในรังไข่จะมีเซลล์ไข่ในทุก ๆ ระยะปรากฏอยู่ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) การผลิตไข่ของปลาจะเป็นไปตามฤดูกาล ปลาที่ผสมพันธุ์วางไข่ในหน้าฝนจะเริ่มสร้างไข่ในปลายฤดูหนาวหรือระหว่างฤดูร้อน เมื่อเข้าฤดูฝนไข่จะแก่และวางไข่ในฤดูดังกล่าว ช่วงการเจริญเติบโตของไข่ จะยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับชนิดปลา นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกอีกหลายปัจจัย เช่น แสง อุณหภูมิ คุณสมบัติของน้ำ และความอุดมของอาหารที่มีคุณค่า ภายหลังปลาวางไข่แล้ว รังไข่จะอยู่ในระยะพักไปตลอดจนกว่าจะถึงกำหนดเริ่มเจริญใหม่ สำหรับปลาที่วางไข่ได้ฤดูกาลละหลาย ๆ ครั้ง หรือปีละหลาย ๆ ครั้ง รังไข่จะทำหน้าที่อยู่ตลอดเวลา เพราะไข่ในรังไข่แก่ไม่เท่ากัน ลักษณะของขนาดและรูปร่างของรังไข่จะแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาโดยแม่ปลาที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีรังไข่ที่ใหญ่ขึ้นรวมทั้งไข่ก็จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและจะผลิตฮอร์โมนมาทำให้ไข่แก่เต็มที่พร้อมสำหรับปฏิสนธิกับสเปิร์มได้ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) ซึ่งในปลาสายนั้นแม่ปลา 1 ตัวจะสามารถให้ไข่ได้ 150,000 – 2,000,000 ฟอง โดยขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของแม่ปลาค้วย (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2553)

อันทะ (Testis) อันทะเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์เพศผู้ที่สำคัญ อันทะของปลามีลักษณะเป็นพวยยาว 2 พวย หรือถุงยาว 2 ถุง เรียงติดผนังช่องท้องด้านบนใกล้ไต ทั้ง 2 พวยของปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีท่อน้ำเชื้อ (Sperm duct หรือ Vas deferens) เป็นท่อขนาดเล็กสั้น ๆ ไปตามแนวกึ่งกลางตัวและไปเปิดออกบริเวณช่องเพศ ทำให้สเปิร์มที่สร้างจากลูกอันทะถูกลำเลียงผ่านท่อน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกของร่างกายร่วมกับปัสสาวะ สำหรับปลาบางชนิดจะไม่มีท่อน้ำเชื้อ ทำให้สเปิร์มที่สร้างจากอันทะไหลเข้าสู่ช่องว่างในลำตัวแล้วจึงไหลออกนอกร่างกาย นอกจากนี้อันทะยังมีหน้าที่ในการผลิตฮอร์โมนเพศในระบบสืบพันธุ์ (Steroid hormone) (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

2.3 ลักษณะของสเปิร์มปลา

ลักษณะรูปร่างของสเปิร์ม (Morphology of fish sperm) ของปลาต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ เพราะไม่มีส่วนของอะโครโซม (Acrosome) ยกเว้นในปลาบางชนิดเท่านั้นที่มีอะโครโซม เช่น ปลา Herring ทั้งนี้เป็นเพราะไข่ปลาไม่มีไมโครพิล (Micropyle) ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มอยู่แล้ว สเปิร์มของปลาแต่ละชนิดจะมีรูปร่างแตกต่างกัน แต่ทุกชนิดจะมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนคือ ส่วนหัว (Head) มิดพีซ (Mid-piece) และ ส่วนหาง (Tail) (ภาพ 4) (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

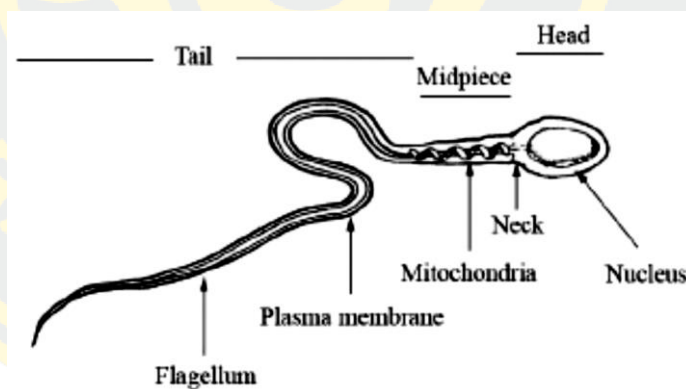
สเปิร์มของปลาประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. ส่วนหัว (Head) มีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา โดยในส่วนหัวของสเปิร์มจะมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) หรือสารพันธุกรรมบรรจุอยู่ ซึ่งใช้ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ สเปิร์มของปลากระดูกแข็งส่วนมากมีลักษณะหัวเป็นรูปทรงกลม (Spherical) หรือ ทรงรี (Ovate หรือ Acorn-shaped) โดยมีขนาดประมาณ 2 - 3 ไมโครเมตร จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าส่วนหัวของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ปลาอุก และปลาทอง มีลักษณะกลม ส่วนสเปิร์มของปลาไนและปลาสวายมีส่วนหัวเป็นรูปไข่

2. ส่วนกลาง (Middle piece) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวบริเวณนี้ ล้อมรอบไปด้วยไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) โดยจะมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงานแก่สเปิร์มใช้สำหรับการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และมีแอกเซียล ฟิลาเมนต์ (Axial filament)

3. ส่วนหาง (Tail) ประกอบไปด้วยไมโครทิวบูล (Microtubule) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวซึ่งเป็นองค์ประกอบของไฟบริล (Fibril) ทำหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนไหว ซึ่งพัฒนาจากแอกเซียล ฟิลาเมนต์

ความยาวสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางยาวประมาณ 40-60 ไมโครเมตร และส่วนใหญ่สเปิร์มของปลามีหางจำนวน 1 หาง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538; วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)



ภาพ 4 ลักษณะรูปร่างของสเปิร์มปลา

ที่มา : Boonthai (2015)

2.4 อุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งถือว่าเป็นวิธีการที่เป็นประโยชน์และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ เพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำให้มีจำนวนมากขึ้น ในยามที่ขาดแคลนพ่อพันธุ์ที่จะใช้ในการผสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้

ในการศึกษาพันธุ์ปลาชนิดต่าง ๆ เพื่อการผสมข้ามชนิด ตลอดจนการตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา (อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559)

มีการกล่าวการศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาในครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1953 โดยหลังจากนั้นได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้ออย่างต่อเนื่อง ทั้งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ และการเก็บรักษาด้วยความเย็น (Tiersch, 2006)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. การเก็บรักษาระยะเวลาสั้น (Short or Chilled Storage) การเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะสั้น จัดเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 - 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (Extender) ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบสั้นขึ้นอยู่กับควบคุมไม่ให้น้ำเชื้อถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ในขณะที่เก็บรักษา เนื่องจากสเปิร์มของปลาจะถูกกระตุ้นด้วยน้ำจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นการเลือกใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเหมาะสม จะทำให้ยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบสั้นให้นานยิ่งขึ้น รวมทั้งเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการผสมเทียมเมื่อได้น้ำเชื้อที่ไม่มีการถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่

2. การเก็บรักษาระยะเวลายาวโดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation) เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ภายในถังไนโตรเจนเหลว (ภาพ 5) การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อทำให้ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์จากกระบวนการแช่แข็ง รวมถึงอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้เกิดความสมดุลต่อเซลล์ ทำให้ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559)

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสนั้น จะต้องมีสารที่ป้องกันอันตรายจากความเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็ง เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, propylene glycol, formamide, methanol, ethylene glycol, หรือ ethanol เป็นต้น (Vuthiphandchai et al., 2009) นอกจากนี้การเจือจางน้ำเชื้อจำเป็นต้องใช้ extender โดยบทบาทของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ คือ การรักษาความสมดุลให้กับตัวสเปิร์ม เป็นแหล่งพลังงานให้กับสเปิร์ม ดังนั้นการเลือกสารละลายเจือจางน้ำเชื้อให้เหมาะสมจำเป็นต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของไอออน และเป็นแหล่งพลังงานที่เพียงพอต่อระยะเวลาในการเก็บรักษา อีกทั้งการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมก็มีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อป้องกันการเคลื่อนไหวของตัวสเปิร์ม (Yang & Tiersch, 2010)



ภาพ 5 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยถังไนโตรเจนเหลว
ที่มา : ชยาภา นิลโกศล

2.5 การแช่แข็งน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นเทคนิคที่สามารถคงสภาพของน้ำเชื้อไว้ได้นาน โดยมีขั้นตอนการเก็บรักษาดังต่อไปนี้

2.5.1 การรวบรวมน้ำเชื้อปลา (Semen collection) โดยจะทำการกวดบริเวณท้องปลาเพื่อพันธุ์เบา ๆ (ภาพ 6) นำน้ำเชื้อที่ได้ใส่ในภาชนะที่แห้งและสะอาด และต้องไม่มีการปนเปื้อนของเมือก อุจจาระ เลือด ปัสสาวะ หรือของเสียอื่น ๆ (อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559)



ภาพ 6 วิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยการกดเบา ๆ บริเวณท้องปลา

ที่มา: ภัทรชัย กฤศทิวานนท์

2.5.2 สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (Extender) น้ำเชื้อที่เก็บได้ต้องนำมาเจือจางกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนนำไปแช่แข็ง และมีค่าออสโมลาริตี (Osmolarity) ที่ใกล้เคียงกับน้ำที่ใช้เลี้ยงสเปิร์ม (Seminal fluid) (สมร พรชิ่งชูวงศ์ และสุพรรณ ขันน้ำเที่ยง, 2553)

2.5.3 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) สารไครโอโพรเทคแทนท์เป็นสารที่ทำหน้าที่ในการป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ เช่น การเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) จากกระบวนการแช่แข็ง (อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559) สารไครโอโพรเทคแทนท์แบ่งเป็น 2 ประเภทตามความสามารถในการทำงานได้แก่ สารประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สามารถซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ จะช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง และการฉีกขาดของเซลล์จากภายใน เช่น glycerol, DMSO, methanol และ ethanol อีกประเภทคือ สารที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์เนื่องจากมีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ แต่จะช่วยป้องกันการทำลายเซลล์จากเกล็ดน้ำแข็งที่เกิดจากกระบวนการแช่แข็ง และมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการเปลี่ยนความดันออสโมซิส (Osmotic pressure) อย่างฉับพลันระหว่างการแช่แข็ง เช่น sucrose (สุกิจ ประทุมชัย และธนรัตน์ จานุกิจ, 2558)

2.5.4 การลดอุณหภูมิ (Freezing) การลดอุณหภูมิเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนแปลงสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง หากลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว เซลล์จะไม่เกิดการสูญเสียน้ำ (Dehydration) ทำให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนสถานะเป็น

ของแข็ง (Intracellular ice crystal) และทำให้เซลล์ถูกตีแตก แต่การลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เซลล์จะมีการสูญเสียน้ำมากเกินไป ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในเซลล์สูงขึ้น เซลล์ถูกทำลายได้เช่นกัน (อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559)

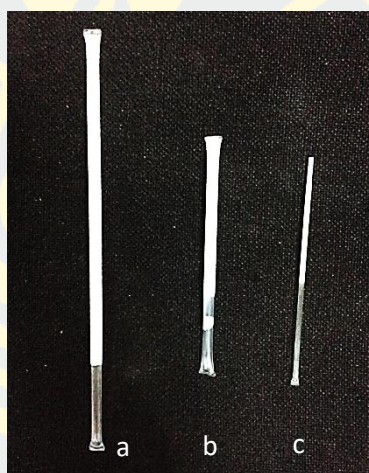
2.5.5 การละลาย (Thawing) การละลายเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีสำคัญต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง อัตราการละลาย (Thawing rate) ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดสมดุระหว่างผลึกน้ำแข็งที่อยู่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งโดยทั่วไปจะทำการละลายที่อุณหภูมิ 30 - 70 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อและปริมาณของน้ำเชื้อ (อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559)

2.5.6 ชนิดและขนาดหลอดบรรจุ โดยทั่วไปแล้วมี 2 แบบ คือ หลอดแก้วและหลอดพลาสติก ในปัจจุบันนิยมใช้หลอดพลาสติกเนื่องจากสามารถปิดผนึกด้วยความร้อนได้ง่าย มีหลายรูปแบบ เช่น หลอดฟาง (Straws), หลอดฉีดยา (Ampoules) และหลอดไครโอ (Cryotubes) ขึ้นอยู่กับความต้องการใช้

หลอดฟาง หรือ plastic straws เป็นหลอดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการใช้แช่แข็งน้ำเชื้อ มีหลากหลายขนาด (0.25 - 5.00 มิลลิลิตร) (ภาพ 7) เนื่องจากหลอดฟางมีลักษณะเป็นหลอดยาวทรงกระบอกและเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับความเย็นในระหว่างการลดอุณหภูมิและความร้อนในระหว่างการละลายได้ดีกว่าหลอดพลาสติกชนิดอื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปมักพบงานวิจัยหลาย ๆ งาน ที่ทำการศึกษากการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 หรือ 0.5 มิลลิลิตร เช่น Boonthai Khaopong, Sangsong, Nimrat, & Vuthiphandchai. (2016b) ที่ทำการศึกษาคผลของการใช้ยาปฏิชีวนะในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ Boonthai et al. ได้ใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ อมรรัตน์ กิระวานิชย์ (2559) ได้ทำการศึกษากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งโดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และหลอดไครโอขนาด 1.8 มิลลิลิตร นอกจากนี้การศึกษากการของ Cabrita et al. (2001) ซึ่งได้ทำการศึกษากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทราต์สายรุ้ง (Rainbow trout) ในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 1.8 และ 5.0 มิลลิลิตร

2.5.7 อุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยทั่วไปแล้ว การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งส่วนใหญ่จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ระยะยาวและยังคงคุณภาพของน้ำเชื้อได้ แต่บางสถานที่หรือฟาร์มที่ทำการเพาะพันธุ์บางแห่งไม่มีอุปกรณ์สำหรับบรรจุไนโตรเจนเหลว จึงมีงานวิจัยหลายแห่งได้ทำการศึกษากการถึงอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง เช่น จากการศึกษาของคณางค์ บูรณะอำนาจ, กรกนก พรหมเทพ, ทศนีย์ ฝ่ายซ้ายคราม, ชินรัตน์ แจ่มแสงฟ้า และก้องเกียรติ ศรีสุวรรณ (2560) ซึ่งได้ทำการศึกษากการทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งในตู้ -80 องศาเซลเซียส โดยพบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196

และ -80 องศาเซลเซียส มีสเปิร์มเคลื่อนที่ 45 – 52.5 เปอร์เซ็นต์ สเปิร์มมีชีวิต 47.5 – 58.5 เปอร์เซ็นต์ สเปิร์มที่มีเยื่อหุ้มเซลล์เป็นปกติ 46.5 – 55.5 เปอร์เซ็นต์ และสเปิร์มที่มีอะโครโซม (Acrosome) สมบูรณ์ 81 - 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ทำให้สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งได้ดีใกล้เคียงกับการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์น้ำ เช่น การศึกษาของ Pullin (1972) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาลิ้นหมา (*Pleuronectes platessa*) ไว้ที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส และ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 315 วัน ซึ่งพบว่า ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์ฟักเท่ากับ 39 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่น้ำเชื้อที่เก็บในอุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ไม่พบการเคลื่อนที่และการปฏิสนธิของสเปิร์ม



ภาพ 7 ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4.00 มิลลิลิตร (a), ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.50 มิลลิลิตร (b), ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร (c)

ที่มา: ชยาภา นิลโกศล

2.6 การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลา

การปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น น้ำที่ปลาอาศัย วิธีการเก็บตัวอย่าง อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ อุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีการแช่แข็ง รวมถึงสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ที่ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่ง Boonthai et al. (2016a) ที่ได้ตรวจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบความเย็น (Psychrophile) ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเชื้อที่

ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ ในแหล่งน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ในครีบบปลาที่อยู่ใกล้บริเวณช่องเพศ รวมถึงแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในไนโตรเจนเหลวที่เก็บอยู่ในถังไนโตรเจน บนพื้นผิวภายนอกของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ และระบบหมุนเวียนอากาศภายในห้องปฏิบัติการ โดยการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อถือได้ว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อลดลง เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ของสเปิร์ม เช่น การสร้างสารที่สามารถเหนี่ยวนำให้สเปิร์มเกิดการ apoptosis หรือส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม (Villegas, Schulz, Soto & Sanchez, 2005) ดังรายงานของ Christensen & Tiersch (1996) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาคอดอเมริกันมีปฏิสัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ โดยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิลดลงแต่ปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับ Koh, Badrul Nizam, Muhammad Abduh, Abol Munafi, & Iehata. (2019) ที่พบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาเวียน (*Tor tambroides*) มีผลต่อคุณภาพของการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* คิดเป็นปริมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boonthai, Khaopong, Sangsong, Vuthiphandchai, & Nimrat. (2016c) ที่ศึกษาผลกระทบจากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *Pseudomonas fluorescens* พบว่า แบคทีเรียส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของสเปิร์ม โดยเฉพาะความกว้างของหาง (Flagellum) ซึ่งทำให้การเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของสเปิร์มลดลง

มีงานวิจัยบางฉบับที่ได้ศึกษาถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลา เช่น Boonthai et al., (2016d) ที่ได้ศึกษาผลของวิธีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 4 วิธี ต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดยพบว่า การใช้สายสวนช่วยในการรีดน้ำเชื้อหลังจากการล้างบริเวณที่ทำกรีดด้วยน้ำเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย ซึ่งสามารถลดปริมาณการแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ได้ดีกว่าวิธีอื่น ๆ ถึง 2 log วีรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2552) ได้ศึกษาถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบในน้ำเชื้อปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) แข่งขัน พบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมีปริมาณลดลงในระหว่างที่เก็บรักษา และ Boonthai et al. (2016b) ได้ทดสอบการใช้ยาปฏิชีวนะในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ซึ่งยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียหลังจากเติมยาปฏิชีวนะ penicillin–streptomycin (PS) Boonthai, Khaopong, Sangsong, Vuthiphandchai, & Nimrat. (2018) พบว่าการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียก่อโรคที่เติมลงในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแข่งขันอาจเป็นสาเหตุต่อการแพร่กระจายของโรคสู่รุ่นลูกของปลาที่ได้จากการผสมเทียม นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง

ผลกระทบจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ลดความสามารถในการปฏิสนธิระหว่างไข่กับสเปิร์มของปลาได้ (Boonthai et al., 2018)

2.7 ยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพ หมายถึงยาที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ ยาต้านจุลชีพแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ยาที่ได้จากธรรมชาติ ยาที่เกิดจากการสังเคราะห์และยาทั้งสังเคราะห์ (พรพรรณ กุ้มานะชัย., 2551) โดยยาปฏิชีวนะต่าง ๆ จะมีข้อบ่งชี้สำหรับใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ต่อการการติดเชื้อแบคทีเรีย (Psimides, 2019)

แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม		แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน			แบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบ	
MRSA	MRSS	<i>Streptococcus</i>	<i>E. coli</i> และ <i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>	ESCAPP ⁺
		เพนิซิลลิน				
		อะม็อกซิซิลลิน				
		ฟลูคลอกซาซิลลิน				
		เซฟไตรซอน				
		คลินดามัยซิน				คลินดามัยซิน
ไรแฟมพิซินและกรดฟูริดิก						
แวนโคมัยซิน, โทโคพลาโนน, โกลิไซลิค และแคปโตมัย						
			ไตรแอมโทพริม			
				ชิโปรฟลอกซาซิน		
				เจนตามัยซิน, โทบรามัยซิน และเอซเทรีโอบแนม		
				มอกซิฟลอกซาซิน		มอกซิฟลอกซาซิน
		เซฟรูอกซิม				
		เซฟไตรอะโซน				

ตารางที่ 1 ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ต่อการการติดเชื้อแบคทีเรีย (Psimides, 2019) (ต่อ)

แบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม		แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน			ESCAPP ⁺	แบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบ	
MRSS	<i>Streptococcus</i>	<i>E. coli</i> และ <i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>			
		เซฟตาซิม					
		เซฟิซิม					
	อะม็อกซิซิลลิน/กรดคลาวานิก					AMX/CLV	
	ไทคาร์ซิดิน/กรดคลาวานิก, ปีปเปอร์ซิดิน/ทาโซแบคแตม						TIC/CLV, PPR/TZB
	อีมิพีแนม ⁺ , มีโรฟิแนม ⁺						
	เออร์ตาพีแนม ⁺						เออร์ตาพีแนม ⁺

หมายเหตุ: ⁺ ESCAPP คือ *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. และ

Morganella morganii

[±] ใช้สำหรับจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์ ESBL ซึ่งส่วนใหญ่มีก่อดต่อยาปฏิชีวนะที่มีวงปีตาแลคแตม (beta-lactam ring)

ยาปฏิชีวนะที่ทำให้สัญลักษณ์ตัวหนาจะออกฤทธิ์ครอบคลุม *Enterococcus faecalis* ซึ่งข้อมูลในตารางนี้จะไม่ครอบคลุมแบคทีเรียจำพวก Atypical bacteria

ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละพื้นที่ โดยขึ้นอยู่กับปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียในพื้นที่นั้น ๆ

โดยทั่วไปสารต้านจุลชีพแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1. กลุ่มที่ฆ่าหรือทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย เรียกกลุ่มนี้ว่า Bactericidal antibiotics โดยทั่วไปมักมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย

2. กลุ่มที่เพียงแต่ยับยั้งการเจริญและการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย เรียกกลุ่มนี้ว่า Bacteriostatic antibiotics มักมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย การทำงานของสารกลุ่มนี้เป็นผลทำให้โฮสต์มีการต่อต้านเชื้อจนทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเข้าทำลายโฮสต์ได้ และเมื่อหยุดการใช้สารในช่วงแรก แบคทีเรียอาจเจริญต่อไปได้อีก แต่กรณีใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงก็อาจฆ่าแบคทีเรียได้ (สายสมร ล้ายอง, 2524)

ยาต้านจุลชีพสามารถแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่

1. ออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

ผนังเซลล์เป็นองค์ประกอบที่อยู่ชั้นนอกสุดของเซลล์ มีสำคัญในการห่อหุ้มรอบเซลล์แบคทีเรียทุกชนิด ยกเว้น มัยโคพลาสมา (Mycoplasma) ทำให้แบคทีเรียมีเซลล์ที่แข็งแรงและคงรูปร่างอยู่ได้ หากกลุ่มนี้ออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เซลล์แตกและตายในที่สุด ยาในกลุ่มนี้มีออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีความซับซ้อนน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ยาจึงซึมผ่านเข้าไปในผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบนั่นเอง หากกลุ่มนี้จัดเป็นยาที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์มากที่สุด เพราะเซลล์ของมนุษย์ไม่มีผนังเซลล์ส่งผลให้ยาแทบจะไม่มีผลอันตรายต่อมนุษย์ ยาต้านจุลชีพที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ กลุ่มเพนิซิลลินและกลุ่มเซฟาโลสปอริน เป็นต้น

2. ออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นองค์ประกอบที่อยู่ถัดเข้ามาจากผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เป็นชั้นที่ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน หน้าที่หลักของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียคือ ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารและไอออนต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล เกลือแร่ต่าง ๆ เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทำงานผิดปกติ ทำให้การผ่านเข้า-ออกของสารต่าง ๆ ผิดไปจากเดิมรวมทั้งเกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด ยาในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นนี้จัดว่าเป็นพิษต่อเซลล์ของมนุษย์ เพราะเซลล์ของมนุษย์ก็มีเยื่อหุ้มเซลล์ ยาจึงมีผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์เช่นเดียวกัน แต่ไม่มีผลมากเท่าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย หากกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลิมิกซิน บี โคลิสติน แอมโฟเทอริซิน บี กรามิซิดิน

3. ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นของแบคทีเรีย

แบคทีเรียทุกชนิดต้องมีกระบวนการสร้างและสลายสารต่าง ๆ ภายในเซลล์เกิดขึ้นตลอดเวลาเพื่อดำรงชีวิตและแบ่งเซลล์ เรียกกระบวนการนี้ว่า "กระบวนการเมแทบอลิซึม" หากกระบวนการนี้ถูกขัดขวางหรือรบกวนจะมีผลให้การเจริญของแบคทีเรียหยุดชะงัก การรบกวนการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น การยับยั้งการผลิตกรดโฟลิก ซึ่งเป็นสารมีบทบาทในการเจริญและการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียไม่สามารถใช้กรดโฟลิกจากภายนอกเซลล์ได้ ต้องสร้างขึ้นเอง ดังนั้นหากหารสังเคราะห์สารชนิดนี้ถูกรบกวนหรือยับยั้งย่อมทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด ยาที่มีฤทธิ์รบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย ได้แก่ กลุ่มซัลโฟนาไมด์ กลุ่มไทรฟามัยซิน, กลุ่มลิปีอาร์มัยซิน, กลุ่มควิโนโลน เป็นต้น (Tortora, Case & Funke, 1992)

4. ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย

ยาด้านจุลชีพกลุ่มนี้มีกลไกทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ และทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและหยุดการแบ่งเซลล์ การสร้างโปรตีนของแบคทีเรียต้องอาศัยไรโบโซมที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งไรโบโซมในเซลล์แบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังนั้นสารด้านจุลชีพในกลุ่มนี้จึงแบ่งการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามตำแหน่งที่ยาไปมีผลต่อการทำงานของไรโบโซม ได้แก่ กลุ่มออกฤทธิ์ที่ไรโบโซมส่วนที่เป็น 30s ได้แก่ กลุ่มเตตราไซคลิก และกลุ่มออกฤทธิ์ที่ไรโบโซมส่วนที่เป็น 50s ได้แก่ กลุ่มคลอแรมเฟนิคอล กลุ่มมะโครไลด์ ยาอื่น ๆ ได้แก่ คลินดามัยซิน และลินโคมัยซินส่วนที่เป็น 50s ได้แก่ กลุ่มคลอแรมเฟนิคอล กลุ่มมะโครไลด์ ยาอื่น ๆ ได้แก่ คลินดามัยซิน และลินโคมัยซิน (Finberg et al., 2004)

5. ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

การแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียต้องมีการจำลองหน่วยพันธุกรรมที่ประกอบไปด้วยกรดนิวคลีอิก สารด้านจุลชีพกลุ่มนี้มีกลไกยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก เช่น ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกลียวดีเอ็นเอคลายตัวเพื่อการจำลองดีเอ็นเอชุดใหม่ในกระบวนการแบ่งเซลล์ เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอได้ จึงไม่สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ ยาในกลุ่มนี้จัดเป็น Bacteriostatic antibiotics เช่น กลุ่มฟลูออโรควิโนโลน และยาชนิดอื่น ๆ เช่น เมโทรนิดาโซล และไรแฟมพิซิน เป็นต้น

ตัวอย่างของสารด้านจุลชีพที่แบ่งประเภทตามโครงสร้าง ได้แก่

1. ยากลุ่มเพนิซิลลิน

ยากลุ่มเพนิซิลลินเป็นกลุ่มของยาที่อยู่ในกลุ่มหลักๆ ที่เรียกกันว่า เบต้า-แลคแตม (β -lactam) มีคุณสมบัติใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ยากลุ่มเพนิซิลลินเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังเป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ตั้งแต่แรกเริ่มมาจนถึงปัจจุบัน ออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะ

แบคทีเรียแกรมบวก โดยยับยั้งการสร้างครอสลิงก์ (Crosslink) ระหว่างสายของเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียอ่อนแอและถูกทำลาย (Brown, 2004) กลุ่มยาเพนิซิลลินสามารถแบ่งชนิดได้ ดังนี้

1.1 อะมิโนเพนิซิลลิน (Aminopenicillins) เป็นยาที่มีโครงสร้างของเบต้าแลคแทม (Beta-Lactam) มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ยกเว้นออกฤทธิ์ยับยั้งกว้างครอบคลุมแบคทีเรียแกรมบวกแทบทุกชนิดและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *E. coli* และ *Haemophilus Influenzae* เป็นต้น ยาที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น อะม็อกซิซิลลิน (Amoxicillin) แอมพิซิลลิน (Ampicillin) ทางการแพทย์มักใช้อะม็อกซิซิลลินในการรักษาโรคติดเชื้อเบื้องต้น โดยเฉพาะผิวหนังหรือระบบทางเดินหายใจ อาการแทรกซ้อนที่พบบ่อยจากยาในกลุ่มนี้ คือ ลำไส้อักเสบ อุจจาระร่วง

1.2 แอนติซูโดโมนอล เพนิซิลลิน (Antipseudomonas penicillins) เป็นยาด้านจุลชีพที่ใช้ได้ผลดีในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน โดยเฉพาะใช้รักษาการติดเชื้อจาก *Pseudomonas* รวมทั้งยังสามารถยับยั้ง *Enterococcus* และ *Klebsiella* ได้ด้วย ยาที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ พิเพอราซิลลิน (Piperacillin) และไทคาร์ซิลลิน (Ticarcillin)

1.3 สารยับยั้งเบต้าแลคแทม (Beta-Lactamase Inhibitors) คือยาที่มีโครงสร้างวงแหวนเบต้าแลคแทมเป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย รวมทั้งมีส่วนผสมของสารที่ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้าแลคแทมเมสที่ผลิตจากแบคทีเรียบางสายพันธุ์ทำให้เกิดอาการคือยา เมื่อนำยาในกลุ่มนี้ใช้ร่วมกับเพนิซิลลินทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของยาดีขึ้น นั่นคือเชื้อดื้อยาน้อยลง ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ อะม็อกซิซิลลินผสมคลาวูลานาท (Clavulanate) พิเพอราลินผสมทาโซแบคแทม (Tazobactam) และแอมพิซิลลินผสมซูลแบคแทม (Sulbactam) เป็นต้น แต่ยาผสมเหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้ผู้ใช้มีอาการอุจจาระร่วงได้ (Brown, 2004)

1.4 เพนิซิลลินที่ได้จากธรรมชาติ (Natural Penicillins) คือยาปฏิชีวนะที่ได้จากการผลิตจากเชื้อราในสกุล *Penicillium* ยกตัวอย่างเช่น *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense* และ *P. griseofulvum* (เอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2555) เป็นยานี้มีส่วนประกอบหลักมาจากโครงสร้างเพนิซิลลิน จี (Penicillin G) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ยกในกลุ่มนี้ ได้แก่ Penicillin G (เพนิซิลลิน จี) Penicillin V (เพนิซิลลิน วี) โพรเคนเพนิซิลลิน (Procaine Penicillin) และเบนซาธิน เพนิซิลลิน จี (Benzathine Penicillin G) ยกเว้นมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่กว้าง แต่มักมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกเพียงอย่างเดียว (Brown, 2004)

1.5 เพนิซิลลินที่ทนการถูกทำลายของเพนิซิลลิเนส (Penicillinase resistant penicillins) แบนที่เรียบางชนิดสามารถผลิตผลิตภัณฑ์เอนไซม์เพนิซิลลิเนสขึ้นมาทำลายวงแหวนเบต้าแลคแทมที่เป็นโครงสร้างหลักของยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ ทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาและการรักษาไม่ได้ผล ยาในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทนต่อเอนไซม์เพนิซิลลิเนส ตัวอย่างเช่น คลอซาคซิลลิน (Cloxacillin) นาฟซิลลิน (Nafcillin) ไดคลอซาคซิลลิน (Dicloxacillin) ออกซาคซิลลิน (Oxacillin) หรือเมธิซิลลิน (Methicillin) (Brown, 2004)

ผลข้างเคียงของยากลุ่มเพนิซิลลิน

ปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (Hypersensitivity reaction) เป็นการปรากฏของอาการต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาการตอบสนองรุนแรง (Anaphylaxis) ไข้ ผื่น ข้อบวม การหายใจไม่สะดวก ภาวะชัก อาการเหล่านี้สามารถพบได้ในทารกแรกคลอดหรือผู้ที่มีการทำงานของไตผิดปกติ อาจพบภาวะอูจาระร่วมด้วย หรือเกิดจากปฏิกิริยากับยาอื่นที่ใช้ร่วมด้วย หรือจากอาหารหรือจากภาวะจากตัวผู้ให้ยาเอง (Brown, 2004)

2. ยากลุ่มเซฟาโลสปอริน

ยากลุ่มเซฟาโลสปอรินเป็นยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายยากลุ่มเพนิซิลลิน จัดอยู่ในกลุ่มซีเฟม (Cephems) ที่ประกอบด้วยวงแหวน 2 วงเชื่อมติดกัน (Hamilton-Miller, 2008) เซฟาโลสปอริน ชนิดแรกคือ Cephalosporin C ถูกค้นพบโดย Giuseppe Brotzu ในปี ค.ศ. 1948 จากเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยตัวยาจะจับกับ Penicillin binding proteins และยับยั้งกระบวนการ Transpeptidation ของการสังเคราะห์ peptidoglycan ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Tipper & Strominger, 1965) ยากลุ่มเซฟาโลสปอรินแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

2.1 ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 1 เป็นยาที่พัฒนาขึ้นจากยาในกลุ่มเพนิซิลลินที่ใช้เป็นต้นแบบ มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เช่น Methicillin-sensitive *S. aureus* และ group A streptococci และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *P. mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. ยาที่จัดอยู่ในรุ่นนี้ เช่น Cephalothin, Cefazolin, Cephadroxil และ Cephalexin เป็นต้น

2.2 ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 2 พัฒนาขึ้นจากยารุ่นแรก มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบมากขึ้น เช่น *Haemophilus influenzae* และ *Enterobacter aerogenes* ยาในรุ่นนี้ ได้แก่ Cefaclor, Cefprozil, Cefamandole, Cefoxitin และ Cefotetan เป็นต้น

2.3 ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3 พัฒนาขึ้นจากยาในรุ่นที่ 2 มีประสิทธิภาพครอบคลุมการกำจัดแบคทีเรียหลายชนิด สามารถผ่านเข้าสมองได้จึงเป็นยาที่แพทย์มักนำมาใช้รักษาอาการ

สมองอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรียต่างๆ เช่น Pneumococci, Meningococci, *H. influenzae* รวมทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม Enterobacteriaceae ได้ดี เช่น *Citrobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *P. mirabilis* ยกเว้น *Enterobacter* ตัวอย่างยาในรุ่นนี้ ได้แก่ Cefotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime, Cefdinir, Cefibuten, Cefditoren และ Cefixime

2.4 ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4 พัฒนาขึ้นจากยารุ่นที่ 3 เป็นยาที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียได้กว้างมากขึ้น มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่ายารุ่นก่อน ๆ ทั้งยังช่วยรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในกรณีที่เชื้อคือยารุ่นที่ 3 ยาในรุ่นนี้ ได้แก่ Cefepime และ Cefpirome

2.5 ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 5 เป็นยารุ่นล่าสุดที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้ออกฤทธิ์กำจัดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบในวงกว้าง และใช้ได้ผลกับแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อต่อยา Methicillin เช่น Methicillin-resistant *S. aureus* ยาในรุ่นนี้ ได้แก่ Ceftaroline และ Ceftobiprole (Hamilton-Miller, 2008; Harrison & Bratcher, 2008; Sader & Jones, 1992)

3. ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้คือตัวยาไปจับกับไรโบโซมส่วนที่เป็น 30s ของแบคทีเรียทำให้เกิดความผิดพลาดในการสังเคราะห์โปรตีน ส่งผลให้แบคทีเรียหยุดการเจริญและตายในที่สุด ยากลุ่มนี้ ได้แก่ อะมิกาซิน (Amikacin) เจนตามิซิน (Gentamicin) กานามัยซิน (Kanamycin) นีโอไมยซิน (Neomycin) เนติลมิซิน (Netilmicin) พารโอมัยซิน (Paromomycin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) และ โตบรามัยซิน (Tobramycin) เป็นต้น (Walt, 2018)

4. แมโครไลด์

ยากลุ่มแมโครไลด์ (Macrolide) เป็นยาปฏิชีวนะที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเดี่ยว ขนาดวงแหวนประมาณ 12 อะตอม ยาในกลุ่มนี้ เช่น อิริโทมัยซิน (Erythromycin) (Walt, 2018)

5. ซัลโฟนาไมด์

ยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamide หรือ Sulphonamide) เป็นยาปฏิชีวนะสังเคราะห์ที่โครงสร้างประกอบด้วยซัลฟานาไมด์ สารในกลุ่มนี้บางชนิดไม่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย เช่น Anticonvulsant sulthiame ส่วนซัลโฟนิลยูเรียและไทอาไซด์ไดยูเรติก เป็นยาตัวใหม่ที่มีพื้นฐานมาจากซัลโฟนาไมด์ที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (More, 2020)

6. ควิโนโลน

ยาในกลุ่มควิโนโลน (Quinolone) เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างในการยับยั้งแบคทีเรีย เป็นกลุ่มยาที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2508 ยาในกลุ่มควิโนโลนออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยยับยั้งการคลายตัวของโครงสร้างดีเอ็นเอของแบคทีเรียในกระบวนการจำลองหน่วยพันธุกรรม ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอได้ จึงไม่สามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้ ยาในกลุ่มนี้ยังสามารถช่วยให้เม็ดเลือดขาวทำงานดีขึ้น ส่งผลให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ (หมอชาวบ้าน, 2529)

สารต้านจุลชีพที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

สารต้านจุลชีพที่ใช้ในการควบคุมโรคสัตว์น้ำในสมัยก่อนนั้น นิยมใช้เกลือ Formalin และ Copper sulfate เป็นต้น ต่อมาในปี พ.ศ. 2548 จึงเริ่มมีการใช้สารต้านจุลชีพในการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์น้ำที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยยาในกลุ่มซัลฟานาไมด์ คือ ซัลฟาเมอราซีน (Sulfamerazine) เป็นสารต้านจุลชีพพวกแรกที่มีการแนะนำให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย และได้ขึ้นทะเบียนในการรักษาโรค Furunculosis ในสัตว์น้ำ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น, 2552)

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 พ.ศ. 2550 ได้ระบุสารต้านจุลชีพที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จำนวน 12 ชนิด แบ่งเป็นตัวยาคือจำนวน 7 ชนิด และตัวยผสมจำนวน 5 ชนิด โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. Amoxicillin

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มคาร์บาเพม 244 คาร์บ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้กว้างขวางทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีขาวนวล ใช้รักษาโรคติดเชื้อของระบบอวัยวะ เช่น ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ผิวหนังและหู เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ Ampicillin แต่แตกต่างจาก Ampicillin ตรงที่มีหมู่ Hydroxyl ที่ Phenyl ring (มักผลิตออกมาในรูปแบบ Trihydrate) จึงดูดซึมได้ดีกว่าเมื่อให้ยาโดยการกิน มีสูตรโมเลกุล $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ และน้ำหนักโมเลกุล 365.4 กรัม/โมล

Withdrawal Time: สำหรับปลา กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 20 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

2. Enrofloxacin

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มคาร์บาเพม 244 คาร์บ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีการดูดซึมดี หลังจากผสมให้สัตว์กิน จากสูตรโครงสร้างมีการ

พัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ให้กว้างขึ้นทั้งต่อเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ เป็นผลึกสีเหลืองอ่อน นอกจากจะมีการเติม Piperazine ring แล้วยังมีการเพิ่มหมู่เอทิล (Ethyl) เข้าที่ Piperazine ring ทำให้ Enrofloxacin มีคุณสมบัติเป็น Lipophilic มากขึ้น คือ สามารถละลายได้ดีในไขมันของร่างกาย ยาจะสามารถเคลื่อนตัวผ่านชั้น Lipoprotein ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็ว จากนั้นตัวยาก็จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 359.4 กรัม/โมล

Withdrawal Time: สำหรับปลากำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 21 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

3. Sarafloxacin

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อีกทั้งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Fluoroquinolone ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งช่วยในการรักษาและควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ปีกที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. มีสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{18}ClF_2N_3O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 421.825 กรัม/โมล

Withdrawal Time: สำหรับปลาและกุ้ง กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 5 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

4. ออกโซลิติก แอซิด

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อีกทั้งเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Quinolone ใช้ต้านแบคทีเรียแกรมลบและใช้ได้กับพวก *S. aerues* ยานี้จะมีการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อปลาได้ดีกว่ายาออกซีเตตราไซคลิน ซึ่งยานี้มีผลข้างเคียงอย่างมากต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้คลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง และปวดท้อง โดยสารนี้จะถูกดูดซึมได้น้อยแต่รวดเร็วในระบบทางเดินอาหาร และถูกขับออกทางปัสสาวะทางน้ำนมและทางอุจจาระบ้าง มีสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{11}NO_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 261.23 กรัม/โมล

Withdrawal Time: ไม่ระบุ

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

5. ออกซีเตตราไซคลิน

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{24}N_2O_9$ และน้ำหนักโมเลกุล 460.434 กรัม/โมล มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองรสขม และละลายน้ำได้จำกัดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.5-6 ภายใต้ อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่ไม่เหมาะสม ยากลุ่มเตตราซัยคลินจะเกิดการสลายตัว โดยการ เกิดทั้ง Degradation และ Rearrangement ของสูตรโครงสร้างทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค นอกจากนี้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (2.0-6.0) ยากลุ่มนี้จะเกิด Epimerization เกิดการสลายตัวอย่าง รวดเร็ว ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูง กลุ่มยาเตตราซัยคลินจะเกิด Isomerization ไปเป็น ไอโซเตตราซัยคลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอเตตราซัยคลินจะเกิดการสลายตัวได้เร็วที่สุด โดย เปลี่ยนเป็นไอโซคลอเตตราซัยคลินทันทีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของยากลุ่มเตตราซัยคลินคือ สามารถรวมตัวกับไอออนของพวกไดวาเลนต์และไตรวาเลนต์เป็น สารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ

ยานี้ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางครอบคลุมแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อ Anaerobic bacteria, Rickettsiae, Chlamydiae, Mycoplasma, Spirochetes และ โพรโตซัวบางชนิด ตัวยาออกฤทธิ์โดยการจับกับสารแมกนีเซียมบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์และมีการรวมตัวไรโบโซมส่วน 30S ภายในเซลล์ มีผลรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์นั้น ๆ ยากลุ่มเตตราซัยคลินเป็น Chelating agents ที่ดี ดังนั้นยากลุ่มนี้สามารถรวมตัวกับ ไอออนชนิดต่าง ๆ เช่น Ca หรือ Mg ในอาหารหรือรวมตัวกับไอออนในน้ำ ทำให้เสื่อมฤทธิ์ได้ง่าย ยากลุ่มเตตราซัยคลินที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำเท่าที่มีรายงานมี 3 ชนิด คือ คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน และเตตราซัยคลิน นิยมให้ยาทางปากไม่ว่าจะผสมอาหารหรือป้อนยาให้กินโดยตรง ยาจะมีการดูดซึมหลังจากที่ยาผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหารและลำไส้ หลังจากดูดซึมแล้วบางส่วน ของยาจะเกิดเมแทบอลิซึม ค่า Bioavailability (ค่าแสดงบริเวณยาที่มีสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้จริง) ของยากลุ่มเตตราซัยคลินมีค่าค่อนข้างต่ำทั้งในปลาและกุ้งกุลาดำเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ รายงานในมนุษย์ ดังนั้นการใช้ยากลุ่มเตตราซัยคลินต้องใช้อย่างระมัดระวังเพื่อหลีกเลี่ยงและเสียเวลามาก

ออกซีเตตราซัยคลินที่ผสมในอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูปหรืออาหารสด พบว่าประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ของยาที่ผสมในอาหารเท่านั้นที่สัตว์น้ำจะได้รับเข้าไป ส่วนที่เหลือของยาบางส่วนก็อาจละลายน้ำและรวมตัวกับสารต่าง ๆ รวมทั้งตะกอนดินในน้ำบริเวณที่มีการเลี้ยงปลา ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในบริเวณดังกล่าว อาจทำให้เชื้อ

เหล่านี้คือยาและได้มีการศึกษาผลของแสงที่มีต่อการสลายตัวของยา จากการศึกษาพบว่าทั้ง อุณหภูมิและแสงสว่างมีผลต่อการสลายตัวของยาออกซิเตตราซัยคลินในน้ำทะเล

Withdrawal Time: สำหรับปลาและกุ้ง กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 21 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: 0.2 ppm ในปลาและกุ้งกุลาดำ

6. Sulfadimethoxine sodium และ Ormethoprim

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

Sulfonamides เป็นยาต้านจุลชีพกลุ่มแรกๆ ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สารเคมีตัวแรกที่มีฤทธิ์คล้ายซัลฟาที่มีชื่อว่า พรอน โดซิล พบในปี พ.ศ. 2478 ยาในกลุ่มนี้มีโครงสร้างหลักเป็น p-Aminobenzene sulfonamide (Sulfanilamide) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ p-Aminobenzoic acid (PABA) ที่แบคทีเรียใช้สังเคราะห์ Folic acid ซัลฟานิลาไมด์เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงและมีคุณสมบัติการกระจายตัวในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ไม่ดี จากการทดลองค้นคว้าหากมีการแทนที่ตำแหน่งของไฮโดรเจนในสูตรโครงสร้างด้วยอนุมูลที่เหมาะสมจะทำให้ได้สารตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติในการละลายในไขมันและการกระจายตัวได้ดีขึ้น ลักษณะของยาซัลฟาเป็นผงสีขาว รสขม เมื่อถูกแสงแดดจะกลายเป็นสีดำ ไม่มีกลิ่น ทนทานต่อความร้อนได้ดี ยาซัลฟาที่ละลายน้ำได้ดีต้องเตรียมอยู่ในรูปของเกลือ

ซัลฟาไดเม็ทโทกซีน (Sulfadimethoxine) และออร์เม็ทโทพริม (Ormetoprim) มีชื่อยาทางการค้าว่า โรเมต-30 จัดอยู่ในกลุ่มยาผสม 28 คำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้น้อยมาก ออกฤทธิ์ต่อจุลชีพโดยยับยั้งการเจริญและการแบ่งเซลล์ ซึ่งมีรายงานว่าใช้ยาโรเมต-30 ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำจะสามารถลดอัตราการตายเนื่องจากเชื้อไวรัสโอไอได้ Sulfadimethoxine มีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ และน้ำหนักโมเลกุล 310.33 กรัม/โมล และ Ormetoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_2$ และน้ำหนักโมเลกุล 274.323 กรัม/โมล

ยาซัลฟาออกฤทธิ์กว้างต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยการยับยั้งการเจริญและการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย (Bacteriostatic effect) โดยไปขัดขวางการสร้างสารเมแทบอลิท์ที่สำคัญของแบคทีเรีย โดยฤทธิ์ยาซัลฟาจะยังไม่เกิดในทันทีหลังรับยา การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียยังคงเกิดขึ้นขณะหนึ่งก่อนที่ยาจะออกฤทธิ์ ยาซัลฟาจะออกฤทธิ์โดยจะไปแทนที่กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ในการรวมตัวกับเอนไซม์ไดไฮโดรโพลิก ซินทีเทส ที่จำเป็นต่อการสร้างกรดโพลีคของแบคทีเรีย ผลก็คือทำให้การเจริญของแบคทีเรียถูกยับยั้งและหยุดการเจริญในที่สุด

กรณีที่สัตว์น้ำมีอาการป่วยอย่างเรื้อรังจะสังเกตได้ว่า การใช้ยาซัลฟารักษาจะไม่ค่อยได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากยาซัลฟาออกฤทธิ์เพียงไปยับยั้งการเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเท่านั้น ร่างกายสัตว์น้ำจำเป็นต้องมีกระบวนการกลืนทำลายเชื้อโรคอย่างมีประสิทธิภาพจึงจะทำให้

ยาซัลฟาได้ผลสูงสุดในการรักษา ดังนั้นยาซัลฟาจึงให้ผลรักษาไม่ดีในสัตว์น้ำที่มีการติดเชื้ออย่างเรื้อรัง จึงเหมาะสมที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์น้ำในระยะเริ่มต้นที่ยังไม่มีอาการเรื้อรัง

การใช้ยาซัลฟาในปัจจุบันมักแนะนำให้ใช้เป็น 2 กรณี คือ 1) ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคลำไส้ โรคขี้ขาว โรคขี้ขาดตอน และ 2) ใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งอายุ 20, 40 และ 60 วัน

Withdrawal Time: สำหรับปลาและกุ้ง กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 42 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

7. Sulfadimethoxine sodium และ Trimethoprim

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

Sulfadimethoxine sodium และ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ใช้ร่วมกันป้องกันโรคติดเชื้อและช่วยขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ Dihydrofolate reductase ที่เปลี่ยน Dihydrofolate เป็น Tetrahydrofolate ของกระบวนการสร้าง Purines นอกจากนี้ยังมีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ Sulfadimethoxine มีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ และน้ำหนักโมเลกุล 310.33 กรัม/โมล และ Trimethoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 290.318 กรัม/โมล

Withdrawal Time: สำหรับปลาและกุ้ง กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 21 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

8. Sulfamonomethoxine และ Trimethoprim

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

Sulfamonomethoxine และ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา รักษาการติดเชื้อจุลชีพในระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินปัสสาวะ Sulfamonomethoxine มีสูตรโมเลกุล $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ และน้ำหนักโมเลกุล 280.30 กรัม/โมล และ Trimethoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 290.318 กรัม/โมล

Withdrawal Time: ไม่ระบุ

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

9. Sulfadiazine และ Trimethoprim

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

Sulfadiazine และ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ใช้ร่วมกันป้องกันโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ และโรคติดเชื้อ

เชื้อทางเดินหายใจ รวมทั้งใช้รักษาโรคท้องเสีย ซึ่งออกฤทธิ์ต่อเชื้อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของแบคทีเรีย Sulfadiazine มีสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ และน้ำหนักโมเลกุล 250.278 กรัม/โมล และ Trimethoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 290.318 กรัม/โมล

Withdrawal Time: ไม่มีระบุในสัตว์น้ำ แต่ระบุเฉพาะในหมู 14 วัน ไก่ 7 วัน และไก่วง 7 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

10. Sulfadimidine และ Trimethoprim

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

Sulfadimidine และ Trimethoprim จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาผสม 28 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยยับยั้งการสร้างกรดโฟลิกและใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อยานี้ เช่น โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง ทางเดินหายใจ และทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น Sulfadimidine มีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ และน้ำหนักโมเลกุล 278.331 กรัม/โมลและ Trimethoprim มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ และน้ำหนักโมเลกุล 290.318 กรัม/โมล

Withdrawal Time: ไม่มีระบุในสัตว์น้ำ แต่ระบุเฉพาะในหมู 15 วัน โคกระบือ 10 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

11. Sulfamonomethoxine Sodium

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

Sulfamonomethoxine Sodium จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ใช้รักษาการติดเชื้อจุลชีวินในระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินปัสสาวะ Sulfamonomethoxine Sodium มีสูตรโมเลกุล $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ และน้ำหนักโมเลกุล 280.303 กรัม/โมล

Withdrawal Time: ไม่ระบุ

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

12. Toltrazuril

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

โทตราซุริล (Toltrazuril) เป็นกลุ่มยาที่ใช้ในการฆ่าโปรโตซัวในระบบทางเดินอาหาร ได้ผลดีกับโปรโตซัวในกลุ่ม Coccidia ยานชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้ในสัตว์บกอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ สำหรับประเทศไทยได้ขึ้นทะเบียนยานชนิดนี้เพื่อใช้ในสัตว์บกและสัตว์น้ำ Toltrazuril มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{14}F_3N_3O_4S$ และน้ำหนักโมเลกุล 425.38 กรัม/โมล

Withdrawal Time: สำหรับปลาและกุ้ง กำหนดระยะเวลาหยุดยาที่ 21 วัน

ค่ามาตรฐานที่กำหนด: ห้ามตรวจพบ

สารต้านจุลชีพที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299 พ.ศ. 2549 ได้ระบุว่าให้อาหารทุกชนิดมีมาตรฐาน โดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนสารเคมีดังต่อไปนี้ ซึ่งมีทั้งหมด 3 ตัว

1. คลอแรมฟินิคอล

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้จากการผลิตของ *Streptomyces venezuelae* ค้นพบในปี ค.ศ. 1947 จากตัวอย่างดินที่ได้จากประเทศเวเนซุเอล่า ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สารนี้มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซับซ้อนมากนัก และสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เป็นสารที่ไม่มีสีและไม่ค่อยละลายน้ำ นอกจากนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 323.132 กรัม/โมล

คลอแรมฟินิคอลจะแพร่กระจายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียและเข้าไปจับกับไรโบโซมส่วน 50S ของแบคทีเรีย ทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่างไรโบโซม 50S และ rRNA ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ Peptidyl transferase กับกรดอะมิโนจาก rRNA จึงไม่เกิดขึ้นเป็นผลทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน

อวัยวะเป้าหมายที่มีความเสี่ยงต่อการใช้ยาคลอแรมฟินิคอลคือไขกระดูก โดยมีผลต่อระบบการผลิตเม็ดเลือด 2 ประการ คือ ทำให้จำนวนเซลล์หรือองค์ประกอบในเลือดลดลง (Pancytopenia) และการตอบสนองของร่างกาย (Idiosyncrasy) อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือด กลไกความเป็นพิษของคลอแรมฟินิคอลต่อไขกระดูกยังไม่เป็นที่ชัดเจน ในรายของผู้ป่วยที่รอดชีวิตจากผลกระทบบของคลอแรมฟินิคอลต่อการเปลี่ยนแปลงในไขกระดูกนี้จะมีอัตราเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) จากผลการศึกษาพบว่าการลดลงของจำนวนเซลล์ที่ผลิตเม็ดเลือดในไขกระดูกขึ้นอยู่กับปริมาณของยาคลอแรมฟินิคอลที่ใช้ ในขณะที่การตอบสนองของร่างกายอันเนื่องมาจากการลดลงของจำนวนเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือดไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณยาคลอแรมฟินิคอลที่ใช้ แต่มีแนวโน้มว่าจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่มีการใช้ยาคลอแรมฟินิคอลติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากนี้คลอแรมฟินิคอลยังมีผลต่อเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงมีการพัฒนาอย่างไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดต่ำกว่าปกติ ผลกระทบบของคลอแรมฟินิคอลต่อเม็ดเลือดแดงจะแปรผันตามปริมาณของคลอแรมฟินิคอลที่ใช้

ค่า MRPL (Minimum Required Performance Limit)

เนื่องจากคลอแรมฟินิโคลเป็นสารที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงได้มีประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร พ.ศ. 2549 โดยกำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 0.30 ppb และต้องพบปริมาณสารปนเปื้อนน้อยกว่าปริมาณที่กำหนดดังกล่าว

2. สารในกระบวนการสร้างและสลายของกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ (Nitrofurans metabolites)

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์คือยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้น นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อภายในลำไส้ และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะของสัตว์จำพวกแพะ แกะ สุกร โค กระบือ เป็ด ไก่และกึ่ง สัตว์ โครงสร้างของสารกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยวงแหวนฟูแรนเกาะ ด้วยไนโตรกรุป เรียกว่า 5--Nitrofuralddehyde มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำ ได้เล็กน้อย สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ฟูราโซลิโดน (Furazolidone) ฟูรัลทาโดน (Furaltadone) ไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) และไนโตรฟูรานโทอิน (Nitrofurantoin) แต่จากผลการศึกษาพบว่า สารกลุ่มนี้มีแนวโน้มเป็นสารก่อมะเร็งและทำให้เกิด การกลายพันธุ์ในสัตว์ถ้าได้รับการบริโภคในระยะเวลาาน สารกลุ่มนี้จึงถูกห้ามใช้กับสัตว์ที่เลี้ยง ไว้เพื่อเป็นอาหารในหลายประเทศ เช่น อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ บังคลาเทศ และกลุ่มสหภาพยุโรป

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ในรูปยาตั้งต้น (Parent drugs) จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสัตว์ กลายเป็นสารเมแทบอลิท์ จะจับตัวตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เรียกว่า Tissue-bound metabolites หรือ Protein-bound metabolites ซึ่งมีความคงตัวกว่ายาตั้งต้นและจะตกค้างในเนื้อเยื่อของสัตว์ได้นาน หลายสัปดาห์ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์จึงอาศัยพื้นฐานการตรวจวัดสารเมแทบอลิท์ของยาตั้งต้น ซึ่งสารเมแทบอลิท์ของฟูราโซลิโดน ฟูรัลทาโดน ไนโตรฟูราโซนและ ไนโตรฟูรานโทอิน คือ 3-Amino-2-oxazolididone (AOZ), 3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-Aminohydantoin (AHD) และ Semicarbazide (SEM) ตามลำดับ

สารกลุ่มไนโตรฟูแรนส์เป็นยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้น มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ไม่มี กลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำได้เล็กน้อย เป็นสารที่มีอายุสั้นเมื่อแพร่กระจายสู่ร่างกายสัตว์ในเวลาไม่กี่ ชั่วโมง โดยจะเปลี่ยนรูปไปเป็น Tissue-bound residue ซึ่งสะสมในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายสัตว์

สูตรโมเลกุลของ Nitrofurantoin คือ $C_8H_6N_4O_5$, Nitrofurazone $C_6H_6N_4O_4$ Furazolidone $C_8H_7N_3O_5$ และ Furaltadone $C_{13}H_{16}N_4O_6$ โดยมีน้ำหนัก โมเลกุลของ Nitrofurantoin 238.16

กรัม/โมล, Nitrofurazone 198.14 กรัม/โมล, Furazolidone 225.16 กรัม/โมล และ Furaltadone 324.3 กรัม/โมล

ค่า MRPL (Minimum Required Performance Limit)

เนื่องจากไนโตรฟิวแรนส์เป็นสารที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงได้มีการประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร พ.ศ. 2549 โดยกำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนได้อย่างน้อยต่ำถึงระดับ 0.30 และ 1.0 ppb ตามลำดับ กล่าวคือ AOZ และ AMOZ ที่ระดับ 0.30 ppb และ AHD และ SEM ที่ระดับ 1.0 ppb และต้องพบปริมาณสารปนเปื้อนน้อยกว่าปริมาณที่กำหนดดังกล่าว

3. มาลาไคต์ กรีน (Malachite green) และเกลือของสาร และสารในกระบวนการสร้างและสลาย (Malachite green and leuco-malachite green)

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์

สารนี้มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และยังการเจริญของเชื้อก่อโรค ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ แต่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ การออกฤทธิ์เริ่มจากการเข้าไปรวมกับองค์ประกอบภายในเซลล์ได้เป็น โครงสร้างเชิงซ้อนที่ไม่แตกตัว ทำให้ขัดขวางขบวนการทางชีววิทยาที่สำคัญของเซลล์ ในหลายประเทศได้พยายามจำกัดการใช้มาลาไคท์กรีนในสัตว์น้ำ เนื่องจากพบว่ามาลาไคท์กรีนเป็นเคมีภัณฑ์ที่มีพิษสูง มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งและมีผลต่อโครโมโซมของเซลล์ แต่ในบางประเทศใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากโปรโตซัวในสัตว์น้ำ โดยแนะนำให้ใช้ในขนาด 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการนำมาใช้ร่วมกับ Formalin ในการรักษาโรคจุดขาว นอกจากนี้อนุญาตให้ใช้ได้เฉพาะในปลาสวยงามเท่านั้น

สารนี้อยู่ในกลุ่มสี่ข้อมมีชื่อทางเคมี คือ 4R (Dimethylamine)-phenyl-benzylidene-2, 5 cyclohexa-dinelylidine dimethylammonium chloride มี สูตร โม เล กุล $C_{23}H_{25}N_2Cl$ และ Leuco-malachite green $C_{23}H_{26}N_2$ ทั้งนี้น้ำหนักโมเลกุลของ Malachite green 365 กรัม/โมล และ Leuco-malachite green 330.47 กรัม/โมล

การนำมาใช้ประโยชน์ นำมาใช้เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราและปรสิตเซลล์เดียว โดยทั่วไปจะใช้กันในโรงเพาะฟักในประเทศเขตที่มีอุณหภูมิค่อนข้างเย็น สำหรับในประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนจึงไม่ค่อยนิยมใช้ อีกทั้งราคาของยาในกลุ่มนี้มีราคาแพง ยาในกลุ่มนี้มีช่วงเวลาการสลายตัว ซึ่งหากนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงก็สามารถควบคุมช่วงเวลาการสลายตัวของยาให้หมดไป ก่อนจับปลาขายสู่ท้องตลาด ความเป็นพิษที่รุนแรงทำให้การใช้ Malachite green จำกัดอยู่ในโรงเพาะฟักเท่านั้น และเกษตรกรบางส่วนก็เปลี่ยนมาใช้สารป้องกันเชื้อรากลุ่มอื่นแทน

เช่น ไตรฟูราลิน เป็นต้น สำหรับข้อมูลความเป็นพิษพบว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดกลายพันธุ์ (Mutagen) โดยทำให้ไข่ของปลาที่แช่ด้วยสารชนิดนี้มีการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนอย่างไม่สมบูรณ์ รวมทั้งเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) ในสัตว์ทดลอง มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำสูงมาก โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1-2 ppm ก็จะทำให้ปลาน้ำจืดตายได้ในเวลา 1 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในกุ้งทะเล

ค่า MRPL (Minimum Required Performance Limit)

เนื่องจาก Malachite green และ Leuco-malachite green เป็นสารที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงได้มีประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์เงื่อนไข และวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารเคมีบางชนิดในอาหาร พ.ศ. 2549 โดยกำหนดว่าจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถในการตรวจพบปริมาณสารปนเปื้อนได้อย่างน้อยค่าถึงระดับ 2.0 พีพีบี และต้องพบปริมาณสารปนเปื้อนน้อยกว่าปริมาณที่กำหนดดังกล่าว

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รพีพรรณ เอื้อเวชนิกุล, ปาริฉัตร สุขโต และศศิธร คณะรัตน (2537) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ตามปกติแล้วน้ำเชื้อแช่แข็งควรมีปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียน้อยที่สุดเพื่อป้องกันการติดเชื้อ จากการตรวจสอบน้ำเชื้อสดของโค ณ ศูนย์ผสมเทียมปทุมธานีจำนวน 241 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียเฉลี่ยกับ $753,112 \pm 75,600$ CFU/mL มีค่าพิสัยเท่ากับ 1,000 – 4,840,000 CFU/mL และน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ณ ศูนย์ผสมเทียมปทุมธานีจำนวน 145 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียเฉลี่ย $40,972 \pm 7,400$ CFU/mL มีค่าพิสัยต่ำกว่า 1,000 – 58,500 CFU/mL โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณการปนเปื้อนในน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ตรวจพบอยู่ในช่วงของค่าเฉลี่ยที่องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1981 และที่สถาบัน Office International de Epizooties รายงานไว้ในปี ค.ศ. 1984 คือ 10,000 – 60,000 CFU/mL

อนงกรณ์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2539) ได้ทำการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl และ C-F HBSS ก่อนนำไปผสมกับสาร DMSO ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ทำการลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่ -10, -20 และ -30 องศาเซลเซียสต่ออนาที) และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 50 หรือ 70 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิกับไข่ปลาอุกอุย โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกันระหว่างน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์

NaCl, C-F HBSS และอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง แต่อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 มีผลต่อการเคลื่อนที่และการปฏิสนธิของสเปิร์ม โดยการลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -10 องศาเซลเซียสต่อนาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการปฏิสนธิสูงที่สุด ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของสาร DMSO พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน

Bielanski, Bergeron, Lau & Devenish (2003) ได้รายงานถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อและตัวอ่อนแช่แข็งของมนุษย์ที่อยู่ในหลอดที่ปิดสนิทและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 6 – 35 ปี ซึ่งพบแบคทีเรีย 32 ชนิด และเชื้อรา 1 ชนิด จากตัวอย่างที่ไนโตรเจนเหลว น้ำเชื้อแช่แข็งและตัวอ่อนแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวทางการค้าจำนวน 8 ถัง และถังไนโตรเจนของศูนย์วิจัยจำนวน 8 ถัง โดยแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Escherichia coli* จัดเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุดจากตัวอย่างและเป็นสาเหตุให้การปฏิสนธิกับไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนในหลอดแก้วลดลง จากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Pulsed field gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่าไม่มีการปนเปื้อนข้ามระหว่างเซลล์สืบพันธุ์กับไนโตรเจนเหลวของแบคทีเรียชนิดนี้ อีกทั้งยังไม่พบการถ่ายทอดไวรัส Bovine viral diarrhea virus (BVDV) และ Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) จากตัวอย่างน้ำเชื้อและตัวอ่อนที่ติดเชื้อไปสู่เซลล์สืบพันธุ์ปราศจากเชื้อที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเดียวกัน

Nimrat, Bart, Keatsaksit & Vuthiphandchai (2008) ได้ศึกษาถึงแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในถุงน้ำเชื้อกึ่งกลาดำแช่แข็งที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 210 วัน พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ถึง $2.1 \pm 0.4 \times 10^4$ CFU/g (95.5 เปอร์เซ็นต์) และ $18.7 \pm 4.1 \times 10^3$ CFU/g (93.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 30 วัน ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาได้ 1 ชั่วโมง ($1.11 \pm 5.9 \times 10^5$ CFU/g ลดลง 62.8% เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อสด ($96.4 \pm 1.8\%$) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) กับน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง 30 และ 60 วัน (94.2 ± 2.1 , 89.8 ± 3.5 และ 86.7 ± 3.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามการมีชีวิตของสเปิร์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) หลังจากเก็บรักษานาน 90 วัน และพบแบคทีเรีย 23 ชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในถุงน้ำเชื้อสดและถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง โดย *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Vibrio* spp., *Kocuria varians*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Burkholderia cepacia* พบในถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษานานกว่า 90 หรือ 120 วัน ในขณะที่

Staphylococcus ที่ไม่ใช่ *S. aureus*, *Micrococcus* spp., *Proteus* spp., *Corynebacterium* spp., *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus licheniformis* และ *Pseudomonas* spp. ตรวจพบในถุงน้ำเชื้อได้ถึงระยะเวลาที่เก็บรักษา 210 วัน

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ Bart (2551) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกด้วยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อปลาบึกด้วย สารละลาย HBSS และ DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) โดยพบว่าน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็ง นาน 2 เดือน ในอัตราส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ:สารละลาย) มีเปอร์เซ็นต์การผสมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 25.65 ± 9.64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งนาน 2 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดคือ 45.26 ± 5.99 เปอร์เซ็นต์ น้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกที่เก็บไว้นาน 1 ปี ในอัตรา 1:1 (น้ำเชื้อ:สารละลาย) มีเปอร์เซ็นต์การผสมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 76.6 ± 3.5 เปอร์เซ็นต์

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2552) ได้ศึกษาถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทปทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบในน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็ง โดยพบแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) หลังจากทำการลดอุณหภูมิ แต่เมื่อทำการเก็บรักษา ณ เวลาการเก็บรักษาวันที่ 30 จนถึงวันที่ 90 ปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทปทั้งหมดที่ตรวจพบ ได้แก่ *Staphylococcus non-aureus*, *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Flavobacterium* spp. และ *Corynebacterium* spp. ส่วนชนิดของแบคทีเรียแกรมลบที่ตรวจพบ ได้แก่ *Flavobacterium* spp., *Aeromonas achromogenes*, *Aeromonas salmonicida* และ *Klebsiella* spp.

Omitogun et al. (2010) ได้รายงานถึงการปรับปรุงการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาบึกเทศทั้งแบบระยะสั้นที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส และแบบระยะยาว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (ไนโตรเจนเหลว) เพื่อตอบสนองตามความต้องการปลาบึกเทศที่เพิ่มมากขึ้นในแหล่งเพาะเลี้ยงของประเทศไนจีเรีย โดยในการเก็บรักษาแบบระยะสั้นนั้นจะใช้ไครโอโพรเทคแทนต์แตกต่างกัน ได้แก่ 10 เปอร์เซ็นต์ methanol glycerol, DMSO กับ 15 เปอร์เซ็นต์ non-permeating cryoprotectant (skim milk) และ 75 เปอร์เซ็นต์ phosphate-buffered saline (PBS) จากการเก็บรักษาตั้งแต่วันที่ 1 - 28 พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ใช้สาร glycerol และ DMSO มีค่าไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่ในชุดการทดลองที่ใช้สาร methanol พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งในชุดการทดลองที่ใช้สาร DMSO นั้นมีเปอร์เซ็นต์การฟักไข่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในขั้นตอนการละลาย 2 แบบ ได้แก่ ทำการละลายตัวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 เดือน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิอยู่ที่ 0 - 6.25 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่เก็บรักษานาน 2 เดือน ทำการละลายที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่คิดว่า (94 เปอร์เซ็นต์) การใช้สาร DMSO และส่วนประกอบอื่น ๆ ในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งนั้นจะให้ผลดีกว่าการใช้ methanol หรือ glycerol อย่างไรก็ตามการใช้ glycerol ในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้อยที่สุด ($P < 0.05$) ดังนั้นการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของน้ำเชื้อปลาดุกเทศนั้นมีผลดีในระดับอุตสาหกรรมปลาในไนจีเรีย

อมรรัตน์ กิระวานิชย์, สุบัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2560) ได้ทำการศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศเพศผู้ด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยใช้ แผ่นอลูมิเนียม แผ่นสังกะสี และกระดาษฟอยด์ มาหุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาวะต่าง ๆ พบว่า การใช้กระดาษฟอยด์ ห่อหุ้มหลอดเก็บรักษาน้ำเชื้อและลดอุณหภูมิแช่แข็งนาน 10 นาที ในน้ำแข็งแห้ง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยที่ 77 ± 1.26 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งนาน 28 วัน มีคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างจากการเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) รวมถึงการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างกันไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม

Boonthai et al. (2016a) ได้ทำการตรวจสอบแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการและสารต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของน้ำเชื้อปลาดุกเทศเพศผู้ ผลการศึกษาพบว่า *Aeromonas punctata* subsp. *caviae* จะถูกพบมากที่สุด ในบริเวณครีbspawn ท้าย ถังมือยาง และน้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ ส่วน *Bacillus safensis* และ *Bacillus* sp. มักถูกพบในถังเก็บไนโตรเจนเหลว และ *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *P. fluorescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคน้ำปลาเป็นสายพันธุ์ที่ถูกคัดแยกออกจากตัวอย่างที่เป็นแหล่งที่มาจากสัตว์ทุกตัวอย่าง นั่นคือ จากส่วนครีbspawn ท้าย น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงและน้ำเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระและปัสสาวะ

Boonthai et al. (2016d) ได้ทำการพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อ โดยทำการศึกษาถึงวิธีการเก็บน้ำเชื้อ 4 วิธี ได้แก่ (1) การรีดน้ำเชื้อด้วยมือโดยไม่มีการล้างบริเวณที่ทำกรีดด้วยน้ำ (2) การรีดน้ำเชื้อด้วยมือหลังจากที่ทำกรีดล้างบริเวณที่ทำกรีดด้วยน้ำ (3) การใช้สายสวนช่วยในการรีดน้ำเชื้อโดยไม่มีการล้างบริเวณที่ทำกรีดด้วยน้ำ และ (4) การใช้สายสวนช่วยในการรีดน้ำเชื้อหลังจากการล้างบริเวณที่ทำกรีดด้วยน้ำต่อปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อของปลาดุกเทศเพศผู้ที่แช่แข็งในขณะที่ทำให้ละลาย ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่ 4 เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย โดยพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* น้อยกว่าวิธีอื่นถึง 2 log รวมทั้งวิธีนี้สามารถ

กำจัด *Flavobacterium aquatile*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Ko. varians*
และ *Aeromonas media* ในน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาวที่ทำการแช่แข็ง



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์
2. ถังน้ำแข็ง
3. หลอดฟาง (French straw) 0.5 มิลลิลิตร (IMV International Corp., Minneapolis, MN, USA)
4. Macrotube 2.0 มิลลิลิตร (140 mm length, Minitube International, Tiefenbach, Germany)
5. Macrotube 4.0 มิลลิลิตร (240 mm length, Minitube International, Tiefenbach, Germany)
6. ขวดเพาะเลี้ยง (Tissue culture flask) (50 ml, Greiner, Gloucestershire, UK)
7. Micropipette (Pipetman[®] Gilson, P200L, Middleton, WI, USA)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. คีมคีบ
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo GmbH, MS204TS, Greifensee, Switzerland)
11. ไม้บรรทัด
12. กล่องโฟม (Styroform box) ขนาด 22x33.5x27 เซนติเมตร
13. ชั้นวางสแตนเลส
14. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (Worthington, 35LDB, Taylor Wharton, Theodore, Alabama, USA)
15. Hot plate (IKA[®], C-MAG HS 7 S000, Staufen, Germany)
16. K-type thermocouple probe thermometer (HI 91530K, Hanna Instruments Inc., Woonsocket, Rhode Islands, USA)
17. หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิลิตร
18. โถสแตนเลสขนาด 2 ลิตร

สารเคมี

1. Calaium Free Hank's Balance Salt (Ca-free HBSS) Solution
2. สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant agent: CPA) Dimethyl sulphoxide (DMSO; Merck, KGaA, Billerica, MA, USA) ความเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์
3. ไนโตรเจนเหลว
4. น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์
5. Gonadotropin-releasing hormone analogue (Suprefact[®] nasal, Sanofi Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany)
6. Dopamine antagonist (Motilium-M, Janssen-Cilag Ltd, Bangkok, Thailand)
7. น้ำมันกานพลู

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate Count Agar (PCA; Difco, Sparks, MD, USA)
2. API Kit (API[®], BioMérieux, S. A., Marcy l'Etoile, France)
3. Trypticase Soy Agar (TSA; BD/Difco, Sparks, MD, USA)
4. Mueller Hinton Agar (MHA; BD/Difco, Sparks, MD, USA)

สารปฏิชีวนะในแผ่นยามาตรฐาน (OXOID, Oxoid Ltd, Basingtoke, UK)

1. Penicillin G	10	ยูนิท
2. Piperacillin	100	ไมโครกรัม
3. Piperacillin-tazobactam	100/10	ไมโครกรัม
4. Meropenem	10	ไมโครกรัม
5. Amikacin	30	ไมโครกรัม
6. Gentamicin	10	ไมโครกรัม
7. Tobramycin	10	ไมโครกรัม
8. Azithromycin	15	ไมโครกรัม
9. erythromycin	15	ไมโครกรัม
10. Tetracycline	30	ไมโครกรัม
11. Ciprofloxacin	5	ไมโครกรัม
12. Norfloxacin	10	ไมโครกรัม

13.Ofloxacin	5	ไมโครกรัม
14.Nitrofurantoin	300	ไมโครกรัม
15.Clindamycin	2	ไมโครกรัม
16.Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75	ไมโครกรัม
17.Chloramphenicol	30	ไมโครกรัม
18.Cefepime	30	ไมโครกรัม
19.Ceftazidime	30	ไมโครกรัม
20.Aztreonam	30	ไมโครกรัม

วิธีการวิจัย

การทดลองในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้คือ

1. การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายที่เก็บรักษาในระยะสั้น
2. การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่เก็บรักษาในระยะยาว
3. การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 90 วัน
4. การตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง

การคัดเลือกพ่อพันธุ์และการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

ทำการทดลองในฤดูผสมพันธุ์ของปลาสวาย (เมษายน – ตุลาคม) โดยคัดเลือกพ่อพันธุ์ปลาสวายจากบ่อดินของฟาร์มเอกชนในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา พ่อพันธุ์ต้องมีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์ มีอายุประมาณ 2 - 2.5 ปี น้ำหนักตัวประมาณ 3 - 4 กิโลกรัม ทำการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ GnRHa (Suprefact[®] nasal, Sanofi Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Germany) ในอัตราส่วน 30 กรัมต่อน้ำหนักตัวปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone (Motilium-M, Janssen-Cilag Ltd, Bangkok, Thailand) ในอัตรา 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวปลา 1 กิโลกรัม ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 6 - 8 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อตามวิธีของ Kwantong & Bart (2003)

หลังจากนั้นทำการวางยาสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลู (Clove oil) ที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำฟ้ามารีดตัวปลาให้แห้งก่อนทำการรีดน้ำเชื้อใส่ในจานแก้วที่แห้งและสะอาด

โดยการกดเบา ๆ ที่ห้องปลาจากนั้นนำน้ำเชื้อ (น้ำเชื้อสด) ที่ได้มาเก็บไว้บนน้ำแข็ง น้ำเชื้อที่ปนเปื้อน อุจจาระและเลือดของปลาจะไม่นำมาทดสอบ

การทดลองที่ 1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสายที่ เก็บรักษาในระยะสั้น

1.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็ง (ดัดแปลงวิธีการจาก Cabrita et al., (2001))
 เจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อสดด้วยสารละลาย Ca-free HBSS ในอัตราส่วน 1:3 ผสมให้เข้ากันใน ภาชนะที่ปิดสนิท หลังจากนั้นเติมสารละลาย 18 เปอร์เซนต์ DMSO ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนจะนำไป หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ในปริมาณ 300 ไมโครลิตร, 2 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิดปลายหลอดบรรจุด้วยความร้อนให้สนิท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อให้สารโคโอโปรเทคซึมเข้าเซลล์สเปิร์ม

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร วางเหนือในโตรเจนเหลว 6, 3 และ 3 เซนติเมตร ในกล่องโฟมขนาด 22 x 33.5 x 27 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15, 10 และ 10 นาที ตามลำดับ เพื่อทำการแช่แข็งตัวอย่างเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่แช่แข็งแล้วไปเก็บรักษาในถัง ในโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน (ดังภาพ 8)

1.2 วิธีการตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสาย (ดัดแปลงจาก Boonthai et al., 2016d)

นำตัวอย่างน้ำเชื้อ (น้ำเชื้อสด/น้ำเชื้อเจือจางด้วยสารละลาย Ca-free HBSS/น้ำเชื้อเจือจาง ด้วยสารละลาย Ca-free HBSS และ DMSO/น้ำเชื้อในหลอดบรรจุแต่ละขนาดก่อนการแช่แข็ง/น้ำเชื้อ ในหลอดบรรจุแต่ละขนาดหลังการแช่แข็ง) มาทำการละลายด้วยน้ำร้อน โดยหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิเมตร ละลายในน้ำร้อนอุณหภูมิ 70, 80 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5, 15 และ 18 วินาที ตามลำดับ จากนั้นเปิดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเจือจาง 10 เท่า ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} จากนั้นนำมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร Plate Count Agar (PCA) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรีย กลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด ก่อนจะนำไปบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (CFU/mL) และทำการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit (API[®], BioMérieux S. A., Marcy l'Etoile, France) ดังภาพ 9

นำตัวอย่างน้ำเชื้อมาเจือจางน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:3 จะได้เป็นสารละลายน้ำเชื้อ



เจือจางสารละลายน้ำเชื้อด้วย 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO ในอัตราส่วน 1:1



ปิเปตตัวอย่างน้ำเชื้อบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.3, 2 และ 2 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งเป็นเวลา 10 นาที

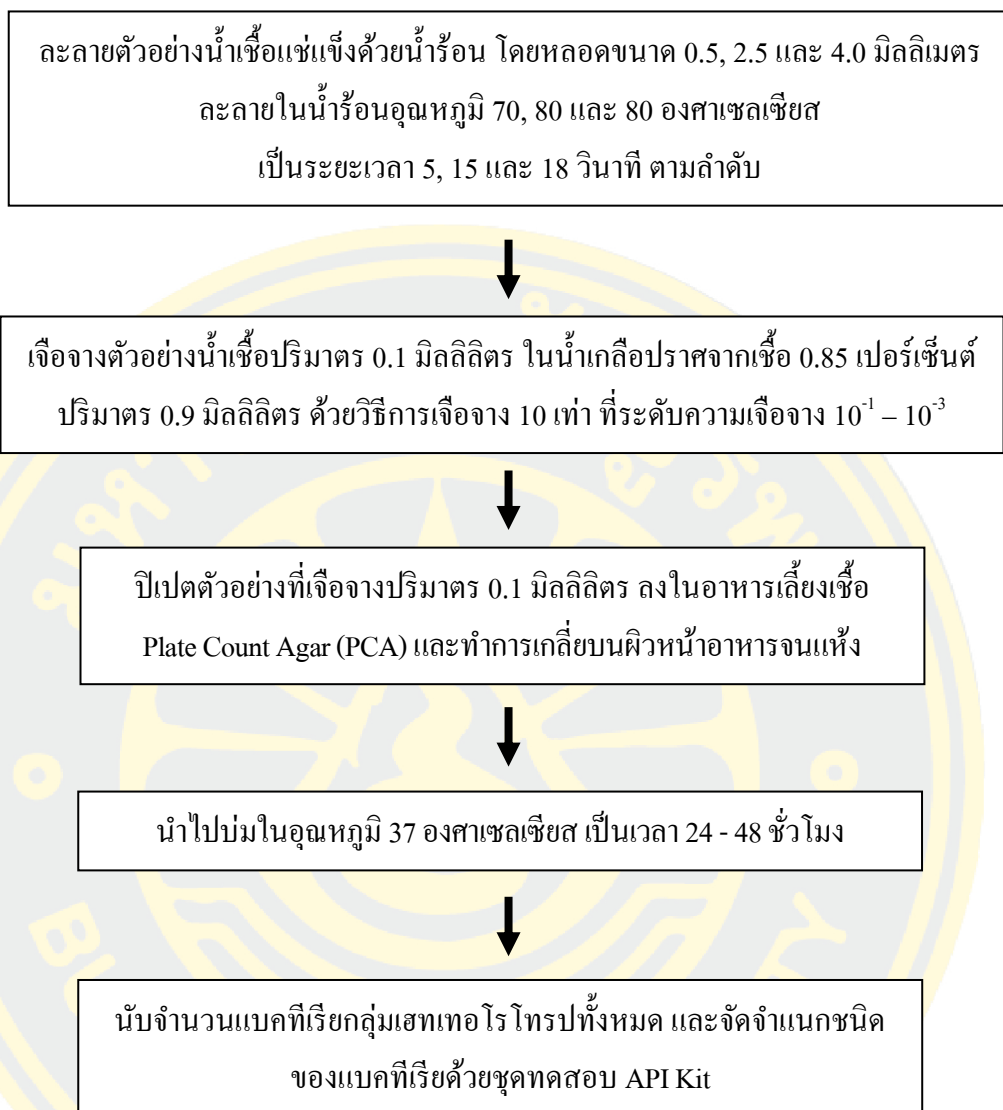


ลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม โดยลดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิที่ระดับ 6, 3 และ 3 เซนติเมตร เนื้อหน้าผิวในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15, 10 และ 10 นาที ตามลำดับ



นำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 วัน

ภาพ 8 แผนภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทรายอย่างง่ายด้วยไอไนโตรเจนเหลวและการเก็บรักษา



ภาพ 9 แผนภาพการตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรอปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำแข็งพลาสติก

1.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit (API[®], BioMérieux S. A., Marcy l' Etoile, France)


ทำการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แยกได้ ได้แก่ การย้อมสีแกรม การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test) จากนั้นนำแบคทีเรียไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่นด้วยชุดทดสอบ API Kit ตามคู่มือของชุดทดสอบและผลการทดสอบแบคทีเรียเบื้องต้น ได้แก่ API 20NE, API 20E, API Staph และ API 50CH โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยเซลล์ โดย


- ชุดทดสอบ API 20NE และ API 20E ปรับความขุ่นสารแขวนลอยเซลล์ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ที่ปราศจากเชื้อที่ความขุ่น 0.5 McFarland Standard


- ชุดทดสอบ API Staph ปรับความขุ่นสารแขวนลอยเซลล์ใน API Staph medium ที่ความขุ่น 0.5 McFarland Standard

- ชุดทดสอบ API 50CH ปรับความขุ่นสารแขวนลอยเซลล์ใน API 50 CHL Medium ที่ความขุ่น 2.0 McFarland Standard

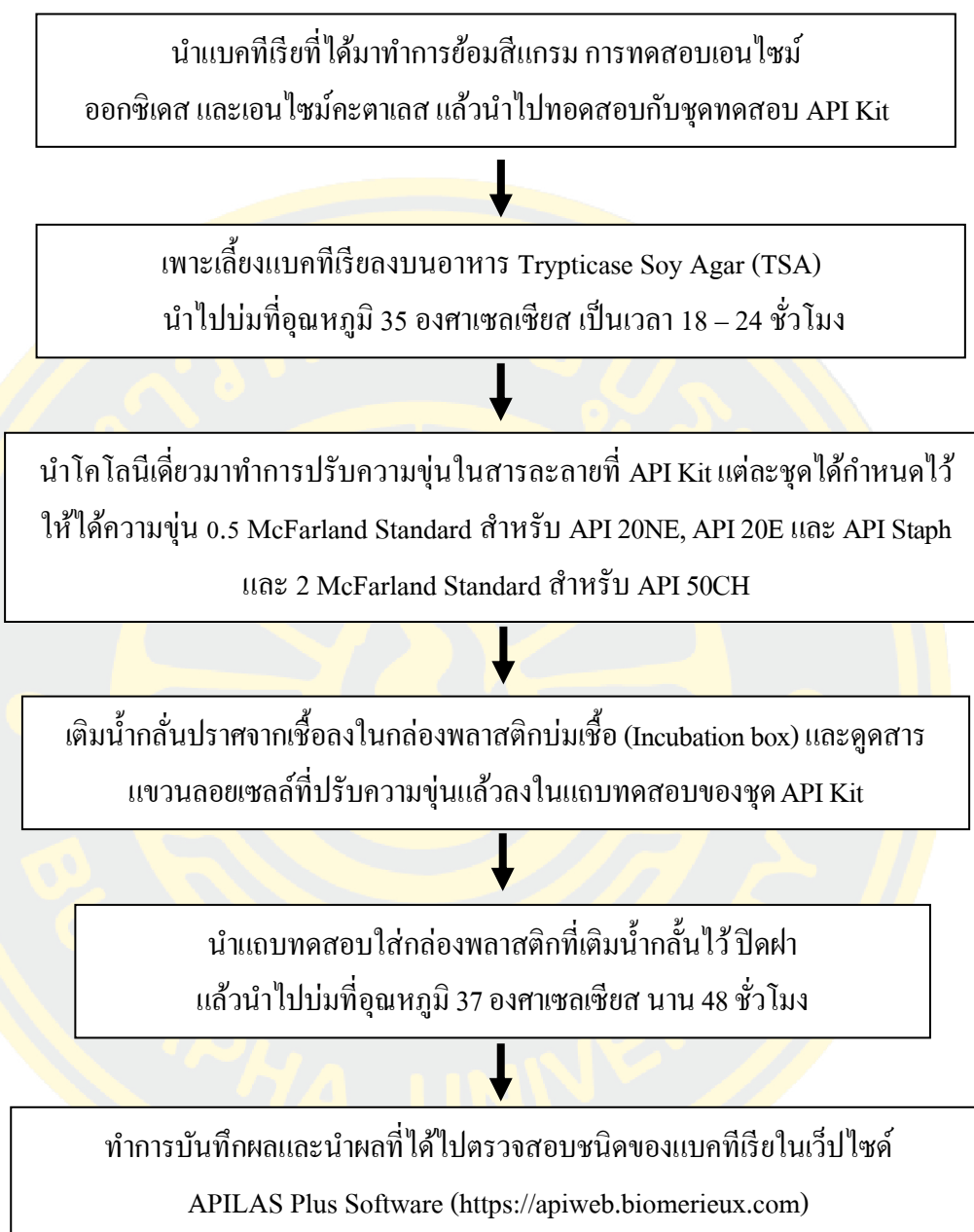
จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในกล่องพลาสติกบ่มเชื้อ (Incubation box) ก่อนดูดสารแขวนลอยเซลล์ลงในแถบทดสอบของชุด API Kit โดยในหลอดทดสอบของชุด API จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนล่าง (Tube) และส่วนบน (Cupule) และทำการเติมสารแขวนลอยเซลล์ลงในหลอดทดสอบตามสัญลักษณ์ดังนี้

- สำหรับหลอดทดสอบที่มีตัวอักษรปกติ  ให้เติมสารแขวนลอยเซลล์ลงไปให้เต็มในหลอดส่วนล่างเท่านั้น

- สำหรับหลอดทดสอบที่มีตัวอักษรสัญลักษณ์ขีดเส้นใต้ได้ตัวอักษร  ให้เติม Mineral oil ปิดทับในส่วนบนของหลอดทดสอบ (Cupule)

- สำหรับหลอดทดสอบที่มีสัญลักษณ์ขีดเส้นล้อมรอบตัวอักษร  ให้เติมสารแขวนลอยเซลล์ลงไปให้เต็มทั้งในหลอดส่วนล่างและส่วนบนของหลอดทดสอบ

เมื่อเติมสารแขวนลอยเซลล์ นำแถบทดสอบใส่กล่องพลาสติกที่เติมน้ำกลั่นไว้ ปิดฝา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และนำมาอ่านผลตามคู่มือของชุดทดสอบ API Kit แต่ละชุด ก่อนทำการบันทึกผลและนำผลที่ได้ไปตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในเว็บไซค์ APILAS Plus Software (<https://apiweb.biomerieux.com>) (ภาพ 10)



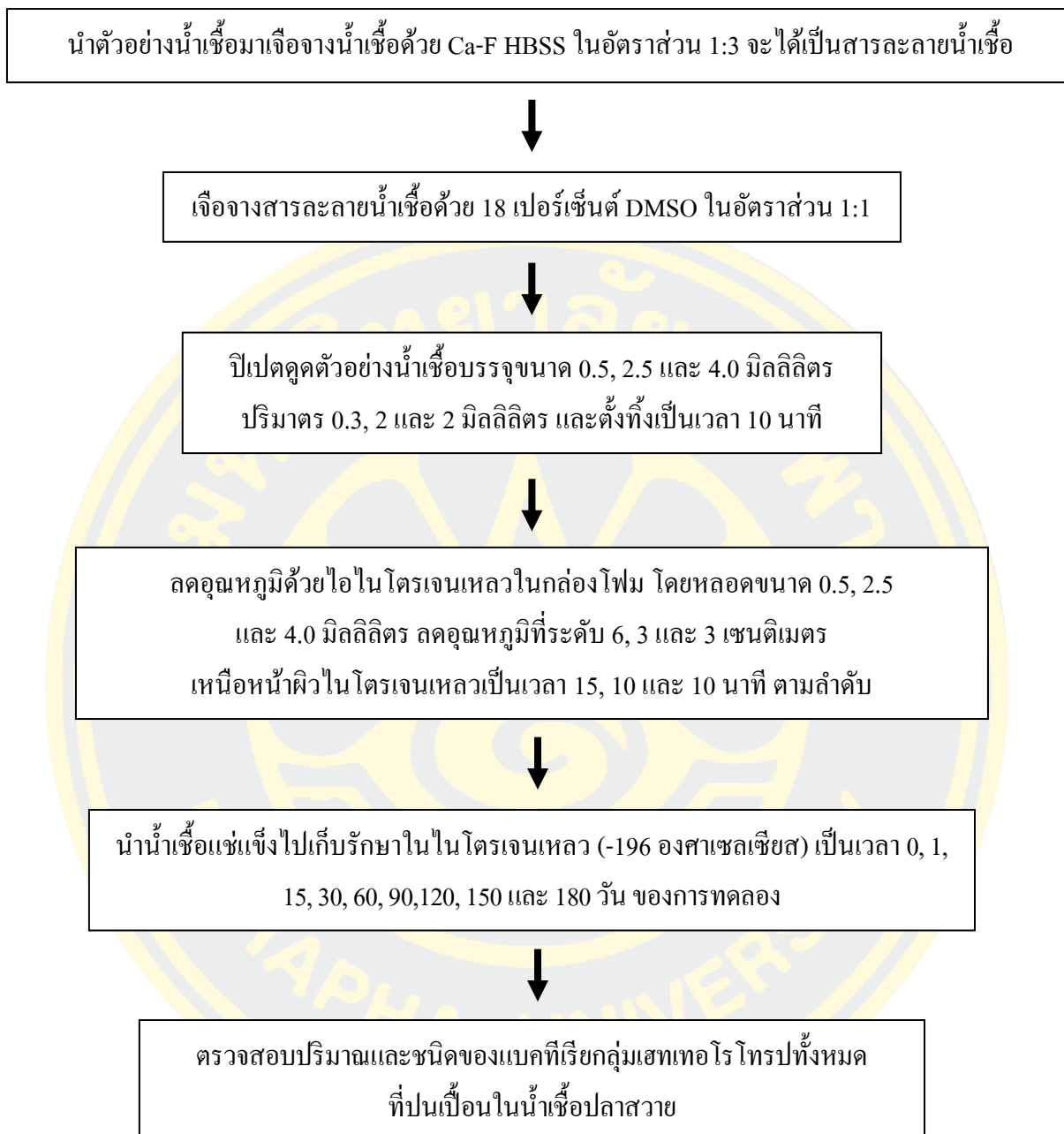
ภาพ 10 แผนภาพการตรวจสอบการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit

การทดลองที่ 2 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลา สวายหลังการละลาย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็ง (ดัดแปลงจาก Cabrita et al., (2001))

เจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อสดด้วยสารละลาย Ca-free HBSS ในอัตราส่วน 1:3 ผสมให้เข้ากันในภาชนะที่ปิดสนิท หลังจากนั้นเติมสารละลาย 18 เปอร์เซนต์ DMSO ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนจะนำไปหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ในปริมาณ 300 ไมโครลิตร 2 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิดปลายหลอดบรรจุด้วยความร้อนให้สนิท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อให้สารไครโอโพรเทคแทนที่ซึมเข้าเซลล์สเปิร์ม

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร วางเหนือไนโตรเจนเหลว 6, 3 และ 3 เซนติเมตร ในกล่องโฟมขนาด 22 x 33.5 x 27 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15, 10 และ 10 นาที ตามลำดับ เพื่อทำการแช่แข็งตัวอย่างเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่แช่แข็งแล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 วัน (ดังภาพ 11) และทำการตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสวายตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1.2 และ 1.3



ภาพ 11 แผนภาพการตรวจสอบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวยแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสวยหลังการละลาย

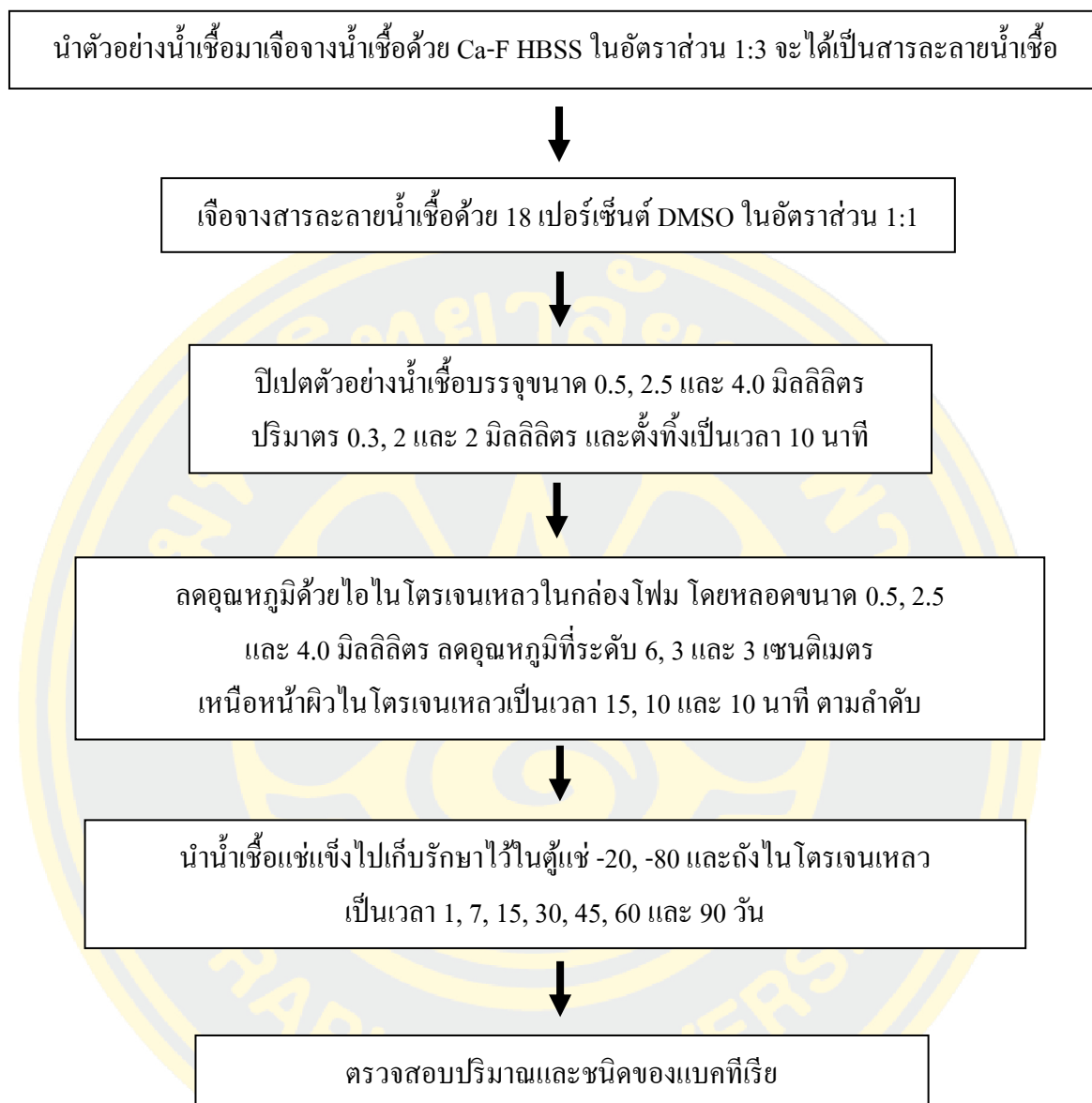
การทดลองที่ 3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อปลาสายแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสายหลังการละลาย

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อปลาสายแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาสายหลังการละลาย (ดัดแปลงจาก Cabrita et al., (2001)) โดย เจือจางตัวอย่างน้ำเชื้อสดด้วยสารละลาย Ca-free HBSS ในอัตราส่วน 1:3 ผสมให้เข้ากันในภาชนะที่ปิดสนิท หลังจากนั้นเติมสารละลาย 18 เปอร์เซนต์ DMSO ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนจะนำไปใส่หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ในปริมาณ 300 ไมโครลิตร 2 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิดปลายหลอดบรรจุด้วยความร้อนให้สนิท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อให้สาร โคร โพรเทคแทนท์ซึมเข้าเซลล์สเปิร์ม

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร วางเหนือในโตรเจนเหลว 6, 3 และ 3 เซนติเมตร ในกล่องโฟมขนาด 22 x 33.5 x 27 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 15, 10 และ 10 นาที ตามลำดับ เพื่อทำการแช่แข็งตัวอย่างน้ำเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่แช่แข็งแล้วไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ -20, -80, และ -196 องศาเซลเซียส ในตู้แช่ -20, -80 องศาเซลเซียส และถึงในโตรเจนเหลว ตามลำดับ ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยการประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ไปเป็นระยะเวลา 1, 7, 15, 30, 45, 60 และ 90 วัน (ภาพ 12) โดยทำการละลายน้ำเชื้อในหลอดแช่แข็งตามตารางที่ 2 เพื่อนำตัวอย่างไปตรวจสอบปริมาณและชนิดของแบคทีเรียตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1.2 และ 1.3

ตารางที่ 2 อุณหภูมิของน้ำและระยะเวลาที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร

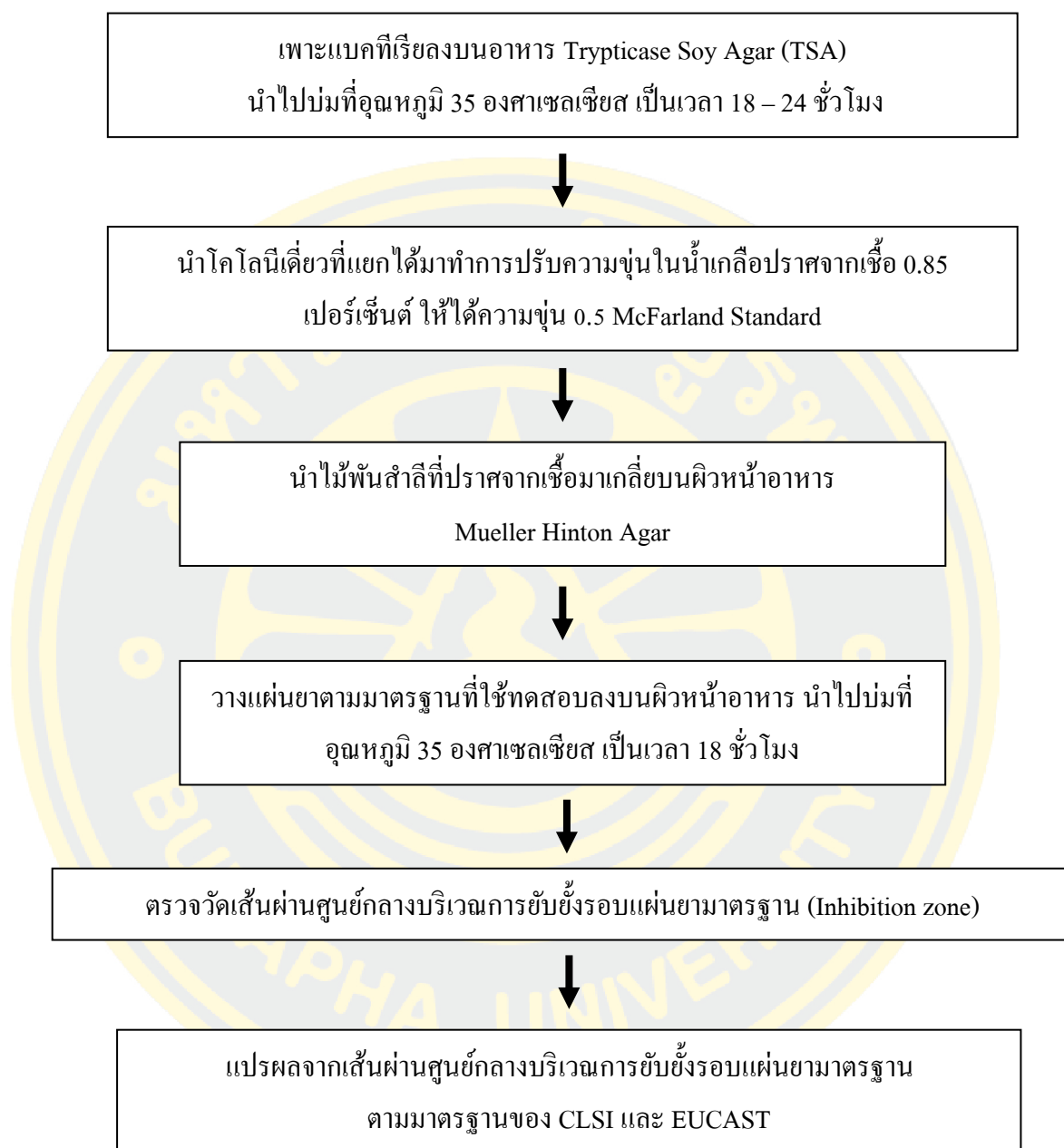
อุณหภูมิของน้ำและ ระยะเวลา	อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (องศาเซลเซียส)								
	-20			-80			-196		
	0.5	2.5	4.0	0.5	2.5	4.0	0.5	2.5	4.0
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	60	70	70	70	80	80	70	80	80
ระยะเวลา (วินาที)	2	10	14	4	10	14	5	15	18



ภาพ 12 แผนภาพการประเมินผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื่อมพลาสติกแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื่อมพลาสติกหลังการละลาย

การทดลองที่ 4 การตรวจสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง (ตามวิธีการของ Bauer, Kirby, Sherris & Turck (1966))

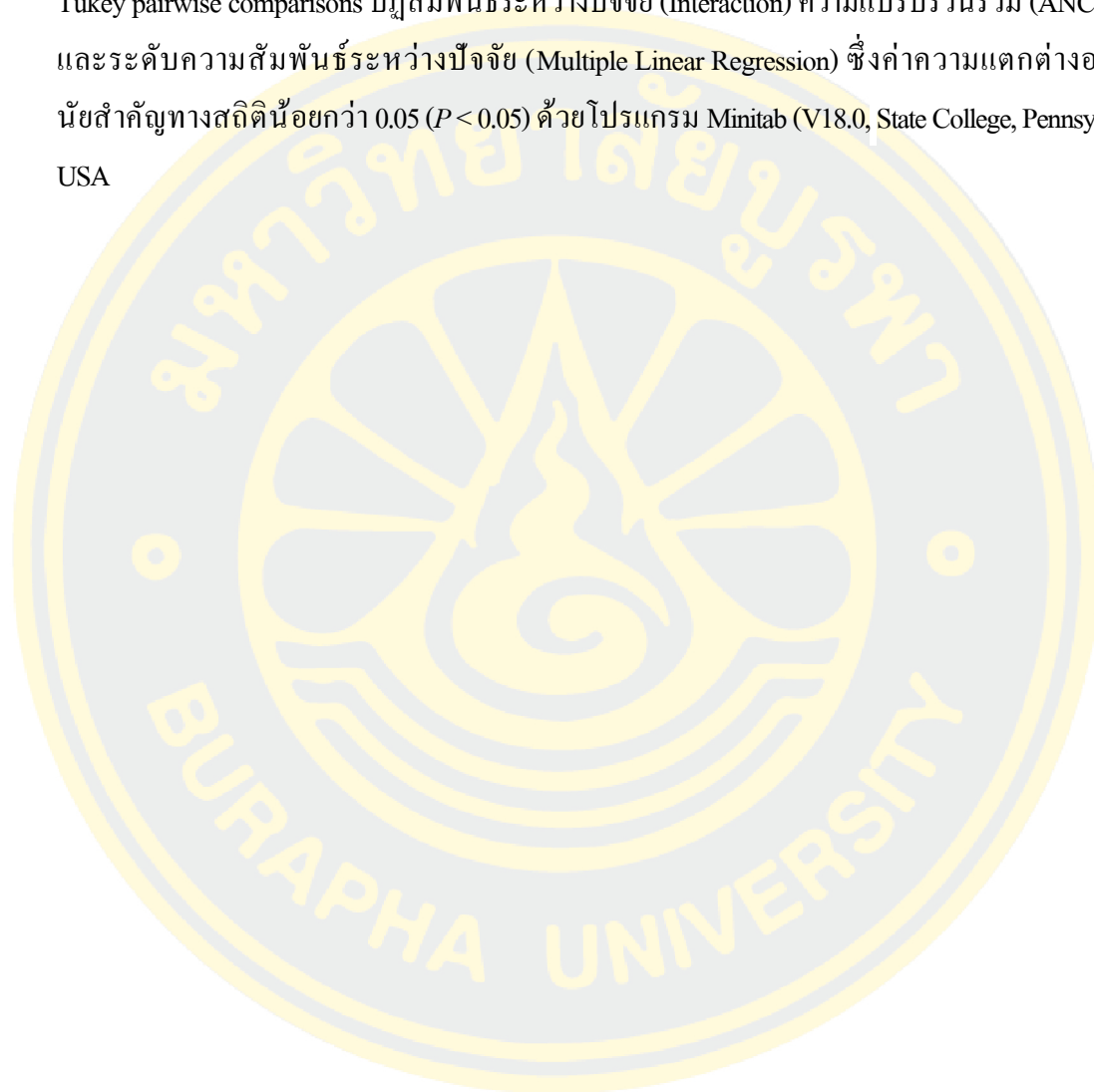
นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งมาทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะด้วยวิธี Kirby-Bauer disk diffusion method โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA; BD/Difco, Sparks, MD, USA) มาบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยเซลล์ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปปรับความขุ่นให้เท่ากับ No. 0.5 McFarland Standard (มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/mL) จากนั้นนำไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA; BD/Difco, Sparks, MD, USA) แล้ววางแผ่นยาตามมาตรฐานที่ใช้ทดสอบลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งรอบแผ่นยาตามมาตรฐาน (Inhibition zone) จากนั้นทำการแปลผลตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) และ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2019) ดังภาพที่ 13



ภาพ 13 แผนภาพการตรวจสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มสเตปโทโคคัส
ทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตายแช่แข็ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการแปลงข้อมูลจำนวนแบบที่เรียโดยใช้ 10 - log transformation เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) Tukey pairwise comparisons ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (Interaction) ความแปรปรวนร่วม (ANCOVA) และระดับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (Multiple Linear Regression) ซึ่งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($P < 0.05$) ด้วยโปรแกรม Minitab (V18.0, State College, Pennsylvania, USA



บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากปัญหาด้านการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง ทำให้มีแนวคิดในการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาดต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน รวมถึงระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง ผลการศึกษาแสดงดังรายละเอียดดังนี้

4.1 การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาดต่างกันและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

4.1.1 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร

น้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งภายในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ตลอดจนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อสดมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 3) เท่ากับ $9.27 \pm 0.75 \times 10^4$ CFU/mL เมื่อนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงเหลือ $7.57 \pm 0.32 \times 10^4$ CFU/mL และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เหลือ $5.35 \pm 1.20 \times 10^4$ CFU/mL เมื่อเติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO ลงในน้ำเชื้อสด

หลังจากนำน้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO มาบรรจุลงในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงจากก่อนนำมาบรรจุเท่ากับ $3.83 \pm 0.26 \times 10^4$, $3.93 \pm 0.21 \times 10^4$ และ $4.35 \pm 0.49 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อทำการลดอุณหภูมิและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณแบคทีเรียใกล้เคียงกับน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดขนาดต่าง ๆ ก่อนนำไปแช่แข็งซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.56 \pm 0.08 \times 10^4$, $1.18 \pm 0.15 \times 10^4$ และ $1.70 \pm 0.17 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับก่อนจะพบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 วัน เท่ากับ $1.77 \pm 0.04 \times 10^4$, $1.41 \pm 0.05 \times 10^4$ และ $1.89 \pm 0.02 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับ และมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 6 วัน โดยพบปริมาณของแบคทีเรียเท่ากับ $1.56 \pm 0.08 \times 10^4$ และ $1.70 \pm 0.17 \times 10^4$

CFU/mL ตามลำดับ แต่ปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ทำการเก็บรักษาวันที่ 6 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.18 \pm 0.15 \times 10^4$ CFU/mL (ตารางที่ 3)



ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเทโทโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสาวยที่แช่แข็งด้วยกลีเซอรอลโพรพิลและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน

ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อเจือจางด้วย Ca-F HBSS	น้ำเชื้อเจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO	น้ำเชื้อสดเจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร	น้ำเชื้อสดเจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาด 2.5 มิลลิลิตร	น้ำเชื้อสดเจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร
ก่อนแช่แข็ง	$9.27 \pm 0.75 \times 10^4$ ^a	$7.57 \pm 0.32 \times 10^4$ ^b	$5.35 \pm 1.20 \times 10^4$ ^c	$3.83 \pm 0.26 \times 10^4$ ^{d,1}	$3.93 \pm 0.21 \times 10^4$ ^{cd,1}	$4.35 \pm 0.49 \times 10^4$ ^{cd,1}
30 นาที				$3.93 \pm 0.12 \times 10^4$ ^{a,1}	$4.23 \pm 0.23 \times 10^4$ ^{a,1}	$4.03 \pm 0.57 \times 10^4$ ^{a,1}
2				$1.77 \pm 0.04 \times 10^4$ ^{b,2}	$1.41 \pm 0.05 \times 10^4$ ^{c,23}	$1.89 \pm 0.02 \times 10^4$ ^{a,2}
4				$1.47 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{a,2}	$1.71 \pm 0.12 \times 10^4$ ^{a,2}	$1.60 \pm 0.11 \times 10^4$ ^{a,2}
6				$1.56 \pm 0.08 \times 10^4$ ^{a,2}	$1.18 \pm 0.15 \times 10^4$ ^{b,3}	$1.70 \pm 0.17 \times 10^4$ ^{a,2}

หมายเหตุ: ตัวเลขในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา
ตัวอักษรในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

4.1.2 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาชวยแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร

จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาชวยแช่แข็งทั้งหมด 7 ไอโซเลท และเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit โดยเริ่มจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การย้อมสีแกรม การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test) พบว่าสามารถนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติมด้วยชุดทดสอบ API 20NE, API 20E, API Staph และ API 50CH โดยผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API Kit ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *P. fluorescens* และ *P. aeruginosa* แสดงในตารางที่ 4 *S. Maltophilia* และ *Acinetobacter baumannii* แสดงในตารางที่ 5 *Kytococcus sedentarius* และ *Ko. kristinae* แสดงในตารางที่ 6 และ *B. cereus* แสดงในตารางที่ 7 ซึ่งน้ำเชื้อสดพบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *Bacillus cereus* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 8) โดยพบ *P. fluorescens* มากที่สุด (75.74 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *A. baumannii* และ *B. cereus* ตามลำดับ (12.13, 6.99, 3.68 และ 1.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) น้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และน้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO พบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus*, *A. baumannii* และ *Ko. kristinae* (ตารางที่ 8) โดยพบ *P. fluorescens* มากที่สุด (53.30 และ 55.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อนำน้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO บรรจุลงในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร พบว่าหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร พบแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* และหลอดบรรจุขนาด 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร พบแบคทีเรีย 6 ชนิด ซึ่งพบชนิดของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจากหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร คือ *P. aeruginosa* และ *Ko. kristinae* ตามลำดับ โดยแบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในหลอดบรรจุทั้ง 3 ขนาด คือ *P. fluorescens* (53.39 – 68.92 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 14)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางต้นฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20NE ของแบคทีเรียกลุ่มเฮมโทโรโรทริบบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
สายแย่ง

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. oryzae</i>
Gram stain	negative	negative	negative	negative
Cell shape	rod-shaped	rod-shaped	rod-shaped	rod-shaped
Oxidase test	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+
Reduction of nitrate to nitrites/ Reduction of nitrate to nitrogen (No ₃)	-	+	-	-
Indole production (TRP)	-	-	-	-
Glucose fermentation (GLU)	-	-	-	-
Arginine dihydrolyase (ADH)	+	+	+	-
Urease (URE)	-	+	-	-
Esculine hydrolysis (ESC)	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis (GEL)	-	+	-	-
ρ -nitrophenyl- β -D-galactopyranosidase (PNPG)	-	-	-	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20NE ของแบคทีเรียกลุ่มเฮมอฟิลโรโทรบางไอโซเลตที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลา
สายแข็ง (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. oryzae</i>
Glucose assimilation (GLU)	+	+	+	+
Arabinose assimilation (ARA)	+	-	+	+
Mannose assimilation (MNE)	+	-	+	+
Mannitol assimilation (MAN)	+	+	-	+
N-Acetyl glucosamine (NAG)	+	+	-	-
Maltose assimilation (MAL)	-	-	-	+
Gluconate assimilation (GNT)	+	+	+	+
Capric acid assimilation (CAP)	+	+	+	+
Adipic acid assimilation (ADI)	+	+	+	-
Malate assimilation (MLT)	+	+	+	+
Citrate assimilation (CIT)	+	+	+	+
Phenylacetic acid assimilation (PAC)	-	-	+	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20E ของแบคทีเรียกลุ่มเซพเทอโรโทรปบางไอโซเลตที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
 สวายแช่แข็ง

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>S. maltophilia</i>	<i>A. baumannii</i>
Gram stain	negative	negative
Cell shape	rod-shaped	rod-shaped
Oxidase test	-	-
Catalase test	+	+
β -galactosidase (OPNG)	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-
Lysine decarboxylase (LDC)	+	-
Ornithine decarboxylase (ODC)	-	-
Citrate utilization (CIT)	+	-
H ₂ S production (H ₂ S)	-	-
Urease production (URE)	-	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 5 ลักษณะทางพันธุกรรมและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20E ของแบคทีเรียกลุ่มเซพเทอโรโทรปบางไอโซเลตที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
สายแซ่เจ็ง (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>S. maltophilia</i>	<i>A. baumannii</i>
Tryptophan deaminase (TDA)	-	-
Indole production (IND)	-	-
Voges-Proskauer (VP)	-	-
Gelatin hydrolysis (GEL)	+	-
Glucose fermentation (GLU)	-	+
Mannitol fermentation (MAN)	-	-
Inositol fermentation (INO)	-	-
Sorbitol fermentation (SOR)	-	-
Rhamnose fermentation (RHA)	-	-
Sucrose fermentation (SAC)	-	-
Melibiose fermentation (MEL)	-	+
Amygdalin fermentation (AMY)	-	+
Arabinose fermentation (ARA)	-	+
Growth at 42 °C	NT	+

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ, NT: not tested

ตารางที่ 6 ลักษณะทางต้นฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API Staph ของแบคทีเรียกลุ่มสเตฟาโทโรโทรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
 สวายแช่แข็ง

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>K. sedentarius</i>	<i>Ko. kristinae</i>
Gram stain	positive	positive
Cell shape	Coccus	Coccus
Oxidase test	+	+
Catalase test	+	+
Glucose fermentation (GLU)	-	+
Fructose fermentation (FRU)	-	+
Mannose fermentation (MNE)	-	+
Maltose fermentation (MAL)	-	+
Lactose fermentation (LAC)	-	-
Trehalose fermentation (TRE)	-	+
Mannitol fermentation (MAN)	-	-
Xylitol fermentation (XLT)	-	-
Melibiose fermentation (MEL)	-	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 6 ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API Staph ของแมคทีเรียกลุ่มสเตฟิโลโคคัสที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลา
สายแข็ง (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>K. sedentarius</i>	<i>Ko. kristinae</i>
Reduction of nitrate to nitrites (NIT)	-	-
Alkaline phosphatase (PAL)	+	+
Voges-Proskauer (VP)	-	+
Raffinose fermentation (RAF)	-	-
Xylose fermentation (XYL)	-	-
Sucrose fermentation (SAC)	-	+
Methyl-CD-glucopyranoside (MDG)	-	-
N-Acetyl glucosamine (NAG)	-	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-
Urease (URE)	-	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 7 ลักษณะทางต้นฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50CH ของแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลา
 สายแข็ง

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>B. cereus</i>
Gram stain	positive
Cell shape	rod-shaped
Oxidase test	-
Catalase test	+
Glycerol assimilation (GLY)	-
Erythritol assimilation (ERY)	+
D-Arabinose assimilation (DARA)	-
L-Arabinose assimilation (LARA)	-
D-Ribose assimilation (RIB)	-
D-Xylose assimilation (DXYL)	+
L-Xylose assimilation (LXYL)	-
D-Adonitol assimilation (ADO)	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 7 ลักษณะทางพันธุกรรมและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50CH ของแบคทีเรียกลุ่มเฮมโทโรโทรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลา
 สายแข็ง (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>B. cereus</i>
Methyl-D-xylopyranoside assimilation (MDX)	-
D-Galactose assimilation (GAL)	-
D-Glucose assimilation (GLU)	+
D-Fructose assimilation (FRU)	+
D-Mannose assimilation (MNE)	-
L-Sorbose assimilation (SBE)	-
L-Rhamnose assimilation (RHA)	-
Dulcitol assimilation (DUL)	-
Inositol assimilation (INO)	-
D-Mannitol assimilation (MAN)	-
D-Sorbitol assimilation (SOR)	-
α -methyl-D-mannopyranoside assimilation (MDM)	-
Methyl-D-glucopyranoside assimilation (MDG)	-
N-Acetyl glucosamine assimilation (NAG)	+

หมายเหตุ + ผลิตเป็นบวก, - ผลิตเป็นลบ

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50CH ของแบคทีเรียกลุ่มเฮมสเททอโรโทรปบางไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลา
 สวายแห้งแข็ง (ต่อ)

การทดสอบทางชีวเคมี	<i>B. cereus</i>
Amygdalin assimilation (AMY)	-
Arbutin assimilation (ARB)	+
Esculin assimilation (ESC)	+
Salicin assimilation (SAL)	+
D-Cellobiose assimilation (CEL)	+
D-Maltose assimilation (MAL)	+
D-Lactose assimilation (LAC)	-
D-Melibiose assimilation (MEL)	-
D-Sucrose assimilation (SAC)	-
D-Trehalose assimilation (TRE)	+
Inulin assimilation (INU)	-
D-Melezitose assimilation (MLZ)	-
D-Raffinose assimilation (RAF)	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50CH ของแบคทีเรียกลุ่มเฮมโทโรโทรปบางไอโซเลตที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
 สวายแช่แข็ง (ต่อ)

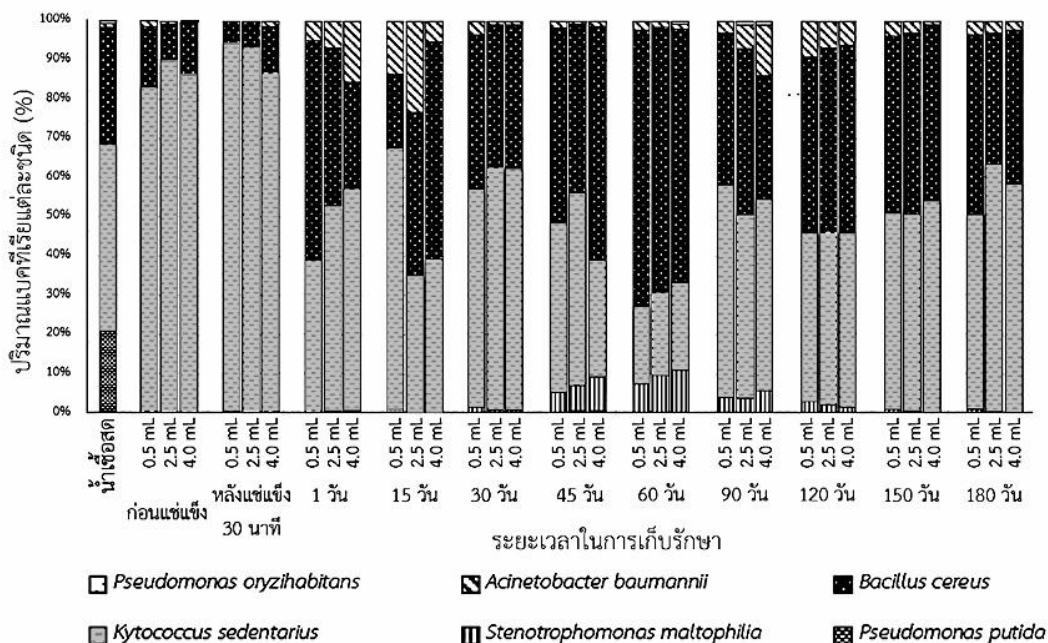
การทดสอบทางชีวเคมี	<i>B. cereus</i>
Amidon assimilation (AMD)	+
Glycogen assimilation (GLYG)	+
Xylitol assimilation (XLT)	-
β -Gentiobiose assimilation (GEN)	-
D-Turanose assimilation (TUR)	-
D-Lyxose assimilation (LYX)	-
D-Tagatose assimilation (TAG)	-
D-Fucose assimilation (DFUC)	-
L-Fucose assimilation (LFUC)	-
D-Arabitol assimilation (DARL)	-
L-Arabitol assimilation (LARL)	-
Gluconate assimilation (GNT)	+
2-keto-gluconate assimilation (2KG)	-
5-keto-gluconate assimilation (5KG)	-

หมายเหตุ + ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

ตารางที่ 8 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มสหภาพโรโทรปทั้งหมด ในน้ำเชื่อมปลาตาย ที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน

ชนิดของแบคทีเรีย	น้ำเชื่อม ขนาด 0.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 2.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 4.0 มิลลิตร	ก่อนแช่แข็ง			หลังแช่แข็ง 30 นาที			วันที่ 2			วันที่ 4			วันที่ 6		
				น้ำเชื่อม ขนาด 0.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 2.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 4.0 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 0.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 2.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 4.0 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 0.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 2.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 4.0 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 0.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 2.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 4.0 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 0.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 2.5 มิลลิตร	น้ำเชื่อม ขนาด 4.0 มิลลิตร
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย



ภาพ 14 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสาวย ที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน

4.2 การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็งที่เก็บรักษาในระยะยาวในถังไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

4.2.1 ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดในหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งขนาด 0.5, 2. และ 4.5 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 0-180 วัน

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดพบในน้ำเชื้อสดมากที่สุดอย่างมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดพบในน้ำเชื้อสดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เท่ากับ $2.20 \pm 0.13 \times 10^4$ CFU/mL และหลังจากนำน้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO มาบรรจุลงในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เท่ากับ $1.35 \pm 0.28 \times 10^4$, $1.47 \pm 0.18 \times 10^4$ และ $1.37 \pm 0.06 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 9) แบคทีเรียในหลอดบรรจุแต่ละขนาดพบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกันทั้ง 3 ขนาด แต่เมื่อทำการลดอุณหภูมิภายในหลอดบรรจุน้ำเชื้ออย่างง่ายด้วยกล่องโฟมและทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 30 นาที พบว่ามีปริมาณ

แบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ระหว่างหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 ขนาด ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจพบเท่ากับ $1.67 \pm 0.06 \times 10^4$, $1.34 \pm 0.20 \times 10^4$ และ $1.32 \pm 0.16 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

หลังจากทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรอปทั้งหมดในขนาดหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 ขนาด พบปริมาณแบคทีเรียในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีปริมาณมากที่สุด ($1.82 \pm 0.01 \times 10^4$ CFU/mL) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 และ 2.5 ที่มีปริมาณเท่ากับ $1.51 \pm 0.04 \times 10^4$ และ $1.23 \pm 0.08 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 9) เช่นเดียวกับการเก็บรักษาหลอดบรรจุน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 180 วัน ที่พบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด ($1.72 \pm 0.01 \times 10^4$ CFU/mL) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 และ 2.5 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.49 \pm 0.07 \times 10^4$ และ $7.25 \pm 0.56 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ผลการศึกษาในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง 180 วัน พบแนวโน้มของปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร มากที่สุด (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาสาวย ที่แช่แข็งด้วยกลองโคมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 180 วัน

ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)	อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ (องศาเซลเซียส)	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อสด เจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอด ขนาด 0.5 มิลลิลิตร	น้ำเชื้อสด เจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอด ขนาด 2.5 มิลลิลิตร	น้ำเชื้อสด เจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอด ขนาด 4.0 มิลลิลิตร
ก่อนแช่แข็ง		$2.20 \pm 0.13 \times 10^4$ ^a	$1.35 \pm 0.28 \times 10^4$ ^{b,1}	$1.47 \pm 0.18 \times 10^4$ ^{b,1}	$1.37 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{b,1}
30 นาที			$1.67 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.34 \pm 0.20 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.32 \pm 0.16 \times 10^4$ ^{a,1}
1			$8.57 \pm 1.33 \times 10^3$ ^{a,1}	$1.57 \pm 0.28 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.09 \pm 0.22 \times 10^4$ ^{a,1}
15			$1.28 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{a,1}	$9.93 \pm 1.23 \times 10^3$ ^{b,1}	$1.23 \pm 0.01 \times 10^4$ ^{a,1}
30			$1.50 \pm 0.15 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.68 \pm 0.15 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.61 \pm 0.20 \times 10^4$ ^{a,1}
45			$1.43 \pm 0.11 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.32 \pm 0.04 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.28 \pm 0.02 \times 10^4$ ^{a,1}
60			$1.21 \pm 0.07 \times 10^4$ ^{b,1}	$1.47 \pm 0.11 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.61 \pm 0.10 \times 10^4$ ^{a,1}
90			$1.51 \pm 0.04 \times 10^4$ ^{b,1}	$1.23 \pm 0.08 \times 10^4$ ^{c,1}	$1.82 \pm 0.01 \times 10^4$ ^{a,1}
120			$1.24 \pm 0.13 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.50 \pm 0.08 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.35 \pm 0.11 \times 10^4$ ^{a,1}
150			$1.36 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.37 \pm 0.10 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.37 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{a,1}
180			$1.49 \pm 0.07 \times 10^4$ ^{b,1}	$7.25 \pm 0.56 \times 10^3$ ^{c,1}	$1.72 \pm 0.01 \times 10^4$ ^{a,1}

หมายเหตุ: ตัวเลขในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา

ตัวอักษรในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

4.2.2 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ตรวจพบในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 180 วัน

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาซวยแช่แข็งด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ร่วมกับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API kit พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่พบในน้ำเชื้อสดมี 6 ชนิด ได้แก่ *P. putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus*, *A. baumannii* และ *P. oryzihabitans* (ตารางที่ 10) โดยพบ *K. sedentarius* มากที่สุด (47.69 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 15) เมื่อนำน้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO บรรจุลงในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ก่อนนำไปแช่แข็ง พบแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* และหลังจากทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที พบว่าหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตรวจพบชนิดของแบคทีเรียเพิ่มเติมคือ *P. putida* เมื่อเทียบกับหลอดบรรจุขนาดเดียวกันก่อนนำไปแช่แข็ง ในขณะที่หลอดบรรจุขนาด 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร พบชนิดของแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับหลอดบรรจุขนาดเดียวกันก่อนนำไปแช่แข็ง (ตารางที่ 10) และยังพบว่า *K. sedentarius* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ทั้งก่อนและหลังจากทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 30 นาที (82.90 – 93.80 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 15) ตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา 180 วัน พบแนวโน้มความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียในน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอดบรรจุทั้ง 3 ขนาดเหมือนกัน โดย *K. sedentarius* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (19.86 – 93.80 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ *B. cereus* (5.81 – 70.38 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 15) ซึ่งในวันที่ 180 พบชนิดของแบคทีเรียในหลอดบรรจุทั้ง 3 ขนาด ได้แก่ *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus*, *A. baumannii* และ *P. oryzihabitans* โดย *P. oryzihabitans* พบในหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิลิตร เท่านั้น และ *P. putida* ที่ตรวจไม่พบตั้งแต่การเก็บรักษาในวันที่ 60 ของการทดสอบ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาสด ที่แช่แข็งด้วยกลองโคมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิเมตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 180 วัน

ชนิดของแบคทีเรีย	ก่อนแช่แข็ง			หลังแช่แข็ง 30 นาที			วันที่ 1			วันที่ 15			วันที่ 30		
	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเซพเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาสดที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิเมตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 180 วัน (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	วันที่ 45			วันที่ 60			วันที่ 90			วันที่ 120			วันที่ 150			วันที่ 180		
	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 0.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 2.5 มิลลิเมตร	น้ำเชื่อมบรรจุขนาด 4.0 มิลลิเมตร
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย

4.3 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งในหลอดบรรจุแต่ละขนาดที่ทำการเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาในตอนที่ 1 และ 2 ทำให้ทราบว่าปริมาณแบคทีเรียของน้ำเชื้อปลาสดที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลาสั้นขึ้นตลอด 180 วัน ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อเนื่องในการปรับปรุงวิธีการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งที่สามารถลดหรือป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง พร้อมทั้งช่วยลดต้นทุนในการใช้อุปกรณ์สำหรับใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งรักษาคุณภาพของสเปิร์มให้สามารถนำไปใช้ในการผสมพันธุ์เทียมได้เทียบเท่ากับการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว การศึกษาในตอนที่ 3 นี้จึงศึกษาถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสดที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร โดยมีผลการทดลองดังนี้

4.3.1 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ-20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัสในน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ $5.17 \pm 0.25 \times 10^3$ CFU/mL ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับน้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO ที่บรรจุลงในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.09 \pm 0.22 \times 10^4$, $1.23 \pm 0.22 \times 10^4$ และ $8.43 \pm 1.48 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 11 - 13)

เมื่อนำน้ำเชื้อปลาสดที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร หลังจากทำการลดอุณหภูมิอย่างง่ายด้วยกล่องโฟม และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัสในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยพบปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดจากการเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และรองลงมาคือ -196 และ -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $8.55 \pm 0.45 \times 10^3$, $6.33 \pm 0.40 \times 10^3$ และ $4.67 \pm 0.83 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 14 วัน พบปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดเมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณเท่ากับ $1.04 \pm 0.09 \times 10^4$ CFU/mL และรองลงมาคือที่อุณหภูมิเก็บรักษา -196 และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งปริมาณที่พบเท่ากับ $8.20 \pm 0.61 \times 10^3$ และ $7.10 \pm 1.45 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตค็อกคัสมากที่สุด ($8.20 \pm 0.90 \times 10^3$ CFU/mL) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -196 และ -20

องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณที่พบเท่ากับ $5.57 \pm 0.59 \times 10^3$ และ $4.83 \pm 0.75 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 11)



ตารางที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเทโทโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสาวยแซ่เจ็งด้วยกล้องโฟมที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อสด เจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเทโทโรโทรปทั้งหมด (CFU/mL)		
			-20	-80	-196
ก่อนแช่แข็ง	$5.17 \pm 0.25 \times 10^{3b}$	$1.09 \pm 0.22 \times 10^{4a}$			
วันที่ 30					
1			$8.55 \pm 0.45 \times 10^{3a, 2}$	$4.67 \pm 0.83 \times 10^{3c, 5}$	$6.33 \pm 0.40 \times 10^{3b, 234}$
7			$5.80 \pm 0.70 \times 10^{3b, 34}$	$8.60 \pm 0.87 \times 10^{3a, 123}$	$6.30 \pm 1.51 \times 10^{3ab, 234}$
14			$8.85 \pm 0.95 \times 10^{3ab, 2}$	$9.73 \pm 0.50 \times 10^{3a, 12}$	$6.67 \pm 1.27 \times 10^{3b, 23}$
21			$7.10 \pm 1.45 \times 10^{3b, 23}$	$1.04 \pm 0.09 \times 10^{4a, 1}$	$8.20 \pm 0.61 \times 10^{3ab, 12}$
28			$6.30 \pm 0.40 \times 10^{3b, 34}$	$7.15 \pm 0.35 \times 10^{3b, 34}$	$9.03 \pm 0.49 \times 10^{3a, 1}$
60			$5.13 \pm 0.32 \times 10^{3b, 34}$	$5.90 \pm 0.66 \times 10^{3a, 45}$	$4.07 \pm 0.38 \times 10^{3b, 4}$
90			$1.16 \pm 0.05 \times 10^{4a, 1}$	$9.27 \pm 0.46 \times 10^{3b, 12}$	$7.80 \pm 0.40 \times 10^{3c, 123}$
			$4.83 \pm 0.75 \times 10^{3b, 4}$	$8.20 \pm 0.90 \times 10^{3a, 23}$	$5.57 \pm 0.59 \times 10^{3b, 34}$

หมายเหตุ: ตัวเลขในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา

ตัวอักษรในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ตรวจพบในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร ที่ทำการเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 30 นาที ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทำการเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเท่ากับ $6.87 \pm 1.01 \times 10^3$, $2.96 \pm 0.02 \times 10^3$ และ $2.90 \pm 0.28 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 14 วัน พบปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณที่พบเท่ากับ $8.73 \pm 0.42 \times 10^3$ CFU/mL และรองลงมาก็คืออุณหภูมิเก็บรักษา -80 และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งปริมาณที่พบเท่ากับ $8.10 \pm 0.26 \times 10^3$ และ $7.23 \pm 0.55 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่าอุณหภูมิ -196 และ -80 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปมากที่สุด ($1.39 \pm 0.19 \times 10^4$ และ $1.24 \pm 0.05 \times 10^4$ CFU/mL ตามลำดับ) และรองลงมาก็คืออุณหภูมิเก็บรักษา -20 องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณที่พบเท่ากับ และ $7.00 \pm 0.14 \times 10^3$ CFU/mL (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสในน้ำเชื้อปลาสมาสายแช่แข็งด้วยกล้องโฟมที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อสด เจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาด 2.5 มิลลิลิตร	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัส (CFU/mL)		
			-20	-80	-196
ก่อนแช่แข็ง	$5.17 \pm 0.25 \times 10^3$ ^b	$1.23 \pm 0.22 \times 10^4$ ^a			
วันที่ 30			$2.96 \pm 0.02 \times 10^3$ ^{b,4}	$2.90 \pm 0.20 \times 10^3$ ^{b,4}	$6.87 \pm 1.01 \times 10^3$ ^{a,23}
1			$8.30 \pm 0.60 \times 10^3$ ^{b,1}	$1.05 \pm 0.05 \times 10^4$ ^{a,1}	$7.60 \pm 0.26 \times 10^3$ ^{b,2}
7			$6.57 \pm 1.03 \times 10^3$ ^{b,2}	$1.03 \pm 0.16 \times 10^4$ ^{a,1}	$7.53 \pm 1.29 \times 10^3$ ^{ab,2}
14			$7.23 \pm 0.55 \times 10^3$ ^{b,12}	$8.10 \pm 0.26 \times 10^3$ ^{ab,2}	$8.73 \pm 0.42 \times 10^3$ ^{a,2}
21			$7.33 \pm 0.40 \times 10^3$ ^{b,12}	$5.95 \pm 0.35 \times 10^3$ ^{c,3}	$8.83 \pm 0.59 \times 10^3$ ^{a,2}
28			$4.70 \pm 0.26 \times 10^3$ ^{a,3}	$5.57 \pm 0.76 \times 10^3$ ^{a,3}	$4.27 \pm 0.95 \times 10^3$ ^{a,3}
60			$6.40 \pm 0.42 \times 10^3$ ^{a,2}	$6.67 \pm 0.90 \times 10^3$ ^{a,23}	$7.37 \pm 0.98 \times 10^3$ ^{a,2}
90			$6.77 \pm 0.42 \times 10^3$ ^{b,2}	$1.24 \pm 0.06 \times 10^4$ ^{a,1}	$1.39 \pm 0.19 \times 10^4$ ^{a,1}

หมายเหตุ: ตัวเลขในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา

ตัวอักษรในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

น้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งภายในหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส หลังทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 30 นาที พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $8.13 \pm 0.60 \times 10^3$, $6.50 \pm 1.14 \times 10^3$ และ $7.30 \pm 0.28 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งพบปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดในอุณหภูมิที่เก็บรักษา -20 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ -196 และ -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 14 วัน พบปริมาณแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิทั้ง 3 ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส เท่ากับ $6.93 \pm 0.50 \times 10^3$, $8.20 \pm 0.40 \times 10^3$ และ $7.00 \pm 0.70 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเก็บรักษา 90 วัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด ($1.15 \pm 0.06 \times 10^4$ CFU/mL) รองลงมาคืออุณหภูมิเก็บรักษา -196 และ -20 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.75 \pm 0.15 \times 10^3$ และ $7.30 \pm 0.71 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัสในน้ำเชื้อปลาสาวยแซ่แข็งด้วยคลอรีนที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง (วัน)	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อสด เจือจางใน Ca-F HBSS และ 18% DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโทคอกคัส (CFU/mL)		
			-20	-80	-196
ก่อนแช่แข็ง	$5.17 \pm 0.25 \times 10^3$ ^b	$8.43 \pm 1.48 \times 10^3$ ^a			
วันที่ 30			$8.13 \pm 0.60 \times 10^3$ ^{a,1}	$6.50 \pm 1.14 \times 10^3$ ^{a,3}	$7.30 \pm 0.20 \times 10^3$ ^{a,23}
1			$7.10 \pm 0.20 \times 10^3$ ^{a,12}	$6.50 \pm 0.30 \times 10^3$ ^{a,3}	$6.87 \pm 0.75 \times 10^3$ ^{a,3}
7			$4.00 \pm 0.60 \times 10^3$ ^{b,2}	$6.23 \pm 0.47 \times 10^3$ ^{a,3}	$7.20 \pm 0.40 \times 10^3$ ^{a,23}
14			$6.93 \pm 0.50 \times 10^3$ ^{a,12}	$8.20 \pm 0.40 \times 10^3$ ^{a,2}	$7.00 \pm 0.70 \times 10^3$ ^{a,3}
21			$6.53 \pm 0.91 \times 10^3$ ^{b,12}	$8.23 \pm 0.35 \times 10^3$ ^{a,2}	$7.07 \pm 0.60 \times 10^3$ ^{ab,23}
28			$4.17 \pm 0.01 \times 10^3$ ^{b,2}	$5.80 \pm 0.70 \times 10^3$ ^{a,3}	$5.23 \pm 0.60 \times 10^3$ ^{ab,4}
60			$1.14 \pm 0.05 \times 10^4$ ^{a,1}	$7.13 \pm 0.31 \times 10^3$ ^{a,23}	$8.60 \pm 0.66 \times 10^3$ ^{a,12}
90			$7.17 \pm 0.55 \times 10^3$ ^{c,12}	$1.15 \pm 0.05 \times 10^4$ ^{a,1}	$9.75 \pm 0.15 \times 10^3$ ^{c,1}

หมายเหตุ: ตัวเลขในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา
ตัวอักษรในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

จากการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง และขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ($F=12.92$ และ $P=0.00$) และอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ($F=5.72$ และ $P=0.004$) คือปัจจัยหลัก (Main effect) ที่มีอิทธิพลต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 14) และเมื่อทำการวิเคราะห์อิทธิพลร่วม (Interaction effect) ระหว่างปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ต่อปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรีย พบว่า ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง และขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง มีปฏิสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ($F=6.74$ และ $P=0.000$) (ตารางที่ 14) แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อ พบว่า ขนาดของหลอดมีอิทธิพลต่อปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างไม่คงที่ในทุก ๆ ระดับของอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ กล่าวได้ว่าขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อไม่เป็นอิทธิพลร่วมต่อปริมาณแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 3 พบว่า ระหว่างระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา และอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษา มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Adjusted R square) เท่ากับ 77.79 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำขนาดของหลอดมาทำการวิเคราะห์ร่วมกับปัจจัยทั้ง 2 พบว่า สัมประสิทธิ์การตัดสินใจลดลง (Adjusted R square = 57.33 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพล ปฏิสัมพันธ์ของปัจจัย และความแปรปรวนร่วมของปัจจัยต่อ ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาชเวตแซ่แข็งที่ บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	ความแปรผันระหว่าง ค่าเฉลี่ย (F)	ค่านัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง	12.92	0.000
อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง	5.72	0.004
ขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	0.25	0.778
ปฏิสัมพันธ์ของปัจจัย		
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง และอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง	18.92	0.000
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง และขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	13.86	0.000
อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็งและ ขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	27.79	0.000
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง และขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	6.74	0.000
ความแปรปรวนร่วมของปัจจัย		
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง และขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	12.39	0.000
อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็งและ ขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	5.93	0.003
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแซ่แข็ง และขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแซ่แข็ง	2.60	0.002

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งที่บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง

ความสัมพันธ์ของปัจจัย	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Adjusted R square) (%)	ค่านัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง และอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง	77.79	0.000
ระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง อุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง และขนาดของหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง	57.33	0.725

4.3.2 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำเชื้อสดพบแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดพบจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *S. maltophilia*, *K. sedentarius* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 15) โดย *K. sedentarius* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (60.98 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 16) น้ำเชื้อสดที่เติม Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO บรรจุลงในหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร ทั้งก่อนนำไปแช่แข็งและหลังทำการแช่แข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที พบแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* แต่ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียเพียง 3 ชนิด ซึ่งไม่พบ *B. cereus* ในอุณหภูมิการเก็บรักษานี้ (ตารางที่ 16) ซึ่งความหลากหลายของแบคทีเรียและสัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละชนิดในน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมิ มีแนวโน้มที่เหมือนกันโดยแบคทีเรียส่วนมากที่พบคือ *K. sedentarius* (41.44 – 96.75 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 16) หลังจากทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 90 วัน แม้ว่าชนิดของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -20

และ -80 องศาเซลเซียส ลดลงจากวันที่ 60 เหลือเพียง 3 ชนิด โดยไม่พบแบคทีเรีย *S. maltophilia* ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และไม่พบแบคทีเรีย *A. baumannii* ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 16) แต่ยังคงพบสัดส่วนของ *K. sedentarius* สูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ



ตารางที่ 16 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโอโรโทรบทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาตายที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 0.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

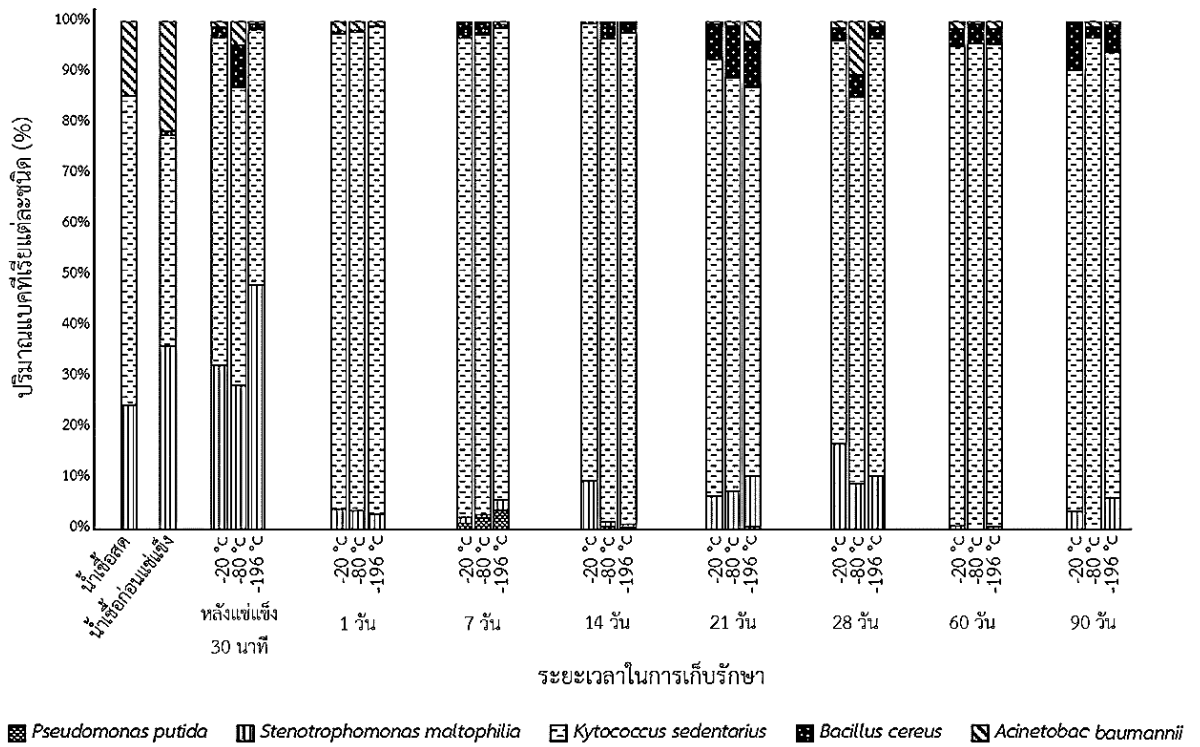
ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดพันธุ์	อุณหภูมิ	หลังแช่แข็ง 30 นาที			วันที่ 1			วันที่ 7			วันที่ 14					
			-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196			
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย

ตารางที่ 16 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟิกทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาตายที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 0.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	วันที่ 21			วันที่ 28			วันที่ 60			วันที่ 90		
	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย



ภาพ 16 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเสทเทอร์โอโทรปทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

สำหรับหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 มิลลิลิตร ทั้งก่อนและหลังทำการแช่แข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที พบแบคทีเรียทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 17) และสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบส่วนมากคือ *K. sedentarius* ซึ่งมีปริมาณ 57.74 – 61.29 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ที่พบ *S. maltophilia* มากกว่า *K. sedentarius* โดยพบสัดส่วนของ *S. maltophilia* เท่ากับ 52.63 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบ *K. sedentarius* เท่ากับ 45.26 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 17) แต่เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ -20 และ -196 องศาเซลเซียส พบชนิดของแบคทีเรียลดลงเหลือเพียง 3 และ 2 ชนิดตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบแบคทีเรีย *S. maltophilia* และที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบแบคทีเรีย *B. cereus* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 17) แต่ยังคงพบสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *K. sedentarius* และระยะเวลาการเก็บรักษาวันที่ 90 ตรวจพบแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Pseudomonas putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* โดยตรวจพบ *P. putida* ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่พบครั้งแรกในวันที่ 7 ที่ทำการเก็บรักษา (ตารางที่ 17) และ *K. sedentarius* ยังคงเป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด กล่าวคือ ตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา 90 วัน ความหลากหลายของแบคทีเรียมีแนวโน้มที่เหมือนกัน และสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่คือ *K. sedentarius* (57.74 – 97.38 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 17)

ตารางที่ 17 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรบทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาสดที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 2.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

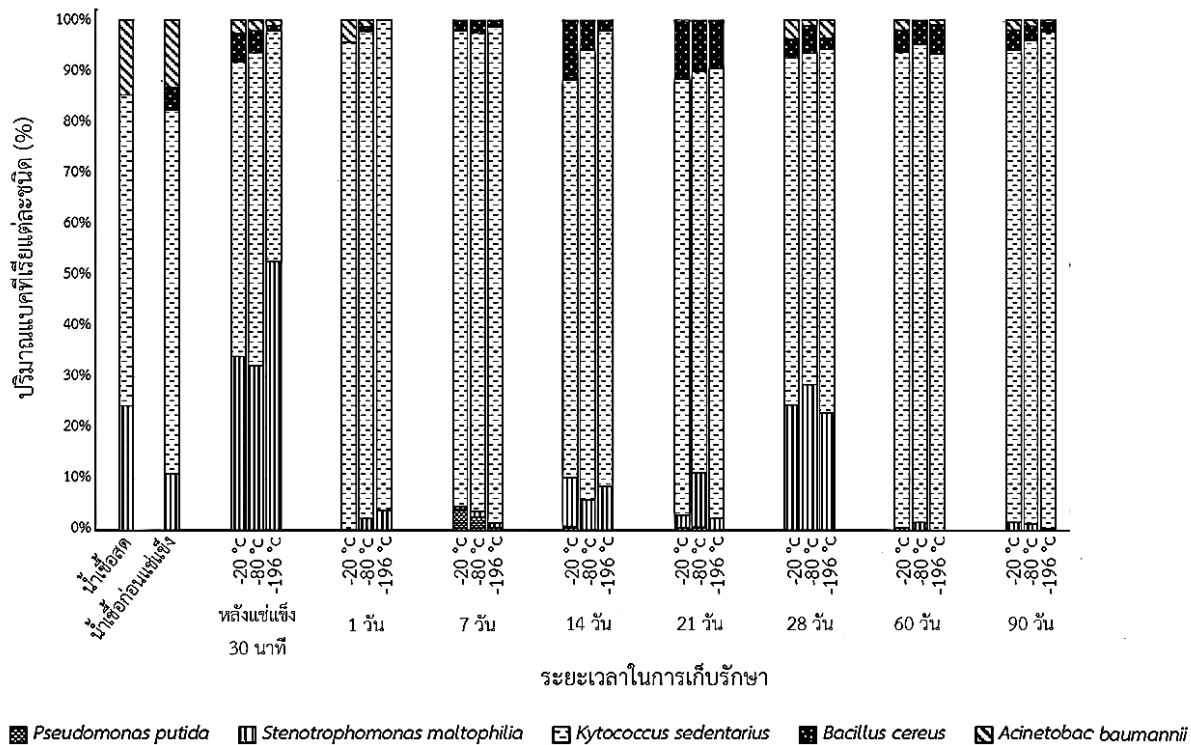
ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดเชื้อ	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง 30 นาที			วันที่ 1			วันที่ 7			วันที่ 14						
			-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196				
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย

ตารางที่ 17 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาตายที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 2.5 มิลลิลิตร
เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	วันที่ 21			วันที่ 28			วันที่ 60			วันที่ 90		
	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย



ภาพ 17 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเสทเทอโรโทรปทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในน้ำเชื่อมปลาหวานแช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 2.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

น้ำเชื้อในหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิลิตร ทั้งก่อนนำไปแช่แข็งและหลังทำการแช่แข็ง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที พบแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 18) ซึ่งสัดส่วนของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *K. sedentarius* (58.95 – 77.93 เปอร์เซ็นต์) (ภาพ 18) และเมื่อทำการเก็บรักษา 1 วัน ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ยังคงพบแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนหน้านี้ แต่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่พบ *A. baumannii* และอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ไม่พบ *B. cereus* แต่เมื่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *P. putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* ในขณะที่อุณหภูมิ -80 และ -196 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียเพียง 4 ชนิด โดยไม่พบ *A. baumannii* (ตารางที่ 18) แต่หลังจากทำการเก็บรักษาตลอดระยะเวลา 90 วัน พบว่าสัดส่วนของและชนิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในหลอดบรรจุขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีความใกล้เคียงกัน กล่าวคือแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่คือ *K. sedentarius* ซึ่งพบได้ถึง 58.95 – 95.41 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 18) และในวันที่ 90 ยังคงพบแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *P. putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรบทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาสดที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

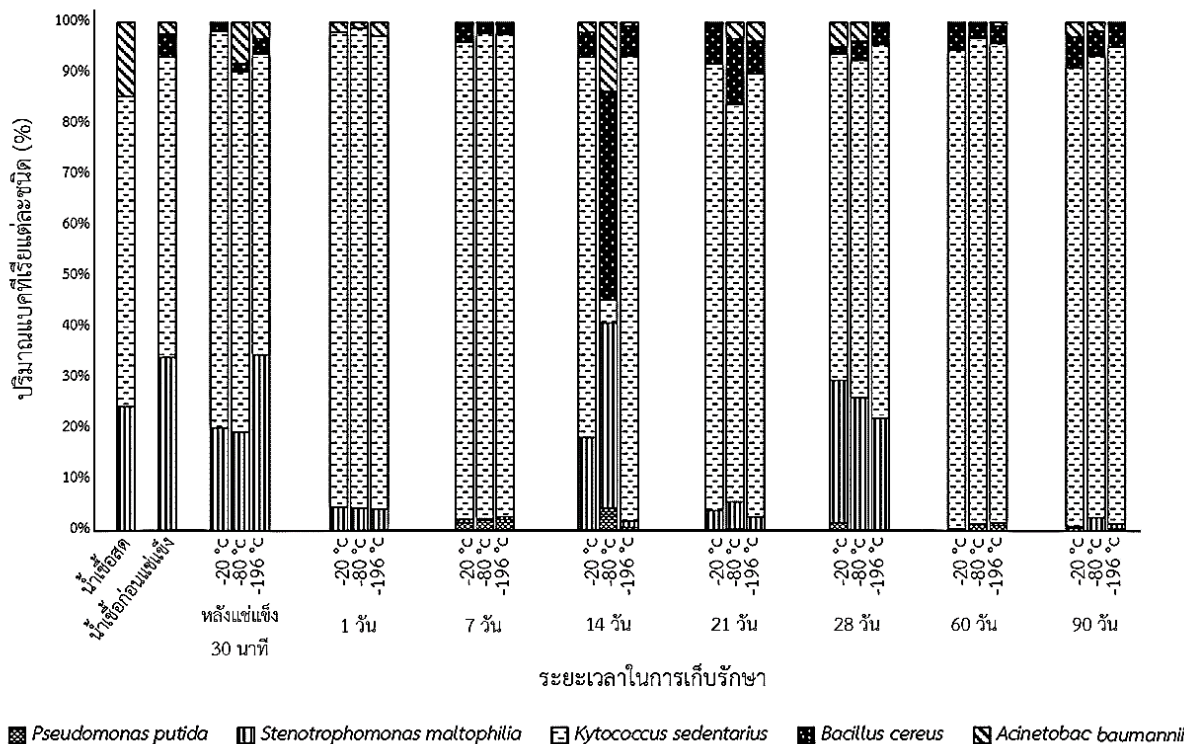
ชนิดของแบคทีเรีย	ชนิดเชื้อ	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง 30 นาที			วันที่ 1			วันที่ 7			วันที่ 14					
			-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196			
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย

ตารางที่ 18 ชนิดของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟทั้งหมดในน้ำเชื่อมปลาตายที่แช่แข็งด้วยกลดองโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื่อมขนาด 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	วันที่ 21			วันที่ 28			วันที่ 60			วันที่ 90		
	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196	-20	-80	-196
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Kytococcus sedentarius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + ตรวจพบแบคทีเรีย, - ตรวจไม่พบแบคทีเรีย



ภาพ 18 สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มเสทเทอโรโทรปทั้งหมดแต่ละชนิดที่พบในน้ำเชื่อมปลาสดแช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำแข็งขนาด 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 90 วัน

4.4 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่มเสทเทอโรโทรปทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลาสดแช่แข็ง

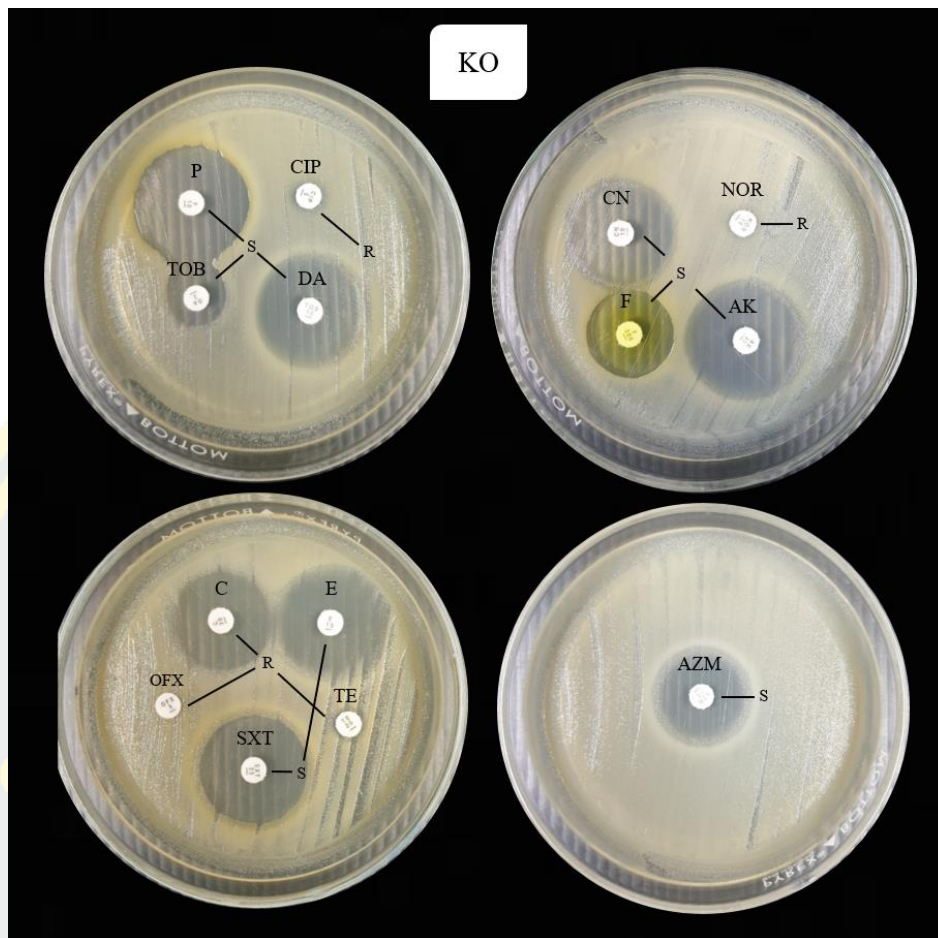
จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ที่แยกได้จากน้ำเชื่อมปลาสดแช่แข็งพบว่า *Ko. kristinae* KO คือต่อสารปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ Tetracycline, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin และ Clindamycin (ดังภาพ 19) ส่วน *K. sedentarius* ทั้ง 3 ไอโซเลท คือต่อสารปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ Penicillin, Norfloxacin, Nitrofurantoin และ Clindamycin ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสาวย
แช่แข็ง

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ความไวต่อสารปฏิชีวนะ			
		<i>Ko. kristinae</i> KO	<i>K. sedentarius</i> KSio1	<i>K. sedentarius</i> KSio2	<i>K. sedentarius</i> KSio3
Penicillins	Penicillin (10 U)	S	R	R	R
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	S	S	S	S
	Amikacin (30)	S	S	S	S
	Tobramycin (10)	S	I	I	I
Macrolides	Azithromycin (15)	S	S	S	S
	Erythromycin (15)	S	S	S	S
Tetracyclines	Tetracycline (30)	R	I	I	I
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	R	S	S	S
	Norfloxacin (10)	R	R	R	R
	Ofloxacin (5)	R	S	S	S
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	S	R	R	R
Lincomycins	Clindamycin (2)	R	R	R	R
Folate pathway inhibitors	TMP/SMX* (1.25/23.75)	S	S	S	S
Phenicols	Chloramphenicol (30)	S	I	S	I

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คื้อต่อสารปฏิชีวนะ

*Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX)



ภาพ 19 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *Ko. kristinae* ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดื้อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)

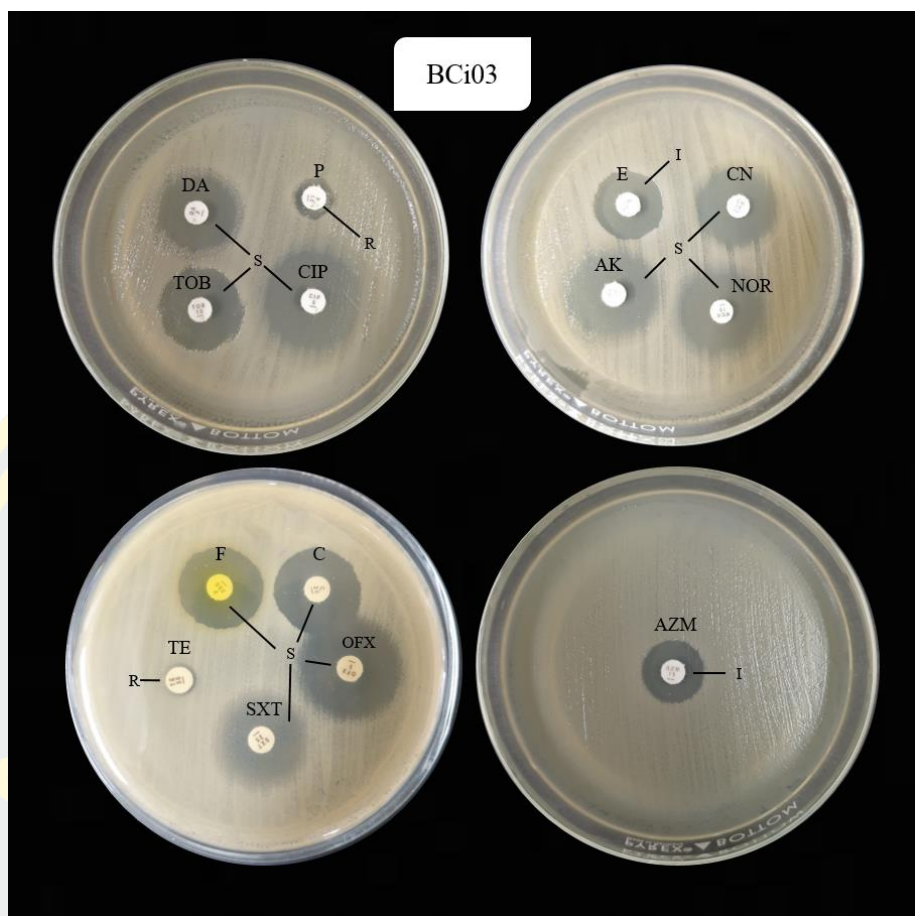
จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ ได้แก่ *B. cereus* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตายแช่แข็งพบว่า *B. cereus* ทั้ง 3 ไอโซเลต ต่อดื้อสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Penicillin และ Tetracycline ดังตารางที่ 20 และภาพ 20

ตารางที่ 20 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ความไวต่อสารปฏิชีวนะ		
		<i>B. cereus</i> BCio1	<i>B. cereus</i> BCio2	<i>B. cereus</i> BCio3
Penicillins	Penicillin (10 U)	R	R	R
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	S	S	S
	Amikacin (30)	S	S	S
	Tobramycin (10)	S	S	S
Macrolides	Azithromycin (15)	I	I	I
	Erythromycin (15)	I	I	I
Tetracyclines	Tetracycline (30)	R	R	R
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	S	S	S
	Norfloxacin (10)	S	S	S
	Ofloxacin (5)	S	S	S
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	S	S	S
Lincomycins	Clindamycin (2)	S	S	S
Folate pathway inhibitors	TMP/SMX* (1.25/23.75)	S	S	S
Phenicols	Chloramphenicol (30)	S	S	S

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คีโตต่อสารปฏิชีวนะ

*Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX)



ภาพ 20 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi03) ด้วยวิธี disk diffusion

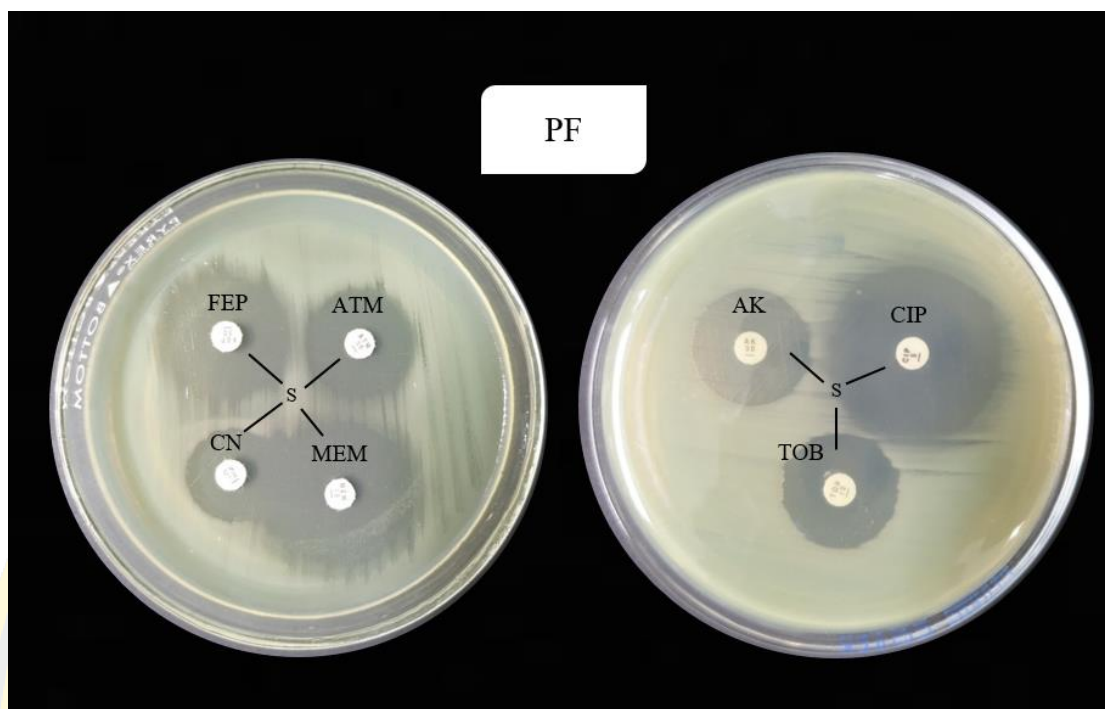
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คีดต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Clindamycin (DA), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Erythromycin (E), Amikacin (AK), Norfloxacin (NOR), Gentamicin (CN), Nitrofurantoin (F), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Ofloxacin (OFX), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)

จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน กลุ่มไม่หมักย่อย น้ำตาลกลูโคส ในสกุล *Pseudomonas* จำนวน 5 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียทุกชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* PA test, *P. fluorescens* PF, *P. putida* PPio1, *P. putida* PPio2 และ *P. oryzihabitans* PO ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ไว้ทดสอบในการศึกษาในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 21 และยกตัวอย่างภาพผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. fluorescens* PF ในภาพ 21

ตารางที่ 21 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน กลุ่มไม่หมักย่อยน้ำตาล
กลูโคส ในสกุล *Pseudomonas* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาชวยแซ่แข็ง

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (μg)	ความไวต่อสารปฏิชีวนะ				
		<i>P. aeruginosa</i> PA test	<i>P. fluorescens</i> PF	<i>P. putida</i> PPio1	<i>P. putida</i> PPio2	<i>P. oryzae</i> PO
Cephalosporins	Ceftazidime (30)*	S	S	S	S	S
Monobactams	Aztreonam (30)	S	S	S	S	S
Carbapenems	Meropenem (10)	S	S	S	S	S
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	S	S	S	S	S
	Amikacin (30)	S	S	S	S	S
	Tobramycin (10)	S	S	S	S	S
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	S	S	S	S	S

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, *กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3



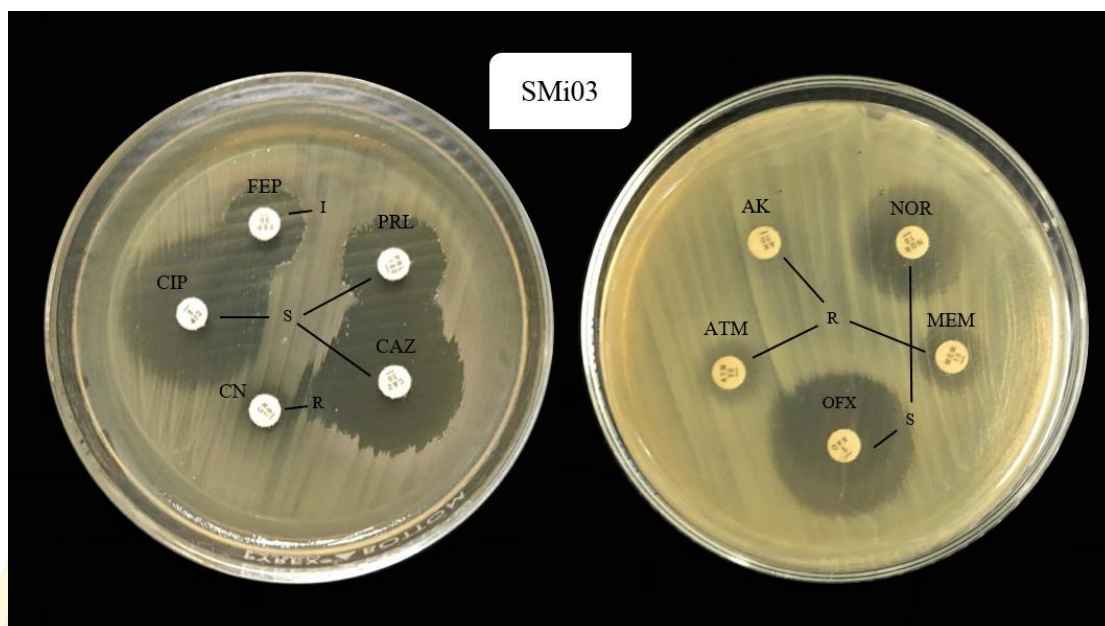
ภาพ 21 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. fluorescens* (PF) ด้วยวิธี disk diffusion
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM),
Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)

จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ได้แก่ *S. maltophilia* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตายแช่แข็งพบว่า *S. maltophilia* ทั้ง 3 ไอโซเลท คือต่อสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่ Aztreonam, Meropenem และ Gentamicin และยังพบว่า *S. maltophilia* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ *S. maltophilia* SMio1 และ *S. maltophilia* SMio3 ที่คือต่อ Amikacin ดังแสดงในตารางที่ 22 และภาพ 22

ตารางที่ 22 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสาวยแซ่แข็ง

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ความไวต่อสารปฏิชีวนะ		
		<i>S. maltophilia</i> SMio1	<i>S. maltophilia</i> SMio2	<i>S. maltophilia</i> SMio3
Penicillins	Piperacillin (100)*	I	I	S
Cephalosporins	Ceftazidime (30)**	S	S	S
	Cefepime (30)***	I	I	S
Monobactams	Aztreonam (30)	R	R	R
Carbapenems	Meropenem (10)	R	R	R
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	R	R	R
	Amikacin (30)	R	S	R
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	S	S	S
	Norfloxacin (10)	S	S	S
	Ofloxacin (5)	S	S	S

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คี้อต่อสารปฏิชีวนะ
 *ยาในกลุ่มเพนิซิลลินในกลุ่มย่อยแอนตี้ซูโดโมนอล เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3, ***กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4



ภาพ 22 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi03) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คีดต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Gentamicin (CN), Ciprofloxacin (CIP), Cefepime (FEP), Amikacin (AK), Aztreonam (ATM), Ofloxacin (OFX), Meropenem (MEM) และ Norfloxacin (NOR)

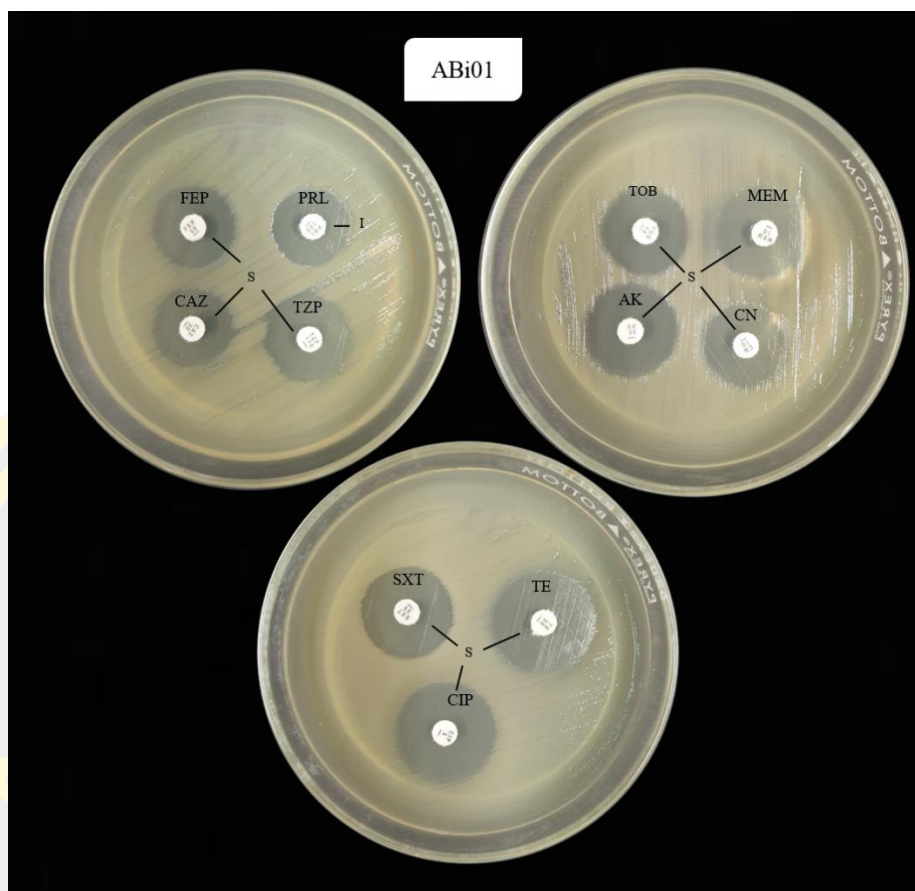
จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ได้แก่ *A. baumannii* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาซวยแซ่แข็งพบว่า *A. baumannii* ทั้ง 3 ไอโซเลท ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ใช้ทดสอบในการศึกษาในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 23 และภาพ 23

ตารางที่ 23 ความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสาวย่างแห้ง

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ความไวต่อสารปฏิชีวนะ		
		<i>A. baumannii</i> ABio1	<i>A. baumannii</i> ABio2	<i>A. baumannii</i> ABio3
Penicillins	Piperacillin (100)*	I	I	I
	Piperacillin-tazobactam** (30/6)	S	S	S
Cephalosporins	Ceftazidime (30)***	S	S	S
	Cefepime (30)****	S	S	S
Carbapenems	Meropenem (10)	S	S	S
Tetracyclines	Tetracycline (30)	S	S	S
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	S	S	S
	Amikacin (30)	S	S	S
	Tobramycin (10)	S	S	S
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	S	S	S
Folate pathway inhibitors	TMP/SMX***** (1.25/23.75)	S	S	S

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ

*ยาในกลุ่มเพนิซิลลินในกลุ่มย่อยแอนตี้ซูโดโมนอล เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **ยาในกลุ่มเพนิซิลลินในกลุ่มย่อยสารยับยั้งเบต้าแลคแทม (Beta-Lactamase Inhibitors) ***กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3, ****กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4, *****Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX)



ภาพ 23 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi01) ด้วยวิธี disk diffusion S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CFP), Piperacillin-tazobactam (TZP), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Tetracycline (TE) และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)

จากการศึกษารูปแบบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาซวยแซ่แข็งพบว่า แบคทีเรีย 8 ไอโซเลท คิดเป็น 44.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ ได้แก่ *P. aeruginosa* PA test, *P. fluorescens* PF, *P. putida* PPio1, *P. putida* PPio2, *P. oryzihabitans* PO, *A. baumannii* ABi01, *A. baumannii* ABi02 และ *A. baumannii* ABi03 นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ 2, 3, 4 และ 5 ชนิด มีจำนวน 3, 1, 5 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 รูปแบบความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
สวายแช่แข็ง

รูปแบบการดื้อต่อสารปฏิชีวนะ	จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ)
ไม่พบการดื้อต่อสารปฏิชีวนะ	8 (44.5)
ดื้อต่อสารปฏิชีวนะชนิดเดียว	0
ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 2 ชนิด	3 (16.7)
ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด	1 (5.5)
ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 4 ชนิด	5 (27.8)
ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 5 ชนิด	1 (5.5)
รวม	18 (100)

เมื่อจำแนกการดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน (Multi Drug Resistance; MDR) แบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งพบว่า *Ko. kristinae* KO, *S. maltophilia* SMio1, *S. maltophilia* SMio2 และ *S. maltophilia* SMio3 จัดเป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 3 ขนาน ส่วน *K. sedentarius* KSio1, *K. sedentarius* KSio2 และ *K. sedentarius* KSio3 จัดเป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 4 ขนาน และ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทไม่จัดเป็นแบคทีเรียดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน เนื่องจากดื้อต่อสารปฏิชีวนะเพียง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 รูปแบบการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลา
สวายแช่แข็ง

ไอโซเลท	รูปแบบการดื้อ	ระดับการดื้อยาหลายขนาน (กลุ่มสารปฏิชีวนะ)
<i>Ko. kristinae</i> KO	Tetracycline, Clindamycin, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin	MDR3 (Tetracyclines, Quinolones, Lincomycins)
<i>K. sedentarius</i> KSio1, <i>K. sedentarius</i> KSio2, <i>K. sedentarius</i> KSio3	Penicillin, Norfloxacin, Nitrofurantoin, Clindamycin	MDR4 (Penicillins, Quinolones, Nitrofurans, Lincomycins)
<i>B. cereus</i> BCio1, <i>B. cereus</i> BCio2, <i>B. cereus</i> BCio3	Penicillin, Tetracycline	-
<i>S. maltophilia</i> SMio1, <i>S. maltophilia</i> SMio3	Aztreonam, Meropenem, Gentamicin, Amikacin	MCR3 (Monobactams, Carbapenems, Aminoglycosides)
<i>S. maltophilia</i> SMio2	Aztreonam, Meropenem, Gentamicin	MCR3 (Monobactams, Carbapenems, Aminoglycosides)

หมายเหตุ การดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน (Multi-drug resistance; MDR) คือ ไอโซเลทที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 3 กลุ่ม (MDR3) และ 4 กลุ่ม (MDR4)

เมื่อศึกษาความไวสารต้านจุลชีพที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299 พ.ศ.2549 ของแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนและรูปกลม ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งทั้ง 7 ไอโซเลท พบว่า *K. sedentarius* ทั้ง 3 ไอโซเลท ไวต่อ Nitrofurantoin สารปฏิชีวนะกลุ่มไนโตรฟูแรนส์ ในขณะที่ *Ko. kristinae* KO, *B. cereus* BCio1, *B. cereus* BCio2 และ *B. cereus* BCio3 ไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้ สำหรับการศึกษความไวต่อ Chloramphenicol พบว่า *Ko. kristinae* KO, *K. sedentarius* KSio2 และ *B. cereus* BCio1 ไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้ (ตารางที่ 26) โดยการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของแบคทีเรียแกรมลบ และไม่ได้ทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางที่ 26 ความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของแบคทีเรียแกรม บวกที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสายแช่แข็ง*

สารปฏิชีวนะ	ไอโซเลทที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ	ไอโซเลทที่คือต่อสารปฏิชีวนะ
Nitrofurantoin (300)**	<i>Ko. kristinae</i> KO, <i>B. cereus</i> BCio1, <i>B. cereus</i> BCio2, <i>B. cereus</i> BCio3	<i>K. sedentarius</i> KSio1, <i>K. sedentarius</i> KSio2, <i>K. sedentarius</i> KSio3
Chloramphenicol (30)**	<i>Ko. kristinae</i> KO, <i>K. sedentarius</i> KSio2, <i>B. cereus</i> BCio1, <i>B. cereus</i> BCio2, <i>B. cereus</i> BCio3	-

หมายเหตุ *ไม่มีสารต้านจุลชีพที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 พ.ศ.2550 ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้

**สารต้านจุลชีพที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299 พ.ศ.2549

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำเชื้อสดปลาสาวยมีการปนเปื้อนแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดสูงที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ $5.17 \pm 0.25 \times 10^3$ - $9.27 \pm 0.75 \times 10^4$ CFU/mL และจัดจำแนกได้เป็นแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. oryzihabitans*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii*

2. จากการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสาวยที่บรรจุในหลอด 3 ขนาด และแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวนาน 6 วัน พบว่าน้ำเชื้อปลาสาวยในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ก่อนนำมาลดอุณหภูมิและน้ำเชื้อหลังแช่แข็งนาน 30 นาที มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 3.83 ± 0.26 - $4.35 \pm 0.49 \times 10^4$ CFU/mL ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดทั้ง 3 ขนาด และแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ถึง 6 วัน ที่มีปริมาณระหว่าง 1.18 ± 0.15 - $1.89 \pm 0.02 \times 10^4$ CFU/mL โดยแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งเหมือนกับแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อสด กล่าวคือ มีการปนเปื้อนของ *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* แบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในน้ำเชื้อ ได้แก่ *P. fluorescens* (40.85 – 80.26 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่ไม่พบในน้ำเชื้อสด 2 ชนิด ได้แก่ *Ko. kristinae* ที่พบในน้ำเชื้อหลังการเจือจางด้วย Ca-F HBSS ก่อนขั้นตอนการนำมาลดอุณหภูมิ และ *P. aeruginosa* ที่พบในน้ำเชื้อหลังจากบรรจุในหลอดก่อนนำไปลดอุณหภูมิ

3. จากการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสาวยที่บรรจุในหลอด 3 ขนาด และแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 180 วัน พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ 196 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดทั้ง 3 ขนาด เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในน้ำเชื้อหลังแช่แข็งนาน 30 นาทีจนถึง 180 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าแนวโน้มของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีปริมาณมากที่สุดตลอดระยะเวลา 180 วัน ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดทั้ง 3 ขนาด ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานาน 180 วัน มีความเหมือนกัน ได้แก่ *P. putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus*, *A. baumannii* และ

P. oryzihabitans โดย *K. sedentarius* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (19.86 – 93.90 เปอร์เซ็นต์) และรองลงมาคือ *B. cereus* (5.81 – 70.38 เปอร์เซ็นต์)

4. จากการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสาวยที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส นาน 90 วัน พบว่าน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS และเดมซาร์ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO และบรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดสูงกว่าน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อหลังแช่แข็งที่บรรจุลงในหลอดขนาด 0.5 และ 2.5 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่า ระยะเวลา ($F=12.92$ และ $P=0.00$) และอุณหภูมิ ($F=5.72$ และ $P=0.004$) ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็ง และเมื่อทำการวิเคราะห์อิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลา อุณหภูมิ และขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่า ทั้ง 3 ปัจจัย มีปฏิสัมพันธ์กัน ($F=6.74$ และ $P=0.000$) แต่ปัจจัยขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อไม่มีอิทธิพลร่วมกับปัจจัยทั้ง 2 และทำให้สัมประสิทธิ์การตัดสินใจลดลง (Adjusted R square = 57.33 เปอร์เซ็นต์) แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *P. putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* สัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง โดยแบคทีเรียเด่นที่พบ ได้แก่ *K. sedentarius* (4.55 – 97.38 เปอร์เซ็นต์)

5. จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็ง พบว่าแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท คิดเป็น 44.5 เปอร์เซ็นต์ ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ทดสอบ ได้แก่ *P. aeruginosa* PA test, *P. fluorescens* PF, *P. putida* PPio1, *P. putida* PPio2, *P. oryzihabitans* PO, *A. baumannii* ABio1, *A. baumannii* ABio2 และ *A. baumannii* ABio3 และแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท คิดเป็น 38.9 เปอร์เซ็นต์ คือต่อสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิดที่ทดสอบ โดย *Ko. kristinae* KO, *S. maltophilia* SMio1, *S. maltophilia* SMio2 และ *S. maltophilia* SMio3 จัดเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด ส่วน *K. sedentarius* KSio1, *K. sedentarius* KSio2 และ *K. sedentarius* KSio3 จัดเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ 4 ชนิด

อภิปรายผลการทดลอง

1. การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาดต่างกันและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

ในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการศึกษาถึงวิธีการพัฒนาเทคนิคของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากันอย่างแพร่หลาย เช่น ปลาตะเพียนขาว ปลาดุกเทศ ปลานิล ปลาซิว และปลาเทโพ เป็นต้น (Boonthai et al., 2016a; ศิริพร ชุรัตน์ และคณะ, 2548; วสันต์ ป้อมเสมา, 2552; สมร พรชื่นชูวงศ์ และคณะ, 2550; เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ Bart, 2551) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพที่ดีสำหรับนำไปใช้ในการผสมเทียม จากการศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาซิวในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อสดปลาซิวมีปริมาณเท่ากับ $5.17 \pm 0.25 \times 10^3$ - $9.27 \pm 0.75 \times 10^4$ CFU/mL ซึ่งปริมาณของแบคทีเรียที่พบมีความคล้ายกับการศึกษาของ Boonthai et al. (2016d) ที่ศึกษาแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรวบรวมด้วย 4 เทคนิค ได้แก่ การรีดน้ำเชื้อด้วยมือโดยไม่ล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ การรีดน้ำเชื้อด้วยมือหลังจากล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ การใช้สายสวนในการเก็บน้ำเชื้อโดยไม่ล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ และการใช้สายสวนในการเก็บน้ำเชื้อหลังจากล้างบริเวณช่องเพศด้วยน้ำปราศจากเชื้อ โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสดปลาตะเพียนขาวมีปริมาณอยู่ในช่วง 10^3 - 10^5 CFU/mL แต่อย่างไรก็ตาม วิรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2552) พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสดปลาดุกอยู่ในปริมาณที่สูงมาก คือมีปริมาณเท่ากับ 3.00×10^7 CFU/mL สำหรับการศึกษาในต่างประเทศ เช่น การศึกษาของ Barker, Smith & Bromage (1989) พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อสดของปลาเทราต์สายรุ้งและปลาเทราต์สีน้ำตาล (*Salmo trutta*) อยู่ในช่วง 10 - 10^2 CFU/mL สาเหตุของการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้ออาจเกิดจากหลาย ๆ ปัจจัย เช่น การปนเปื้อนในขณะที่รีดน้ำเชื้อจากแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนผิวหนังของปลาหรือครีบกันของปลา (Boonthai et al., 2016a) เนื่องจากบริเวณผิวหนังของปลามีแบคทีเรียหลากหลายชนิดอาศัยอยู่ เช่น *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* spp., *Bacillus licheniformis*, *Alcaligenes* spp., *Enterobacter aerogenes* และ *E. coli* เป็นต้น (Akinyemi & Buoro, 2011) หรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียอาจเกิดจากอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการบรรจุหรือเก็บน้ำเชื้อ เช่น ภาชนะที่ใช้เก็บน้ำเชื้อหลังการรีดน้ำเชื้อออกมาจากตัวปลา

การศึกษานี้พบแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด 7 ชนิดในน้ำเชื้อสดปลาซิว ได้แก่ *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. oryzihabitans*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus* และ *A. baumannii* แบคทีเรียดังกล่าวหลายชนิดจัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการก่อโรคและ

ฉวยโอกาสในการก่อโรคทั้งในคนและในสัตว์ โดย *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บนผิวหนังของปลาน้ำจืด (Austin, 2006) รวมถึงมีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ในลำไส้ของปลาตู้ก้อฟริกกัน (สุบฉฉฉฉ ฉฉฉฉฉฉ, วรรณฉฉฉฉ ฉฉฉฉฉฉ, ฉฉฉฉฉฉ ฉฉฉฉฉฉ และฉฉฉฉฉฉ ฉฉฉฉฉฉ, 2553) และน้ำที่ฉฉฉฉ ฉฉฉฉฉฉ และน้ำฉฉฉฉที่ปนเปื้อนฉฉฉฉฉฉและปัสสาวะของปลาฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉ (Boonthai et al., 2016a) ความสำคัญของ *P. fluorescens* กล่าวได้ว่าเป็นสาเหตุหลักที่ก่อโรคสำคัญกับปลาน้ำจืด และเป็นเชื้อก่อโรคฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉสำหรับปลาน้ำเค็มและน้ำกร่อย (Hadi, Morshino, & Das, 2002; Alicia, Toranzo, Magarinos, & Romalde, 2004) โรคที่พบในปลาน้ำจืดที่เกิดจาก *P. fluorescens* คือ โรค hemorrhagic septicemia ซึ่งเป็นการติดเชื้อในกระแสเลือด มีอาการเลือดออกตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น ครีบ หาง หรือผิวหนัง โดยเห็นรอยโรคเป็นจุดเลือดออกหรือเป็นแผลหลุมตามผิวหนังมีอาการคล้ายกับการติดเชื้อในกระแสเลือดจาก *Aeromonas* (สุริยาฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉ, 2560; Najeeb & Mudarris, 2014)

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* อีกชนิดหนึ่งที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ คือ *P. putida* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาน้ำจืดอีกชนิดหนึ่งที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ โดยทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด โรคสตอว์เบอร์รี่ (Strawberry disease) (Pekala-Safiniska, 2018) และเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (Taneja, Meharwal, Sharma, & Sharma, 2004) สำหรับเชื้อ *P. oryzihabitans* ที่ตรวจพบในครั้งนี้ เดิมคือแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Flavimonas oryzihabitans* พบได้ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในนาข้าว ไม่มีรายงานในการก่อโรคในสัตว์น้ำ แต่มีการฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉในการก่อโรคในมนุษย์ เช่น การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง โดยมีรายงานถึงการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยที่ได้รับการฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉ และผู้ป่วยมะเร็งฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉ นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อ *P. oryzihabitans* จากแผลที่โดนปลาหมึกยักษ์ (*Octopus vulgaris*) กัดในเด็กอายุ 9 ปี (Owusu et al., 2017; Aigner, Ollert, Seifert, Ring, & Plötz, 2011)

S. maltophilia ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำ ดิน อาหาร หรือสิ่งมีชีวิตทั้งในคนและสัตว์ (Adegoke, Stenström & Okoh, 2017) มีความสามารถในการก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาตู้ก้อฟริกกันที่ป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบ (Abraham, Paul, Adikesavalu, Patra, & Banerjee, 2016) *K. sedentarius* ที่ตรวจพบในครั้งนี้เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่มีรายงานในการก่อโรคในปลา แต่พบว่าอาศัยในสิ่งแวดล้อมพบได้ทั้งในดิน น้ำ อากาศ รวมถึงบนผิวหนังของมนุษย์ และเป็นแบคทีเรียฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉในการก่อโรคทางการแพทย์ในมนุษย์ เช่น ปอดบวม ติดเชื้อในกระแสเลือด หรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Levenga et al., 2004) สำหรับ *B. cereus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ พบบ่อยในการปนเปื้อนอาหาร (Kamar et al., 2013) มีการรายงานถึงการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉฉที่เก็บรักษา

น้ำเชื้อแช่แข็งจากฟาร์มในรัฐริโอกรันด์ิซูซูล ทางตอนใต้ของประเทศบราซิลถึง 31.57 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างทั้งหมด 133 ตัวอย่าง (Pessoa, Rubin, Silva & da Rosa, 2014) ทั้งนี้ยังพบการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในถุงน้ำเชื้อกึ่งกุลาคำแช่แข็ง (Nimrat et al., 2008) และ *A. baumannii* ที่เป็นอีกหนึ่งในแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด รวมถึงก่อให้เกิดโรคปอดอักเสบในมนุษย์ (ชาญกิจ พุฒิเลอพงค์, วรางคณา ชวนะสิทธิ์, วัลภา เลาหะวลีสันต์, วิกานดา รุ่งแวง และพวงเพ็ญ ฤทธิวีรกุล, 2554) และพบว่ามีกรปนเปื้อนในน้ำเชื้อแช่แข็งในมนุษย์ (Joaquim, Borges, Viana, Navarro, & Vireque, 2017)

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดของน้ำเชื้อปลาสาวยที่เติม Ca-F HBSS กับ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO ที่บรรจุในหลอดขนาดต่าง ๆ ทั้งก่อนแช่แข็งและหลังแช่แข็งนาน 30 นาที มีความใกล้เคียง สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonthai et al. (2016d) ที่ได้ศึกษาวิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยมือหลังการล้างช่องเพศด้วยน้ำสะอาด โดยพบว่าน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS กับ 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO ก่อนแช่แข็งและหลังแช่แข็งนาน 20 นาที มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างจากรายงานของ สุบัณฑิต นิมรัตน์ อจิราภา สัจจรงค์ และวีรพงศ์ ภูฒิพันธุ์ชัย (2554) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาอุกอัฟริกันที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS ก่อนนำไปแช่แข็งมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบในน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในวันแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตามปกติแล้วการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ต้องเติมสารป้องกันอันตรายจากความเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็งในระหว่างการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็ง เช่น DMSO, glycerol, propylene glycol, formamide หรือ ethanol เป็นต้น (Vuthiphandchai et al., 2009) โดย DMSO เป็นสารที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เช่น ปลาเทโพ ปลาสาวย ปลาบึก ปลาซาร์อาร์คติก ปลาเทราต์สายรุ้ง ปลาอุกอัฟริกัน และปลาตะเพียนขาว เป็นต้น (Omitogun et al., 2010; Richardson et al., 2000; Stoss, Buyukhatipoglu & Holtz, 1978; Vuthiphandchai et al., 2015; ศิริพร คชรัตน์ และคณะ, 2548; เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ Bart, 2551; อนงคนันท์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2539) เนื่องจาก DMSO มีคุณสมบัติในการซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ที่ดี (ภัทรชัย กฤศทิวานนท์, 2561) ดังนั้นด้วยคุณสมบัติเป็นสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งของ DMSO จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้แบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสาวยก่อนแช่แข็งและหลังแช่แข็งนาน 30 นาที มีปริมาณแบคทีเรียไม่แตกต่างกัน เนื่องจาก DMSO ช่วยป้องกันอันตรายให้กับทั้งเซลล์น้ำเชื้อปลาและเซลล์แบคทีเรียในขณะลดอุณหภูมิ แต่อย่างไรก็ตามหลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 2-6 วัน พบปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียในหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 ขนาด ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

($P < 0.05$) การลดลงของแบคทีเรียสอคคล้องกับการศึกษาของ Nimrat et al. (2008) ที่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดลดลงหลังจากทำการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำและเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 210 วัน ซึ่งคณะผู้วิจัยดังกล่าวได้ตั้งข้อสมมติฐานไว้ว่าการลดลงของแบคทีเรียอาจเกี่ยวข้องกับความเร็วต่ออุณหภูมิของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ที่มีความต้านทานต่อความเย็นน้อยกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (Nimrat et al., 2008)

การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาดต่าง ๆ และเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 6 วัน พบแบคทีเรียในน้ำเชื้อ 7 ชนิด ได้แก่ *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus*, *A. baumannii*, *Ko. kristinae* และ *P. aeruginosa* โดย *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (40.85 – 80.26 เปอร์เซ็นต์) ตามปกติแล้วชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำเชื้อขึ้นอยู่กับพฤติกรรมของปลา อาหาร และสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ (Austin, 2006) ซึ่ง *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในปลาน้ำจืด โดยพบได้ในน้ำที่เพาะเลี้ยงปลาหรือบนผิวหนังของตัวปลา น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะ รวมถึงในลำไส้ของปลา (Boonthai et al., 2016a; สุบัญญัติ นิมรัตน์ และคณะ, 2554) นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่ไม่พบในน้ำเชื้อสด ได้แก่ *Ko. kristinae* ที่พบในน้ำเชื้อหลังการเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ *P. aeruginosa* ที่พบในน้ำเชื้อหลังจากบรรจุในหลอดก่อนนำไปลดอุณหภูมิ โดย *P. aeruginosa* แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม มีการรายงานว่า *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาลหรือคลินิก (นิธิตา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธิจิตต์, สิตานันท์ พูลผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ชวนชื่น และภูษิต ประครองสาย, 2558) รวมถึงมีรายงานถึงการปนเปื้อนของ *P. aeruginosa* ในถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแช่แข็ง (Nimrat et al., 2008) และ Abdullahi et al. (2013) สามารถแยก *P. aeruginosa* ได้จากตัวอย่างปลา กุ้ง และตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำ Sampadi ประเทศมาเลเซีย ส่วน *Ko. kristinae* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือในธรรมชาติ และไม่มีอาการก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ (Lakshmikantha, Devki & Yogesh, 2015) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ซึ่งอาจมาจากสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการหรืออุปกรณ์ที่ใช้ปฏิบัติงานที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ และการขาดสุขอนามัยที่ดีของห้องปฏิบัติการ (Brock, 1998; Schiewe, 1998) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีมาตรการทางสุขอนามัยต่าง ๆ ที่จำเป็นในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อตั้งแต่การรีดน้ำเชื้อจนไปถึงการใช้ประโยชน์น้ำเชื้อเพื่อป้องกันความเสียหายของสเปิร์มที่เกิดจากแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น เซลล์แบคทีเรียและสารเมแทบอลิท์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของสเปิร์มส่งผลให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง (Diemer et al., 2003) รวมทั้งเพื่อ

ป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคในปลาที่สามารถติดต่อจากปลารุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่งโดยผ่านเซลล์สืบพันธุ์ น้ำหล่อเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์และการผสมเทียม เช่น *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* และ *Shewanella putrefaciens* เป็นต้น (Pradeep et al., 2017; Boonthai et al., 2018)

2. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 180 วัน

ถึงแม้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) จะสามารถยืดระยะเวลาการมีชีวิตของสเปิร์มไว้ได้นาน (Fuller & Paynter, 2004) แต่ยังคงพบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งเช่นเดียวกัน โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสวายในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 โดยตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษามาจากปลาสวายที่เลี้ยงในบ่อดินจากคนละบ่อกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไม่มีผลต่อปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เนื่องจากตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง 180 วัน แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ตรวจพบได้จากหลอดทั้ง 3 ขนาด มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับ Boonthai et al. (2016b) ที่พบว่าน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO มีปริมาณแบคทีเรียก่อนนำไปแช่แข็ง หลังแช่แข็ง และจนถึงวันที่เก็บเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 360 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Nimrat et al. (2008) พบปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งในระยะเวลา 210 วัน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา 1 ชั่วโมง การคงที่ของปริมาณแบคทีเรียในการศึกษาในครั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับ Ca-F HBSS ซึ่งเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด ตามปกติแล้วสารละลายเจือจางน้ำเชื้อมักประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น นม ซีรัมหรือซีรัมอัลบูมิน น้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล หรือน้ำตาลอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติช่วยรักษาความเสถียรภายในเซลล์ที่อยู่ในสถานะแช่แข็ง ป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด - ด่าง รักษาแรงดันออสโมติกและเป็นแหล่งพลังงานของสเปิร์ม ซึ่งสารดังกล่าวนอกจากจะช่วยป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์สเปิร์มแล้วยังอาจช่วยทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นได้เช่นกัน (Bielanski & Vajta, 2009) นอกจากนี้การใช้ DMSO เป็นสารป้องกันความเย็นในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในครั้งนี้ น่าจะมีบทบาทในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อเช่นเดียวกัน (สุกิจ ประทุมชัย และ ชนรัตน์ จานุกิจ, 2558) การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถลดกิจกรรมทางชีวเคมี

ของเซลล์ได้ (Jang et al., 2017) จึงทำให้ไม่เกิดการเพิ่มหรือลดจำนวนของปริมาณแบคทีเรีย อีกทั้งแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างแคปซูล (Capsule) หรือสปอร์ (Spore) ที่ทำให้สามารถมีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Norris, Watral & Kent, 2018)

นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าแนวโน้มของปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีปริมาณมากที่สุดตลอดระยะเวลา 180 วัน ที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันของหลอดบรรจุน้ำเชื้อปลาสดแต่ละขนาด ในการศึกษาครั้งนี้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ถูกวางเหนือไนโตรเจนเหลว 6, 3 และ 3 เซนติเมตร ในกล่องโฟม เป็นระยะเวลา 15, 10 และ 10 นาที ตามลำดับ ถึงแม้ว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร จะวางเหนือไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 10 นาที เหมือนกัน แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดทั้งสองแตกต่างกัน ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อปลาสดภายในหลอดบรรจุทั้งสามขนาดย่อมแตกต่างกัน ตามปกติแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดบรรจุน้ำเชื้อมีอิทธิพลต่ออัตราการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง โดยหลอดน้ำบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่จะมีอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วกว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดเล็ก (Ohta, Kawamura, Unuma & Takegoshi, 2001) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วของหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 4 มิลลิลิตร มีบทบาทช่วยรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนน้ำเชื้อ ยกตัวอย่างเช่น Calcott (1985) พบว่าการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ทำให้ *E. coli* รอดชีวิตได้สูงกว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 1-2 องศาเซลเซียสต่อนาที เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Palmitoleic acid หรือ Linolenic acid เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในขณะที่ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาดทั้ง 3 ขนาดยังมีความแตกต่างกันอีกด้วย โดยน้ำเชื้อปลาสดในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิเมตร ถูกนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5, 15 และ 18 วินาที ตามลำดับ ดังนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้ออาจเป็นอีกปัจจัยที่มีผลทำให้การรอดชีวิตของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสดที่บรรจุในหลอดขนาด 4.0 มิลลิลิตร มีแนวโน้มสูงกว่าหลอดขนาดอื่น

การศึกษานี้พบแบคทีเรีย 6 ชนิด ที่แยกได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดทั้ง 3 ขนาด ได้แก่ *P. putida*, *S. maltophilia*, *K. sedentarius*, *B. cereus*, *A. baumannii* และ *P. oryzihabitans* ซึ่งมีความคล้ายกับการทดลองในหัวข้อก่อนหน้านี้ แต่อย่างไรก็ตามทั้ง ๆ ที่แบคทีเรียที่แยกได้จากการทดลองในหัวข้อทั้งสองนี้จะมาจากตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสดเหมือนกัน แต่ชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียที่แยกได้มีความแตกต่างกัน กล่าวคือ การทดลองในหัวข้อแรกนั้นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือน้ำเชื้อ ได้แก่ *P. fluorescens* (40.85 – 80.26 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่การ

ทดลองในหัวข้อที่สองนี้ *P. oryzihabitans* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสาวยที่ไม่พบในหัวข้อการทดลองก่อนหน้านี้ และ *K. sedentarius* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (19.86 – 93.80 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ *B. cereus* (5.81 – 70.38 เปอร์เซ็นต์) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับช่วงเวลาในการเก็บน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน รวมทั้งปัจจัยทางสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงปลาสาวยที่ต่างกัน ถึงแม้ว่าการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อของการทดลองทั้งสองหัวข้อนี้ได้ดำเนินการรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาสาวยที่มาฟาร์มเดียวกัน แต่ได้รีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในบ่อต่างกันวันระยะห่างในการรีดน้ำเชื้อประมาณ 3 เดือน ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้อาจทำให้ปริมาณและความหลากหลายของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสาวยมีการเปลี่ยนแปลง ดัง การศึกษาของ Al-Harbi & Uddin (2005) ที่พบว่าชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของปลาไน (*Oreochromis niloticus*) ในบ่อดินมีความแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาล ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดพบได้ในบางฤดูเท่านั้น เช่น *Pseudomonas* sp. ที่พบได้ในฤดูหนาว เป็นต้น

3. การปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็งที่บรรจุในหลอดขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

จากตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสาวยที่เก็บในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 และรีดน้ำเชื้อจากปลาสาวยที่เลี้ยงในบ่อดินคนละบ่อกับการศึกษาทั้ง 2 ก่อนหน้านี้ พบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อสดในการศึกษานี้มีปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียน้อยกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO ที่บรรจุลงในหลอดขนาดต่าง ๆ ก่อนนำไปแช่แข็งดังที่กล่าวไว้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างการเตรียมน้ำเชื้อปลาเพื่อแช่แข็ง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ (หลอดบรรจุสารที่ใช้ในการผสมน้ำเชื้อ เครื่องแก้วที่ใช้ในการผสมน้ำเชื้อ ฯลฯ) รวมถึงสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ในห้องปฏิบัติการสามารถเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในตัวอย่างได้ ดังรายงานของ Goldberg, Cardoso, Bernardi, Wentz, & Bortolozzo (2017) ที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (Extender) หมูป่า (Boar) มากกว่า 220 CFU/mL ซึ่งสาเหตุนี้อาจเป็นสิ่งที่ทำให้พบปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS และ 18 เปอร์เซ็นต์ DMSO มากกว่าน้ำเชื้อสด นอกจากนี้เมื่อทำการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อ พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหลอดบรรจุน้ำเชื้อแต่ละขนาดมีปริมาณลดลงจากก่อนทำการแช่แข็ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุภัณฑิลา นิมรัชนี อจิราภา สัจจรดี และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554) ที่พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำเชื้อปลาคู่อัฟริกันก่อนนำไปแช่แข็งมีมากกว่าในน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งและน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในวันแรกของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($P < 0.05$) การลดอุณหภูมิการแช่แข็งน้ำแข็งอาจมีส่วนทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำแข็งลดลง เพราะการลดอุณหภูมิเป็นการเปลี่ยนของเหลวภายในเซลล์ให้มีสถานะเป็นของแข็ง ซึ่งน้ำที่อยู่ภายในและภายนอกของเซลล์จะเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) หากมีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเซลล์ไม่เกิดการสูญเสียน้ำแต่เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (Intracellular ice crystal) ทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ แต่ถ้าทำการลดอุณหภูมิที่ช้าเกินไป เซลล์จะเกิดการสูญเสียน้ำ และส่งผลให้ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์เสียสมดุล (Solution effect) (ภัทรชัย กฤษทิวานนท์, 2561; อมรรัตน์ กิระวานิชย์, 2559)

การศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษามีอิทธิพลต่อปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำแข็งพลาสติกแช่แข็ง โดยปริมาณแบคทีเรีย ณ อุณหภูมิ -80 และ -196 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มสูงกว่า ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตามปกติแล้วการเก็บรักษาเซลล์สิ่งมีชีวิตที่อุณหภูมิต่ำสามารถลดหรือหยุดยั้งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นทั้งหมดภายในเซลล์ การลดอุณหภูมิทุก ๆ 10 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการใช้ออกซิเจนลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นไปได้ว่าการผลิตอนุมูลอิสระที่เกิดจากออกซิเจน (Reactive oxygen species) ในระหว่างการเก็บรักษาลดลงไปด้วย (Levey & Gilbert, 2013; Viswanath & Shannon, 1997) โดยอุณหภูมิสูงกว่า -30 องศาเซลเซียส มักจะให้ผลการเก็บรักษาชีวิตเซลล์ที่ไม่ดี เพราะจะทำให้เกิดการผสมระหว่างเซลล์และสารประกอบในสารละลายต่าง ๆ (Eutectic mixture) และทำให้เซลล์ยังคงได้รับความเครียดจากความเข้มข้นเกลือสูงหรือจากสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ อาทิเช่น สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง ได้แก่ DMSO ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตของเซลล์ (ชุตินา วิไลพันธุ์, 2546) ตามรายงานของ Yuan et al. (2014) ที่ได้ศึกษาผลกระทบของสาร DMSO ต่อไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และเซลล์เกลียลแอสโตรไซติก (Astrocytes) ซึ่งพบว่า DMSO ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตและเหนี่ยวนำให้เซลล์เกลียลแอสโตรไซติกตาย (Apoptosis) พร้อมกับสร้างความเสียหายอย่างรุนแรงต่อไมโทคอนเดรีย การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส เช่น -80 และ -196 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำแข็งพลาสติกแช่แข็งได้ ดังรายงานวิจัยของ Oskouei, Bekmen, Ellidokuz, & Yilmaz (2010) ที่เปรียบเทียบการแช่แข็งแบคทีเรีย คือ *Helicobacter pylori* ที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียได้ดีกว่าอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการเก็บรักษามีอิทธิพลต่อปริมาณแบคทีเรียในน้ำแข็งพลาสติกแช่แข็ง การศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่พบในน้ำแข็งแช่แข็งมีปริมาณไม่คงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา โดย สุบัณฑิต นิมรัตน์ อจิราภา ตัญจรดี และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2554) รายงานว่า

ระยะเวลาในการแช่แข็งมีผลโดยตรงต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาอุกแอฟริกันแช่แข็ง คณะผู้วิจัยได้พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาอุกแอฟริกันแช่แข็งลดลงเกือบ 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาในถังไนโตรเจนนาน 90 วัน ทั้งนี้การลดลงของแบคทีเรียอาจเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อที่มีความไวต่ออุณหภูมิระดับเยือกแข็ง แต่อย่างไรก็ตามการศึกษางานฉบับพบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีปริมาณคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง เช่น น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่เก็บรักษานาน 12 เดือน (Boonthai et al., 2016b) ความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียที่เกิดขึ้นนี้อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นอัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายของน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด ความไวต่ออุณหภูมิค่าของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลา และกระบวนการรักษาความคงที่ของอุณหภูมิภายในถังไนโตรเจนเหลว เช่น ความถี่ในการเปิด-ปิดฝา การเติมไนโตรเจนเหลว และรักษาอุณหภูมิภายในห้องปฏิบัติการที่เก็บถังไนโตรเจนเหลว เป็นต้น (Bielanski, 2007) แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบอิทธิพลของขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่มีต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งยืนยันได้จากเมื่อนำขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาวิเคราะห์ห้สมการถดถอยพหุคูณร่วมกับปัจจัยทั้ง 2 โดยทำให้ความสามารถในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียลดลงจากการนำปัจจัยระยะเวลาในการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่เก็บรักษาน้ำเชื้อมาวิเคราะห์ ทั้งนี้ขนาดของหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อที่พบว่ามีปฏิสัมพันธ์กันกับระยะเวลาในการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ แต่ยังไม่มีการรายงานถึงอิทธิพลของขนาดหลอดที่ใช้แช่แข็งต่อความแปรปรวนของปริมาณของแบคทีเรีย แต่ทั้งนี้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อกับปัจจัยทั้ง 2 มีอิทธิพลต่อปริมาณของแบคทีเรีย อาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น อัตราการลดอุณหภูมิ หรืออัตราการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของหลอดแต่ละขนาด เนื่องจากอัตราการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อแช่แข็งแปรผันตามเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (Ohta et al., 2001) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ เช่น อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง เพื่อให้ทราบได้แน่ชัดว่าขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อมีผลต่อปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาแช่แข็งอย่างไร

จากการศึกษาทั้ง 3 การทดลองในครั้งนี้ กล่าวได้ว่าอาจมีปัจจัยเสี่ยงมากมายที่เป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียสู่น้ำเชื้อแช่แข็ง ตั้งแต่ขั้นตอนการรีดน้ำเชื้อจนถึงการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยแหล่งการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังของปลา ครีบกัน หรือน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์หรือภาชนะที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อ สารละลายน้ำเชื้อ อุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ อุปกรณ์ที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ เช่น ถังไนโตรเจนเหลว โตะที่ใช้

ปฏิบัติงาน บุคลากรที่ปฏิบัติงาน อากาศภายในห้อง หรือขั้นตอนในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เช่น น้ำที่ใช้ในการละลาย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดสุขลักษณะและมาตรการการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในน้ำเชื้อ เพื่อให้ให้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งปราศจากเชื้อก่อโรค มีคุณภาพสูงและสามารถนำไปผสมเทียมหรือปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Boonthai et al., 2016a; Goldberg et al., 2017; Bielanski, 2012)

4. ความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวย

K. sedentarius จัดเป็นแบคทีเรียที่พบได้บนผิวหนังของมนุษย์และไม่สร้างอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้ช่วยโอกาสก่อโรคในมนุษย์ เช่น โรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ เยื่อช่องท้องอักเสบ และการติดเชื้อทางเดินน้ำไขสันหลัง เป็นต้น (Levenga et al., 2004) จากการศึกษาครั้งนี้ *K. sedentarius* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวยคือต่อสารปฏิชีวนะ 4 ชนิด ได้แก่ Penicillin, Norfloxacin, Nitrofurantoin และ Clindamycin โดย Levenga et al. (2004) ได้แยก *K. sedentarius* จากผู้ป่วยโรคปอดอักเสบที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำและพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ คือ ต่อ Penicillin, Cefuroxime, Cefepime, Methicillin, Gentamicin และ Clarithromycin และไวต่อ Teicoplanin, Vancomycin, Doxycycline, Rifampicin และ Clindamycin และ Chaudhary & Finkle (2010) รายงานว่า *K. sedentarius* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการเยื่อช่องท้องอักเสบไวต่อ Ampicillin, Cephalothin, Ciprofloxacin, Oxacillin, Penicillin, Tetracycline และ Vancomycin แต่คือต่อ Erythromycin กลไกการคือต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาอย่างลึกซึ้ง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษากลไกการคือต่อ Penicillin, Norfloxacin, Nitrofurantoin และ Clindamycin ของแบคทีเรียชนิดนี้ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสวยต่อไป เพื่อบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดยีนคือยาของแบคทีเรียชนิดนี้ไปยังแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสวย ซึ่งอาจส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียมีความยุ่งยากซับซ้อนมากยิ่งขึ้น

S. maltophilia จัดเป็นแบคทีเรียช่วยโอกาสก่อโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อในกระแสเลือดและการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น (Zhang, Li, & Poole, 2000) การศึกษาในครั้งนี้พบว่า *S. maltophilia* มีอัตราการคือต่อสารปฏิชีวนะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล โดยทั้งสามไอโซเลทที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้คือต่อสารปฏิชีวนะเพียง 4 ชนิด ในกลุ่ม Monobactams (Aztreonam), Carbapenems (Meropenem) และ Aminoglycosides (Gentamicin และ Amikacin) เท่านั้น จากการศึกษาความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* ที่แยกได้จากสิ่งส่ง

ตรวจในโรงพยาบาลแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีอัตราการใช้ยาหลายชนิดสูง ยกตัวอย่างเช่น Chloramphenicol (18.2 เปอร์เซ็นต์), Trimethoprim-sulfamethoxazole (20.3 เปอร์เซ็นต์) และ Ceftazidime (72 เปอร์เซ็นต์) (Çikman, Parlak, Bayram, Güdücüoğlu, & Berktaş, 2016) ตามปกติแล้วแบคทีเรียชนิดนี้มักคือต่อยาปฏิชีวนะหลายขนานด้วยกลไกต่าง ๆ ได้แก่ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ให้สารปฏิชีวนะผ่านเข้าเซลล์ได้น้อยลง (Rahmati-Bahram, Magee & Jackson, 1996) การสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขับยาออกนอกเซลล์ (Efflux pump) เช่น โปรตีน SmeABC, SmeDEF และ SmeVWX เป็นต้น โดย SmeABC เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านสารปฏิชีวนะกลุ่ม Beta-lactam, Aminoglycosides และ Quinolones (Sánchez, 2015) ส่วน SmeDEF เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการต่อต้าน Chloramphenicol, Tetracycline และ Quinolones (Hernández, Ruiz, Romero & Martínez, 2011) นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์บางชนิดที่มีบทบาทในการทำลายโครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides เช่น Aminoglycoside phosphotransferase (Okazaki & Avison, 2007) และ N-aminoglycoside acetyltransferase (Sánchez, 2015) รวมทั้งยังผลิตเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น 2'-N-acetyltransferase, Streptomycin 3' phosphotransferase/kinase, Spectinomycin phosphotransferase และ Chloramphenicol acetyltransferase เป็นต้น (Crossman et al., 2008) สำหรับการต่อต้านสารปฏิชีวนะกลุ่ม Beta-lactam ของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจากการแสดงออกของยีน เช่น *ampN-ampG* operon ที่มีบทบาทในการลดการนำสารปฏิชีวนะกลุ่ม Beta-lactam เข้าสู่เซลล์ (Huang et al., 2010) และยีน *ampD1* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ N-acetyl-muramyl-L-alanine amidase ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ Beta-lactamase เพิ่มสูงขึ้น (Lin, Lin, Huang, Chung, & Yang, 2011; Yang, Huang, Hu, Huang, & Lin, 2009) จากกลไกการต่อต้านสารปฏิชีวนะเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการดื้อยาเกิดจากการแสดงออกของยีนทั้งสิ้นและเป็นยีนที่สามารถรับและถ่ายทอดได้ระหว่างแบคทีเรีย (Horizontal transfer) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษากลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม Monobactams, Carbapenems และ Aminoglycosides ของ *S. maltophilia* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดในการศึกษาในครั้งนี้ต่อไปในอนาคต รวมทั้งควรทำการเปรียบเทียบความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* ด้วยวิธี Disk diffusion method และ Agar dilution method ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่า *S. maltophilia* มีความไวต่อ Ceftazidime, Ciprofloxacin, Norfloxacin และ Ofloxacin ดังนั้นหากเกิดการติดเชื้อจาก *S. maltophilia* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาสดในครั้งนี้ย่อมทำให้สารปฏิชีวนะในกลุ่ม Cephalosporins และ Quinolones ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ควรเลือก (Drug of choice) ยังคงมีประสิทธิภาพในการรักษาอาการติดเชื้อจากแบคทีเรียชนิดนี้ (Sánchez, 2015)

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* บางชนิดที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตายในการศึกษานี้จัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในปลา คือ *P. putida* และ *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลา เช่น ปลาเทราท์สายรุ้ง ปลาหางเหลือง (*Seriola lalandi*) และปลาอวยะ (*Plecoglossus altivelis*) เป็นต้น โดยทำให้มีอาการติดเชื้อในกระแสเลือด แผลเปื่อย และตกเลือด (Pekala-Safinska, 2018) และ *P. aeruginosa* จัดเป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสและมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล เช่น การติดเชื้อที่บาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อหลังการผ่าตัดต่อกระดูก เป็นต้น (Bitsori Maraki, Koukouraki & Galanakis, 2012; Chamot, Amari, Rohner & Delden, 2003) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญและแพร่กระจายไปยังอวัยวะของผู้ป่วยในส่วนต่าง ๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วย โดยการสร้างสารพิษและเอนไซม์ต่าง ๆ (Virulence factors; Dunne, 2002; Strateva & Mitov, 2011) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ทุกไอโซเลท ได้แก่ *P. aeruginosa* PA test, *P. fluorescens* PF, *P. putida* PPio1, *P. putida* PPio2 และ *P. oryzihabitans* PO ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ แสดงให้เห็นถึงกลุ่มเชื้อนี้ที่แยกได้จากธรรมชาติ นั่นคือ น้ำเชื้อปลาตาย ไม่มีการดื้อสารปฏิชีวนะเหมือนเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมภายในโรงพยาบาลที่มีอุบัติการณ์การดื้อสารปฏิชีวนะสูง ยกตัวอย่างเช่น ภริตา บุญรักษา และคณะ (2556) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากผู้ป่วยโรคปอดอักเสบจากการติดเชื้อในโรงพยาบาล จำนวน 540 คน ที่มารับบริการที่โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี ตั้งแต่เดือน มกราคม พ.ศ. 2554 - ธันวาคม พ.ศ. 2555 โดยพบว่า *P. aeruginosa* ที่แยกได้มีอัตราการดื้อต่อ Ceftriaxone และ Imipenem เท่ากับ 37.5 เปอร์เซ็นต์ และ 23.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Dejsirilert, et al. (2009) ได้ศึกษาอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จาก 28 โรงพยาบาลที่เข้าร่วมโครงการกับศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาจุลชีพแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในช่วงปี พ.ศ. 2543 - 2548 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ดื้อต่อ Ceftazidime เท่ากับ 24.6- 27.4 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มพัฒนาเป็นแบคทีเรียกลุ่มดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายขนาน (Multidrug-resistant *P. aeruginosa*) ที่ดื้อต่อ Amikacin, Ciprofloxacin และ Ceftazidime ซึ่ง พบมากใน โรงพยาบาลที่ตั้งอยู่ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คิดเป็น 20-30 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแบคทีเรียที่นำมาศึกษา สำหรับการศึกษาคความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* เช่น *P. aeruginosa*, *P. putida*, และ *P. fluorescens* ที่แยกได้จากธรรมชาติ คือ แม่น้ำดานูบตลอดทั้งลำน้ำตั้งแต่ประเทศเยอรมนีจนถึงปากแม่น้ำในประเทศโรมาเนีย พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ ร้อยละ 37 ดื้อต่อสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิดที่ใช้ทดสอบ โดยสารปฏิชีวนะที่มีอุบัติการณ์ดื้อมากที่สุด คือ Meropenem (30.4 เปอร์เซ็นต์), Piperacillin/tazobactam (10.6 เปอร์เซ็นต์) และ Ceftazidime (4.2 เปอร์เซ็นต์) และ

แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* จำนวน 3.1 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นแบคทีเรียที่ติดต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน (Kittinger et al., 2016) ความแตกต่างของความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตายในครั้งนี้นี้กับรายงานก่อนหน้านี้ อาจเป็นเพราะแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับมนุษย์หรือสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งไม่ได้รับยีนดื้อยาจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่พบได้ในปลาตายและสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงปลาตาย แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* ที่แยกได้นี้จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำและแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคในคน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรค รวมทั้งศึกษายีนก่อโรคต่อไปในอนาคต

B. cereus จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่สำคัญในคน รวมทั้งยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณดวงตา บาดแผลและการติดเชื้อในกระแสเลือด ตามปกติแล้วแบคทีเรียชนิดนี้ติดต่อสารปฏิชีวนะกลุ่มเพนิซิลลิน เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์เบต้าแลคตาเมสทำลายโครงสร้างของยาได้ (Prod'hom & Bille, 2010) สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้นี้ที่พบว่า *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทติดต่อ Penicillin โดยทั่วไปแล้วยาปฏิชีวนะที่ควรเลือกใช้ก่อนในการรักษาอาการดวงตาติดเชื้อจากแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ Vancomycin ร่วมกับสารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides และ Clindamycin ร่วมกับ Gentamicin รวมทั้ง Ciprofloxacin ยังเป็นยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อบริเวณบาดแผลที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ (Prod'hom & Bille, 2010) ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้นี้ที่พบว่า *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทไวต่อสารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides (Gentamicin, Amikacin และ Tobramycin), Erythromycin และ Ciprofloxacin แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะเหล่านี้ยังมีประสิทธิภาพและใช้รักษาการติดเชื้อจาก *B. cereus* ได้ดี

A. baumannii เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสในการก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่าง ๆ ในโรงพยาบาล เช่น ปอดอักเสบที่เกี่ยวข้องกับเครื่องช่วยหายใจ (Ventilator-associated pneumonia, VAP) การติดเชื้อในกระแสโลหิต ภาวะลิ่มหัวใจติดเชื้อ (Endocarditis) การติดเชื้อที่ผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) และการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (นิตยา อินทราวัดธนา และ มุทิตา วนาภรณ์., 2558; ชาญกิจ พุฒิเลอพงศ์ และคณะ, 2554) องค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้ *A. baumannii* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียในกลุ่ม ESKAPE ที่ประกอบด้วย *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* และ *Enterobacter* sp. ที่มักมีอุบัติการณ์คือต่อสารปฏิชีวนะอย่างมาก (Boucher et al., 2009) ข้อมูลการติดเชื้อ *A. baumannii* ของผู้ป่วยปอดอักเสบในโรงพยาบาล 651 ราย ทั่วประเทศไทย พบว่า *A. baumannii* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อประมาณร้อยละ 30 ของผู้ป่วยปอดอักเสบทั้งหมด (Werarak et al., 2012) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย

สกุล *Pseudomonas* ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตาย การศึกษาในครั้งนี้พบว่า *A. baumannii* ไวต่อสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ โดยไวปานกลางต่อ Piperacillin แสดงให้เห็นถึงแบคทีเรียชนิดนี้ที่แยกได้จากน้ำเชื้อปลาตายมีอุบัติการณ์การดื้อต่อสารปฏิชีวนะต่ำกว่าเชื้อที่แยกได้จากโรงพยาบาลที่พบอุบัติการณ์การดื้อสารต้านจุลชีพสูงมาก การศึกษาของ Keerasuntonpong, Samakeenich, Tribuddharat & Thamlikitkul (2006) ที่ศึกษาอุบัติการณ์ของ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลศิริราช ในปี พ.ศ. 2545 และพบว่าร้อยละ 57 ของแบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่มีใช้ในโรงพยาบาล (Pan drug-resistant *A. baumannii*) โดยดื้อต่อ Cotrimoxazole, Gentamicin, Amikacin, Piperacillin, Imipenem, Meropenem, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidime, Cefoperazone/Sulbactam, Cefpirome และ Ciprofloxacin ยกเว้น Colistin การไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทที่ศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับมนุษย์หรือสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งไม่ได้รับยีนดื้อยาจากแบคทีเรียดื้อสารปฏิชีวนะชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงปลา

การศึกษาในครั้งนี้พบแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท (ร้อยละ 38.9) ได้แก่ *K. kristinae* KO, *K. sedentarius* KSio1, *K. sedentarius* KSio2, *K. sedentarius* KSio3, *S. maltophilia* SMio1, *S. maltophilia* SMio2 และ *S. maltophilia* SMio3 ที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไปและดื้อต่อสารปฏิชีวนะ 3-4 กลุ่ม ทำให้สามารถเรียกแบคทีเรียเหล่านี้ว่าเป็นแบคทีเรียดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน (Multi Drug Resistance) สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า *S. maltophilia* เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน เช่น Quinolones, Tetracycline, Chloramphenicol และ Trimethoprim/sulfamethoxazole เนื่องจากการแสดงออกของยีนและโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการขับยาออกนอกเซลล์ (Efflux pump) (Alonso & Martínez, 1997; Rizek et al., 2018) การดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนานส่งผลให้เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรียเหล่านี้ในมนุษย์ต้องใช้เวลาการรักษานานขึ้น เสียค่าใช้จ่ายแพงขึ้น ได้รับผลข้างเคียงของโรคหรือจากการรักษามากขึ้น และมีโอกาสเสียชีวิตจากการติดเชื้อมากขึ้น โดยกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาด้านจุลชีพหลายขนาน คือ กลุ่มที่มีอายุมาก การเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลแบบผู้ป่วยหลายครั้งในรอบ 12 เดือน ผู้ป่วยมีโรคหัวใจล้มเหลว ผู้ป่วยที่ใช้สายสวนหลอดเลือดใหญ่และสายสวนปัสสาวะ ผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วยหายใจ ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยวิกฤต เป็นต้น รวมทั้งเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลาที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ (Eagye, Kuti & Nicolau, 2009; Grgurich, Hudcova, Lei, Sarwar, & Craven, 2012) ดังนั้นควรมีการศึกษากลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนานของแบคทีเรียเหล่านี้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮลิโคแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ น้ำเชื้อปลาสดแช่แข็งที่บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ที่เก็บในระยะยาว และน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาสดแช่แข็ง เพื่อให้ทราบถึงแนวทางป้องกันในการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง และการใช้สารปฏิชีวนะหรือสารสกัดสมุนไพรสำหรับลดหรือป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง

2. ศึกษากลไกและยีนที่เกี่ยวข้องในการดื้อต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อสารปฏิชีวนะหลายขนาน เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้สารปฏิชีวนะกับน้ำเชื้อปลาสด สำหรับพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสดให้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กมลพร มาแสวง. (2549). การเกิดพยาธิสภาพของปลาสวาย *Pangasius sutchi fowler* จากการศึกษาได้รับอะซีแนพทีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. (2562). กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง. วันที่สืบค้นข้อมูล 9 มกราคม 2563, เข้าถึงได้จาก <https://www.fisheries.go.th/strategy-stat/>
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ Bart, A. N. (2551). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยการแช่เย็นและแช่แข็ง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 2(1), 12-18.
- คณางค์ บุรณะอำนาจ, กรกนก พรหมเทพ, พัทธินีย์ ฝ่ายซ้ายคราม, ชินรัตน์ แจ่มแสงฟ้า และ ก้องเกียรติ ศรีสุวรรณ. (2560). ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส: เครื่องใช้ทางเลือกสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อโคนมแช่แข็ง. ใน การประชุมทางวิชาการระดับชาตินเรศวรวิจัย ครั้งที่ 13. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ชาญกิจ พุฒิเลอพงศ์, วรางคณา ชวนะสิทธิ์, วัลภา เลาะห์วลีสันต์, วิกานดา รุ่งแวง และพวงเพ็ญฤทธิวีรกุล. (2554). การใช้ยาด้านจุลชีวะรักษาโรคปอดอักเสบในโรงพยาบาลจากการติดเชื้อ *Acinetobacter baumannii* คือยาหลายขนาน ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. ไทยเกษตรศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ, 6(1), 32-38.
- ชุติมา วิไลพันธ์. (2546). การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง อี. โคไล (*E. coli* ATCC 25922) และ เอนเทอโรแบคคเตอร์ แอโรจีเนส (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) (เอกสารทางวิชาการหมายเลข วศ กช อว 46). กรุงเทพฯ: กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.
- นงศ์เยาว์ มณี, ผ่องใส จันทร์ศรี และทิพย์สุดา ต่างประโคน. (2554). การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของปลาสวาย 4 กลุ่มประชากร (เอกสารวิชาการฉบับที่ 35/ 2554). กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- นิตยา อินทราวัดนา และมุกิตา วนาภรณ์. (2558). โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและสถานการณการคือ ยา. วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ, 22, 81-92.
- นิธิตา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธิจิตต์, สิตานันท์ พูลผลทรัพย์, รุ่งทิพย์ ชวนชื่น และภูษิต

- ประคองสาย. (2558). *ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการค้ายาต้านจุลชีพในประเทศไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟิกแอนดดิไซน์.
- นิพนธ์ เสนอินทร์, ชีรวัฒน์ จริตงาม และเรณู ยาชิโร. (2555). การเก็บน้ำเชื้อปลาช่อนทะเล, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) โดยวิธีการแช่แข็ง (เอกสารวิชาการฉบับที่ 35/2555). กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- นิตา ไชยรักษ์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา. (2539). สารโครโอโปรเทคแทนท์กับความเป็นพิษต่ออสุจิปลาช่อน. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาพืชประมง* (หน้า 339-345). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 299. (2549). *มาตรฐานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมีบางชนิด* (ฉบับที่ 2). วันที่สืบค้นข้อมูล 11 พฤษภาคม 2563, เข้าถึงได้จาก http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P299.pdf
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303. (2550). *อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง*. วันที่สืบค้นข้อมูล 11 พฤษภาคม 2563, เข้าถึงได้จาก http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P303.pdf
- ปรียาภรณ์ เชวงชินวงศ์ และรัชนิบูลย์ ทิพย์เนตร. (2549). *การเพาะเลี้ยงปลาช้วย*. นนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2553). การเพาะเลี้ยงปลาช้วย. *สัตว์น้ำ*, 21(255), 145-148.
- พรพรรณ กู๋มานะชัย. (2551). *ข้อควรรู้เกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะ*. วันที่สืบค้นข้อมูล 11 พฤษภาคม 2563, เข้าถึงได้จาก [file:///C:/Users/Acer/Downloads/%E0% B8 % 9 A%E0 % 8 % 9 7%E0 % B8 % 8 4%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % B 2%E0 % B8 % A 1 __ % E0 % B8 % 8 2%E0 % B9 % 8 9%E0 % B8 % A D%E0 % B8 % 8 4%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % A 3%E0 % B8 % A 3%E0 % B8 % B 9%E0 % B9 % 8 9%E0 % B9 % 8 0%E0 % B8 % 8 1%E0 % B8 % B 5%E0 % B9 % 8 8%E0 % B8 % A 2%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % 8 1%E0 % B8 % B 1%E0 % B8 % 9 A%E0 % B8 % 8 1%E0 % B8 % B 2%E0 % B8 % A 3%E0 % B9 % 8 3%E0 % B8 % 8 A%E0 % B9 % 8 9%E0 % B8 % A 2%E0 % B8 % B 2%E0 % B8 % 9 B%E0 % B8 % 8 F%E0 % B8 % B 4%E0 % B8 % 8 A%E0 % B8 % B 5%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % 9 9%E0 % B8 % B 0%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Acer/Downloads/%E0% B8 % 9 A%E0 % 8 % 9 7%E0 % B8 % 8 4%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % B 2%E0 % B8 % A 1 __ % E0 % B8 % 8 2%E0 % B9 % 8 9%E0 % B8 % A D%E0 % B8 % 8 4%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % A 3%E0 % B8 % A 3%E0 % B8 % B 9%E0 % B9 % 8 9%E0 % B9 % 8 0%E0 % B8 % 8 1%E0 % B8 % B 5%E0 % B9 % 8 8%E0 % B8 % A 2%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % 8 1%E0 % B8 % B 1%E0 % B8 % 9 A%E0 % B8 % 8 1%E0 % B8 % B 2%E0 % B8 % A 3%E0 % B9 % 8 3%E0 % B8 % 8 A%E0 % B9 % 8 9%E0 % B8 % A 2%E0 % B8 % B 2%E0 % B8 % 9 B%E0 % B8 % 8 F%E0 % B8 % B 4%E0 % B8 % 8 A%E0 % B8 % B 5%E0 % B8 % A 7%E0 % B8 % 9 9%E0 % B8 % B 0%20(1).pdf)
- พัชรี มงคลวัย. (2546). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาช้วยแบบแช่แข็ง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย, สาขาวิชาสัตวศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ภริตา บุญรักษา, कमกฤษณ์ ปัญญาพัฒน์กิจ, ทอม กำภู ณ อยุธยา, วีรวรรณ แก้วทอง, กชกร พงศ์พิศาล และวิน เตชะเคหะกิจ. (2556). โรคปอดอักเสบจากการติดเชื้อในโรงพยาบาลในผู้ใหญ่

- สาเหตุและความชุกของการติดเชื้อพยาธิซิวณะช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี. *วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข*, 7(2), 296-301.
- ภัทรชัย กฤศทิวานนท์. (2561). การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิกุล, ปาริฉัตร สุขโต และศศิธร คณะรัตน์. (2537). การศึกษาปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งได้. *สัตวแพทยสาร*, 45(3), 29-37.
- เรืองไธ โตกฤษณะ, กุลภา กุลคิดก, กุลภา บุญชูวงศ์, เบญจวรรณ คงชน และธัญชัชดา มะวงศ์ไว. (2558). สถานภาพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไทยในบริบทของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน. กรุงเทพฯ: บริษัท ซีโน ฟิชเชอริ่ง แอนด์ แพคเกจจิ้ง จำกัด.
- วสันต์ ป้อมเสมา. (2552). ผลของสาร Cryoprotectant ชนิดต่าง ๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตุ๊กเทศ. *วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก*, 2(1), 67-74.
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). การเพาะพันธุ์ปลา. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2552). การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคูอุยที่อุณหภูมิต่ำเพื่อการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยง (เอกสารทางวิชาการหมายเลข DBG4980006). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.
- ศิริพร คชรัตน์, สุบัตินิต นิรมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2548). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius lamarudii*) แบบแช่แข็ง. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น. (2552). *หาด้านอุลซึฟ*. วันที่สืบค้นข้อมูล 11 พฤษภาคม 2563, เข้าถึงได้จาก https://www.fisheries.go.th/if-khonkaen/web2/index.php?option=com_content&view=article&id=14:2009-07-23-02-39-12&catid=1:2009-07-21-06-16-04&Itemid=69
- สมร พรชื่นชูวงศ์ และสุพรรณ ชันน้ำเที่ยง. (2553). ผลของ Combination cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง*, 4(2), 1-13.
- สมร พรชื่นชูวงศ์, สุพรรณ ชันน้ำเที่ยง, สุรัชย์ ภาสดา, สุกนธา เลขะพันธ์รัตน์, นิสารัตน์ ปุณณารักษ์ และนฤพล สุขุมาสวิน. (2550). ผลของสาร Extenders และสาร

Cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาทรายโดยวิธีการแช่แข็ง.
วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 1(1), 11-22.

สายสมร ลำยอง. (2524). สารปฏิชีวนะและปฏิกริยาต่อต้านจุลินทรีย์. เชียงใหม่:
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุกิจ ประทุมชัย และธนรัตน์ จานุกิจ. (2558). เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant
ชนิดต่าง ๆ ในการเก็บรักษาเซลล์ BHK₂₁C₁₃. วารสารชีวผลิตภัณฑ์, 24(1-2), 7-18.

สุบัณฑิต นิมรัตน์, วรรณิศา แสนโคตร, ไตรมาส บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิปันธุ์ชัย. (2553). ความ
หลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมด ในปลาอุกอัฟริกัน
(*Clarias gariepinus*) ที่เพาะเลี้ยงในจังหวัดฉะเชิงเทรา. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร:
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 7(1), 102-113.

สุบัณฑิต นิมรัตน์, อจิราภา สัจจรดี และวีรพงศ์ วุฒิปันธุ์ชัย (2554). ผลของสารสกัดพริกชี้ฟ้า
(*Capsicum annum* Linn.) และสารปฏิชีวนะต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและ
แบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาอุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ที่
เก็บรักษาแบบแช่แข็ง. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร, 8(1), 51-71.

สุริยา วงศ์เผ่าสกุล. (2560). ฤทธิ์สงบนิ่งของปลาอุกอุยกเทศและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจาก
กานพลูและขี้เหล็ก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยาประยุกต์, คณะ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

หมอชาวบ้าน. (2529). คิวโนโลน: ยาปฏิชีวนะของทศวรรษ. วันที่สืบค้นข้อมูล 11 พฤษภาคม
2563, เข้าถึงได้จาก <https://www.doctor.or.th/article/detail/5306>

อนงค์ หัมพานนท์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา. (2539). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทรายโดยวิธีแช่แข็ง.
ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34. กรุงเทพฯ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรเทพ ทองจันทร์. (2556). การเลี้ยงปลาทราย. วันที่สืบค้นข้อมูล 9 มกราคม 2563, เข้าถึงได้จาก
<http://nuyslaper.blogspot.com/>

อมรรัตน์ กิระวาณิชย์. (2559). การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาสัตวศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัย
บูรพา.

- อมรรัตน์ ภิระวานิชย์, สุวัฒน์ นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2560). การพัฒนาเทคนิคแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางด้วยน้ำแข็งแห้ง. ใน *การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 2*. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2538). *การเพาะขยายพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ: สหมิตรพรินติ้ง.
- เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2555, มีนาคม-เมษายน). เพนิซิลลิน ความบังเอิญที่พลิกโฉมวงการแพทย์. *นิตยสารสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 40(176), 32-35.
- Abdullahi, R., Lihan, S., Carlos, B. S., Bilung, M. L., Mikal, M. K., & Collick, F. (2013). Detection of *oprL* gene and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture environment. *European Journal of Experimental Biology*, 3(6), 148-152.
- Abraham, K. J., Paul, P., Adikesavalu, H., Patra, A., & Banerjee, S. (2016). *Stenotrophomonas maltophilia* as an opportunistic pathogen in cultured african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture*, 450, 168-172.
- Adegoke, A. A., Stenström, T. A., & Okoh, A. I. (2017). *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: Looking beyond contemporary antibiotic therapy. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-18.
- Aigner, B. A., Ollert, M., Seifert, F., Ring, J., & Plötz, S. G. (2011). *Pseudomonas oryzihabitans* cutaneous ulceration from *Octopus vulgaris* bite: a case report and review of the literature. *Archives of Dermatology*, 147(8), 963-966.
- Akinyemi, A. A., & Buoro, O. O. (2011). Fisheries and aquatic science. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 6(5), 555-562.
- Al-Harbi, A. H., & Uddin, N. (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3-4), 566-572.
- Alicia, E., Toranzo, T., Magarinos, B., & Romalde, S. L. (2004). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37-61.
- Alonso, A., & Martínez, J. L. (1997). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5), 1140-1142.
- Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal*, 6, 931-945.
- Barker, G. A., Smith, S. N., & Bromage, N. R. (1989). The bacterial flora of rainbow trout,

- Salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L., eggs and its relationship to developmental success. *Journal of Fish Diseases*, 12(4), 281-293.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Bielanski, A. (2007). Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 68, 1-22.
- Bielanski, A. (2012). A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*, 77, 467-482.
- Bielanski, A., & Vajta, G. (2009). Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, 24(10), 2457-2467.
- Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P. C. K., & Devenish, J. (2003). Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 46, 146-152.
- Bitsori, M., Maraki, S., Koukouraki, S., & Galanakis, E. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection in children: risk factors and outcomes. *Journal of Urology*, 187(1), 260-264.
- Boonthai, T. (2015). *A model for sperm cryopreservation of silver barb (barbodes gonionotus) with minimization of pathogenic contamination*. Doctoral dissertation, Philosophy in Biological Science, Faculty of Science, Burapha University.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2016a). Evaluation of the potential source of bacterial contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Aquaculture Research*, 47(7), 2101-2113.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2016b). Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. *Animal Reproduction Science*, 166, 36-46
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2016c). Influence

- of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* on motility, viability and morphometry of cryostored silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Cryobiology*, 73(2), 140-146.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2016d). Semen collection methods affect the bacterial composition of post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Animal Reproduction Science*, 166, 90-98.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2018). In vitro inoculation of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* in cryopreserved silver barb (*Barbodes gonionotus*) milt: Effect on fertilization capacity and transmission potential to embryos. *Theriogenology*, 108, 1-6.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! an update from the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1-12.
- Brock, K. (1998). Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In D. A. Stringfellow, & M. Seidel (Eds.), *Manual of the international embryo transfer society* (pp. 135-139). Illinois: International Embryo Technology Society.
- Brown, K. (2004). *Penicillin man: Alexander Flemming and the antibiotic revolution*. Gloucestershire: The History Press.
- Bwanga, C. O., de Braganca, M. M., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H. (1990). Cryopreservation of boar semen in mini and maxi-straws. *Zentralbl Veterinaermed A*, 37, 651-658.
- Bwanga, C. O., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H. (1991). Cryopreservation of boar semen: II. Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini and maxi-straws and plastic bags. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 32, 455-461.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., & Herraes, M. P. (2001). Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201(3-4), 301-314.
- Calcott, P. H. (1985). Cryopreservation of microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 4(3), 279-297.
- Chamot, E., Amari, E. B. E., Rohner, P., & Delden, C. V. (2003). Effectiveness of combination

- antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2756-2764.
- Chaudhary, D., & Finkle, S. N. (2010). Peritoneal dialysis-associated peritonitis due to *Kytococcus sedentarius*. *Peritoneal Dialysis International*, 30(2), 252-253.
- Christensen, J. M., & Tiersch, T. R. (1996). Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(3), 340-346.
- Çıkman, A., Parlak, M., Bayram, Y., Güdücüoğlu, H., & Berktaş, M. (2016). Antibiotics resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from various clinical specimens. *African Health Sciences*, 16(1), 149-152.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Retrieved July 25, 2019, from <https://kuza.me/w8f6U>
- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., Adlem, E., Kerhornou, A., Lord, A., Murphy, L., Seeger, K., Squares, R., Rutter, S., Quail, M. A., Rajandream, M. A., & Avison, M. B. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology*, 9(4).
- Dejsirilert, S., Suankratay, C., Trakulsomboon, S., Thongmali, O., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N., & Tantisiriwat, W. (2009). National antimicrobial resistance surveillance, Thailand (NARST) data among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand from 2000 to 2005. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet Thangphaet*, 92(4), 68-75.
- Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Schroeder-Printzen, I., Michelmann, H. W., Schiefer, H., & Weidner, W. (2003). Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters in vitro. *Andrologia*, 35, 100-105.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155-166.
- Eagye, K. J., Kutu, J. L., & Nicolau, D. P. (2009). Risk factors and outcomes associated with isolation of meropenem high-level-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 30(8), 746-752.

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). *Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST*. Retrieved September 2, 2019, from https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V., & Menu, B. (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquatic Living Resources*, 11(6), 387-394.
- Finberg, R. W., Moellering, R. C., Tally, F. T., Craig, W. A., Pankey, G. A., Dellinger, E. P., West, M. A., Joshi, M., Linden, P. K., Rolston, K. V., Rotschafer, J. C., & Rybak, M. J. (2004). The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 1314-1320.
- Fuller, B., & Paynter, S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine, *Reprod Biomed Online*, 9(6), 680-691.
- Goldberg, A. M. G., Cardoso, M., Bernardi, M. L., Wentz, I., & Bortolozzo, F. P. (2017). The impact of bacterial contamination of the ejaculate and extender on the quality of swine semen doses. *Semina: Ciencias Agrarias*, 38(5), 3095-3103.
- Grgurich, P. E., Hudcova, J., Lei, Y., Sarwar, A., & Craven, D. E. (2012). Management and prevention of ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant pathogens. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 6(5), 533-555.
- Hadi, T. K., Morshino, J. L., & Das, P. G. (2002). Infectious disease caused by *Pseudomonas fluorescens* in silver carp. *Journal of Fish Diseases*, 36(3), 45-53.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (2008). Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3), 189-192.
- Harrison, C. J., & Bratcher, D. (2008). Cephalosporins: A review. *Pediatrics in Review*, 29(8), 264-273.
- Hernández, A., Ruiz, F. M., Romero, A., & Martínez, J. L. (2011). The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump smeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS Pathogens*, 7(6), 1-12.
- Horvath, A., Miskolczi, E., Mihalfy, S., Osz, K., Szabo, K., & Urbanyi, B. (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and

- occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54, 251-257.
- Huang, Y. W., Lin, C. W., Hu, R. M., Lin, Y. T., Chung, T. C., & Yang, T. C. (2010). AmpN-AmpG operon is essential for expression of L1 and L2 β -Lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2583-2589.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12-18.
- Jenkins, J. A., & Tiersch, T. R. (1997). A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28(3), 282-288.
- Joaquim, D. C., Borges, E. D., Viana, I. G. R., Navarro, P. A., & Vireque, A. A. (2017). Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination. *Biomed Research International*, 2017, 1-11.
- Kamar, R., Gohar, M., Jéhanno, I., Réjasse, A., Kallassy, M., Lereclus, D., Sanchis, V., & Ramarao, N. (2013). Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 320-323.
- Keerasuntonpong, A., Samakeenich, C., Tribuddharat, C., & Thamlikitkul, V. (2006). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections in Siriraj Hospital 2002. *Siriraj Medical Journal*, 58(8), 951-954.
- Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A. J., Farnleitner, A. H., Kirschner, A., & Zarfel, G. (2016). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. *Frontiers in Microbiology*, 7(586), 1-8.
- Koh, I. C. C., Badrul Nizam, B. H., Muhammad Abduh, Y., Abol Munafi, A. B., & Iehata, S. (2019). Molecular characterization of microbiota associated with sperm of Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Evolutionary Bioinformatics*, 15, 1-7.
- Kwantong, S., & Bart, A. N. (2003). Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. *Aquaculture Research*, 34, 887-893.

- Lahnsteiner, F., Berger, B., & Weismann, T. (2003). Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*, *60*, 829-841.
- Lakshmikantha, M., Devki, V., & Yogesh, C. (2015). Case study is *Kocuria kristinae* an upcoming pathogen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *4*(4), 885-889.
- Levenga, H., Donnelly, P., Blijlevens, N., Verweij, P., Shirango, H., & de Pauw, B. (2004). Fatal hemorrhagic pneumonia caused by infection due to *Kytococcus sedentarius* a pathogen or passenger. *Annals of Hematology*, *83*, 447-449.
- Levey, H., & Gilbert, B. (2013). *Semen cryobiology and sperm banking*. In J. P. Mulhall, L. D. Applegarth, R. D. Oates, & P. N. Schlege (Eds.), *Fertility preservation in male cancer patients cambridge* (pp. 213-230). Cambridge: Cambridge University Press.
- Lin, C. W., Lin, H. C., Huang, Y. W., Chung, T. C., & Yang, T. C. (2011). Inactivation of *mrcA* gene derepresses the basal-level expression of L1 and L2 β -lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(9), 2033-2037.
- Linhart, B. O., Mims, S. D., Gomelsky, B., Cvetkova, L. I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., & Urbanyi, B. (2006). Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, *22*, 389-394.
- More, D. (2020). *An overview of sulfa allergy*. Retrieved May 11, 2020, from <https://www.verywellhealth.com/sulfa-drug-allergy-83067>
- Najeeb, P., & Mudarris, M. S. A. (2014). Investigation on the bacterial haemorrhagic septicemia disease of *Cyprinus carpio* and *Channa striatus*. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, *2*(2).
- Nimrat, S., Bart, A. N., Keatsaksit, A., & Vuthiphandchai, V. (2008). Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture*, *274*, 247-253.
- Norris, L. J., Watral, V., & Kent, M. L. (2018). Survival of bacterial and parasitic pathogens from Zebrafish (*Danio rerio*) after cryopreservation and thawing. *Zebrafish*, *15*(2), 189-201.

- Ohta, H., Kawamura, K., Unuma, T., & Takegoshi, Y. (2001). Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *Journal of Fish Biology*, 58(3), 670-681.
- Okazaki, A., & Avison, M. B. (2007). Aph (3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 359-360.
- Omitogun, O. G., Olaniyan, O. F., Oyeleye, O. O., Ojiokpota, C., Aladele, S. E., & Odofin, W. T. (2010). Potentials of short term and long term cryopreserved sperm of the African giant catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) for aquaculture. *African Journal of Biotechnology*, 9(41), 6973-6982.
- Oskouei, D. D., Bekmen, N., Ellidokuz, H., & Yılmaz, Ö. (2010). Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in stock culture media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1038-1046.
- Owusu, M., Owusu-Dabo, E., Acheampong, G., Osei, I., Amuasi, J., Sarpong, N., Annan, A., Chiang, H., Kuo, C., Park, S. E., Marks, F., & Adu-Sarkodie, Y. (2017). *Pseudomonas oryzihabitans* sepsis in a 1-year-old child with multiple skin rashes: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 11(77), 1-4.
- Pełkala-Safińska, A. (2018). Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 62(3), 261-267.
- Pessoa, G. A., Rubin, M. I. B., Silva, C. A. M., & da Rosa, D. C. (2014). Decontamination of naturally contaminated liquid nitrogen storage tanks. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(5), 244-249.
- Pradeep, P. J., Suebsing, R., Sirithammajak, S., Kampeera, J., Turner, W., Jeffs, A., Kiatpathomchai, W., & Withyachumanarnkul, B. (2017). Vertical transmission and concurrent infection of multiple bacterial pathogens in naturally infected red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Aquaculture Research*, 48, 2706-2717.
- Prod'hom, G., & Bille, J. (2010). Aerobic Gram-positive bacilli. *Infectious Diseases*, 2, 1660-1675.
- Psirides, A. (2019). *Drug manual* (3rd ed). New Zealand: Wellington.
- Pullin, R. S. V. (1972). The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperature. *Aquaculture*, 1, 279-283.

- Rahmati-Bahram, A., Magee, J. T., & Jackson, S. K. (1996). Temperature-dependent aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*; alterations in protein and lipopolysaccharide with growth temperature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37(4), 665-676.
- Richardson, G. F., Miller, T. L., & McNiven, M. A. (2000). Cryopreservation of arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture Research*, 31(1997), 307-315.
- Rizek, C. F., Jonas, D., Garcia Paez, J. I., Rosa, J. F., Perdigão Neto, L. V., Martins, R. R., Moreno, L. Z., Rossi Junior, A., Levin, A. S., & Costa, S. F. (2018). Multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*: Description of new MLST profiles and resistance and virulence genes using whole-genome sequencing. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15, 212-214.
- Sader, H. S., & Jones, R. N. (1992). Historical overview of the cephalosporin spectrum: Four generations of structural evolution. *Antimicrobial Newsletter*, 8(12), 75-82.
- Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-7.
- Schiewe, M. (1998). General hygiene and quality control practices in an embryo production laboratory. In D. A. Stringfellow & M. Seidel (Eds.) . *Manual of the international embryo transfer society* (pp. 93-103) . Illinois: International Embryo Technology Society.
- Stoss, J., Buyukhatipoglu, S., & Holtz, W. (1978). Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 18(4), 1077-1082.
- Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*, 61(4), 717-732.
- Taneja, N., Meharwal, S. K., Sharma, S. K., & Sharma, M. (2004). Significance and characterisation of pseudomonads from urinary tract specimens. *Journal of Communicable Diseases*, 36, 27-34.
- Tiersch, T. R. (2006). Fish sperm cryopreservation for genetic improvement and conservation in Southeast Asia. *Fish for the People*, 4(2), 21-33.
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on

- their structural similarity to acyl-d-alanyl-d-alanine. *Microbiology*, 54, 1133-1141.
- Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (1992). *Microbiology: an introduction* (4th ed). San Francisco: Benjamin-Cummings Publishing Company.
- Villegas, J., Schulz, M., Soto, L., & Sanchez, R. (2005). Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis*, 10, 105-110.
- Viswanath, R., & Shannon, P., (1997). Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development*, 9, 321-331.
- Viveiros, A. T. M., Orfão, L. H., Nascimento, A. F., Corrêa, F. M., & Caneppele, D. (2012). Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, 78, 361-368.
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S., & Nimrat, S. (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology*, 72, 129-138.
- Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T., & Nimrat, S. (2015). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research*, 46(10), 2443-2451.
- Walt, T. (2018). *Macrolide*. Retrieved May 11, 2020, from <https://th.wikipedia.org/wiki/macrolide>
- Werarak, P., Waiwarawut, J., Tharavichitkul, P., Pothirat, C., Rungruanghiranya, S., Geater, S. L., Chongthaleong, A., Sittipunt, C., Horsin, P., Chalermkulrat, W., Wiwatworapan, T., Thummakul, T., Mootsikapun, P., Rungsrithong, N., Supawita, S., & Chuchot, V. (2012). *Acinetobacter baumannii* nosocomial pneumonia in tertiary care hospitals in Thailand. *Journal of The Medical Association of Thailand*, 95(2), 23-33.
- Yang, H., & Tiersch, T. R. (2010). Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 224-232.
- Yang, T. C., Huang, Y. W., Hu, R. M., Huang, S. C., & Lin, Y. T. (2009). ampD₁ is involved in

expression of the chromosomal L1 and L2 β -lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2902-2907.

Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., Wang, L., & Xiao, M. (2014). Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *Public Library of Science ONE*, 9(9).

Zhang, L., Li, X., & Poole, K. (2000). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 287-293.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate Count Agar (PCA) (Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป PCA จำนวน 17 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมด นำไปให้ความร้อนทำให้ส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

2. Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition)

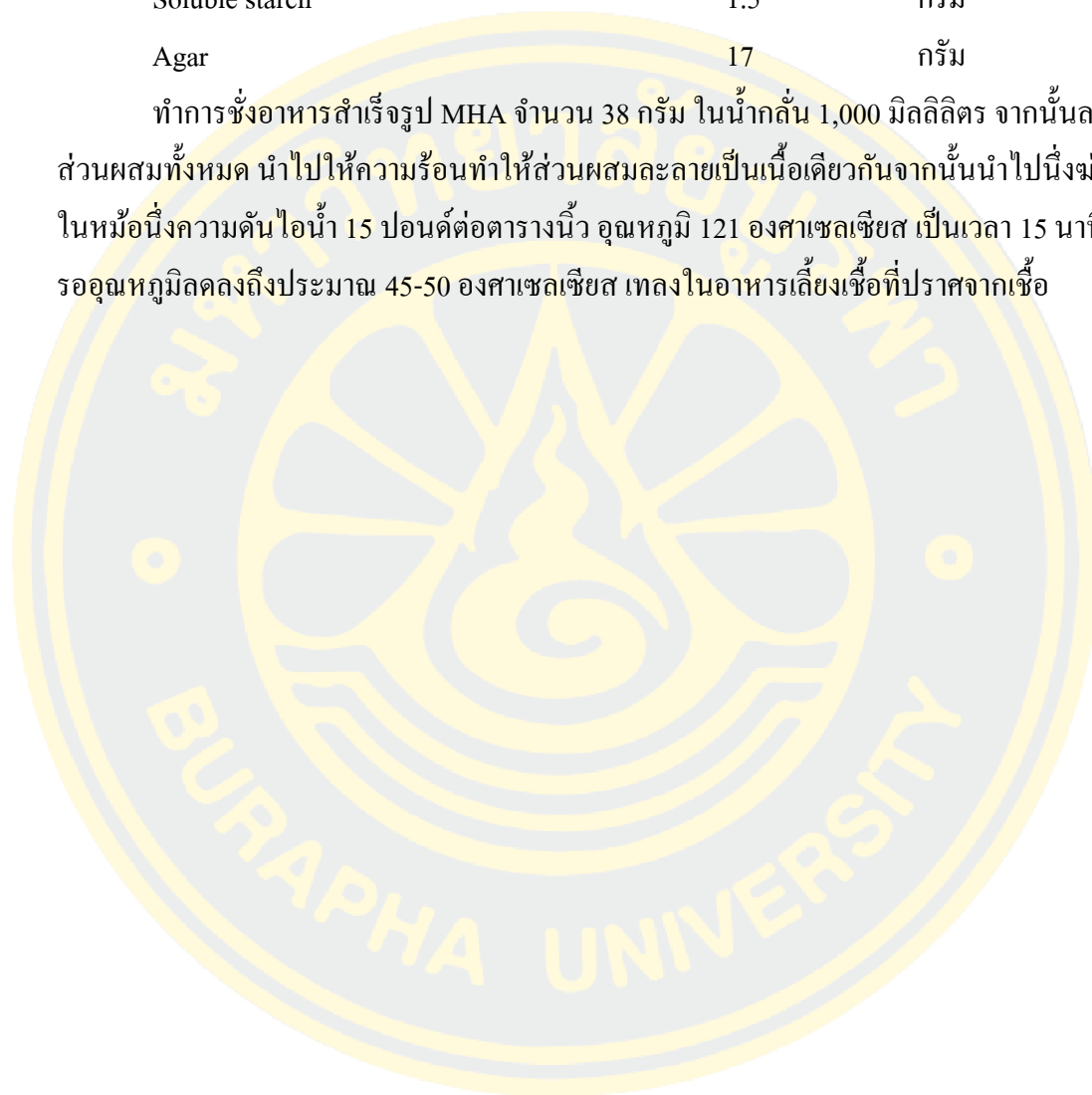
Pancreatic Digest of Casein	15.0	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป TSA จำนวน 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมด นำไปให้ความร้อนทำให้ส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

3. Mueller Hinton Agar (MHA) (Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition)

Beef extract power	2	กรัม
Acid Digest of Casein	17.5	กรัม
Soluble starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม

ทำการชั่งอาหารสำเร็จรูป MHA จำนวน 38 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นละลายส่วนผสมทั้งหมด นำไปให้ความร้อนทำให้ส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิตกลงถึงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ



ภาคผนวก ข

ชุดทดสอบ API test kit

API test kit หรือ bioMérieux's API เป็นชุด Test kit เพื่อการจำแนกแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ ผลการทดสอบทางชีวเคมีจะนำมาประมวลผลจากฐานข้อมูลผ่านทาง Internet-based APIWEB™ โดย API ย่อมาจาก Analytical Profile Index

ชุด API 20E

API ชุด 20E เป็นชุด test kit เพื่อการจำแนกแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ประกอบด้วยชุดทดสอบชีวเคมี 20 ชนิด

ชุด API NE

API 20 NE เป็นชุดทดสอบในการจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods (ยกตัวอย่างเช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* เป็นต้น) ซึ่งประกอบด้วย 20 ชุดทดสอบ

ชุด API 50CH

ชุดทดสอบ API 50 CH เป็นชุดการศึกษาถึงการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ด้วยสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตหลากหลายชนิดรวมทั้งสารอนุพันธ์ในกลุ่ม heterosides, polyalcohols และ uronic acids

ชุด API Staph

ชุด API Staph เป็นชุดชีวเคมีขนาดเล็กจำนวน 20 ชุด เพื่อใช้จัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Kocuria*

ภาคผนวก ค

การย้อมสีแกรม

การย้อมสีแกรม (Gram staining) เป็นเทคนิคในการย้อมสีเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) มีการคิดค้นจากโดย Han Christian Gram ในปี ค.ศ. 1984 การย้อมสีแกรมช่วยในการจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) เนื่องจากคุณสมบัติของผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างกัน

ขั้นตอนการย้อมสีแกรม

1. การย้อมสีด้วย สี Crystal violet ซึ่งมีสีม่วง แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบสามารถย้อมติดสีม่วง
2. การย้อมทับด้วยสารละลายไอโอดีน (Iodine treatment) จะไปรวมกับสี Crystal violet เกิดเป็นโมเลกุลสีขนาดใหญ่ (CV-I complex) ทำให้สีเกิดการติดแน่นขึ้น
3. การล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol 95%) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีชั้นไขมันอยู่มาก ไขมันและสีย้อมจึงละลายออกมากับแอลกอฮอล์ แต่แบคทีเรียแกรมบวก และ CV-I complex ยังคงติดอยู่ในเซลล์
4. การย้อมด้วย Safranin ซึ่งมีสีแดง แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวก จะไม่ติดสีแดงและยังคงสีม่วงของ Crystal violet เหมือนเดิม

ภาคผนวก ง

การทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบ Catalase

การทดสอบ Catalase คือแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน ใช้ประโยชน์ในการกำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ มีการเกิดฟองอย่างรวดเร็วของออกซิเจน

ขั้นตอนการทดสอบ

- 1) ใช้ลวดเย็บเย็บปราศจากเชื้อ เย็บเชื้อที่จะทำการทดสอบจากงานเพาะเชื้อ โดยเลือกโคโลนีที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปเขียนบนกระจกสไลด์
- 2) จากนั้นหยด 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์
- 3) สังเกตการเกิดฟองแก๊ส

การอ่านผล

ผลบวก คือ เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ คือ ไม่เกิดฟองแก๊ส

2. การทดสอบ Oxidase

การทดสอบ oxidase คือการทดสอบที่ใช้ในจุลชีววิทยาเพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียก่อให้เกิด cytochrome c oxidases ด้วยตัวทำปฏิกิริยา เช่น N, N, N', N' - tetramethyl -p - phenylenediamine (TMPD) หรือ N, N -dimethyl -p- phenylenediamine (DMPD) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สารทำปฏิกิริยาเป็นสีน้ำเงินเข้มเป็นสีน้ำตาลแดง เมื่อมีการออกซิไดซ์แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ oxidase หรือ cytochrome oxidase เกิดกระตุ้นการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากสารประกอบของตัวให้ (NADH) ไปสู่ตัวรับอิเล็กตรอน

ขั้นตอนการทดสอบ

- 1) ใช้ไม้ปราศจากเชื้อเย็บเชื้อที่จะทำการทดสอบ ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ โดยเลือกจากโคโลนีเดี่ยว ๆ
- 2) จากนั้นหยด TMPD สังเกตการเปลี่ยนแปลง

การอ่านผล

ผลบวก คือ เชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วง

ผลลบ คือ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารเคมีและน้ำยา

1. สารละลายเจือจาง (extender) Calcium Free Hank's Balance Salt Solution (Ca-free HBSS)
เตรียมสารละลายตามวิธีการของพัชรี มงคลวัย (2546) โดยเตรียมสาร ดังนี้

NaCl	8.89	กรัมต่อลิตร
KCl	0.44	กรัมต่อลิตร
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	0.13	กรัมต่อลิตร
NaHCO ₃	0.39	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	0.07	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.22	กรัมต่อลิตรและ
Glucose	1.11	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.8 ด้วย 1 N NaCl หรือ 1 N HCL เก็บสารละลายที่ปรับ pH แล้วไว้ในขวด
ที่มีฝาปิดสนิท และเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส

2. สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Cryoprotectant) 18 เปอร์เซ็นต์ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
เตรียมสารละลายตามวิธีการของนิพนธ์ เสนอินทร์, ชีรวัฒน์ จริตงาม เรณู ยาชิโร (2555)
โดยเตรียมสาร ดังนี้

100 เปอร์เซ็นต์ DMSO	18	มิลลิลิตร
Ca-free HBSS	82	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิท แล้วเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 0 – 4
องศาเซลเซียส

ภาคผนวก จ
ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์

ตารางที่ 27 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน
ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสดที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำแข็งขนาด 0.5, 2.5 และ
4.0 มิลลิลิตร ก่อนนำไปแช่แข็ง

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
s	5	7527444444	1505488889	83.51	0.000
Error	12	216333333	18027778		
Total	17	7743777778			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4245.91	97.21%	96.04%	93.71%

Tukey Pairwise Comparisons

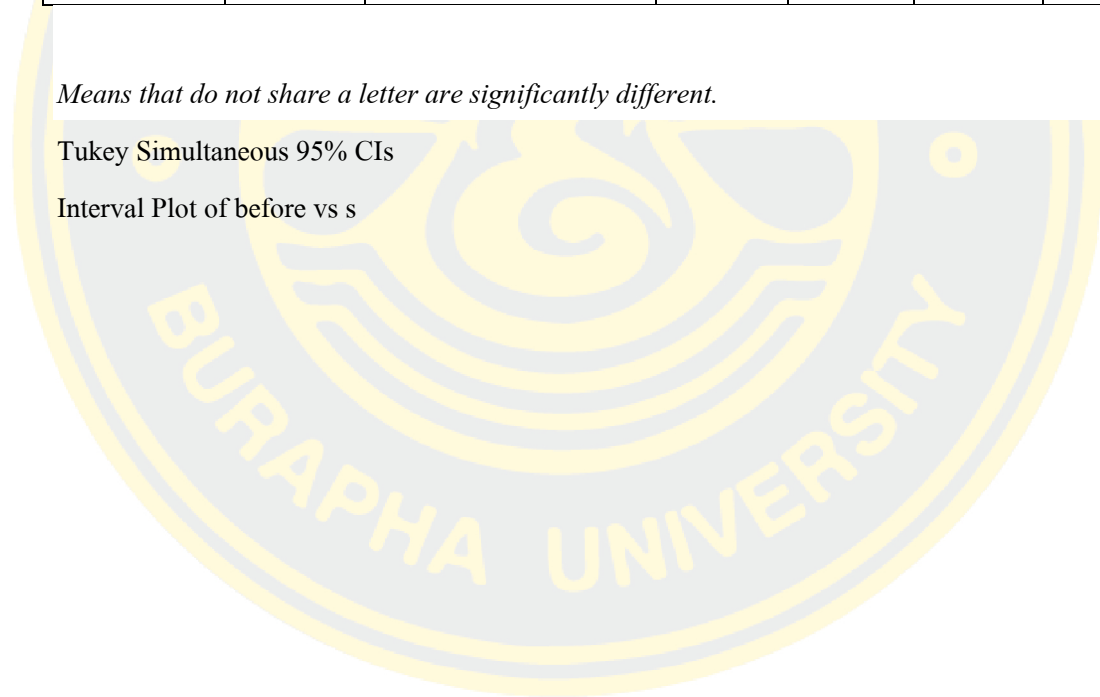
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

s	N	Mean	Grouping			
1.0	3	92667	A			
2.0	3	75667		B		
3.0	3	50167			C	
4.0	3	43500			C	D
2.5	3	39333			C	D
0.5	3	38333				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of before vs s



ตารางที่ 28 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาซวยแซ่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลา 6 วัน

One-way ANOVA: size 0.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	5	0, 1, 2, 4, 6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	4	0.551120	0.137780	398.83	0.000
Error	10	0.003455	0.000345		
Total	14	0.554575			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0185866	99.38%	99.13%	98.60%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping		
1	3	4.59467	A		
0	3	4.5832	A		
2	3	4.24460		B	
6	3	4.1927			C
4	3	4.1661			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of size0.5 vs day

One-way ANOVA: size 2.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	5	0, 1, 2, 4, 6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	4	0.80273	0.200682	191.05	0.000
Error	10	0.01050	0.001050		
Total	14	0.81323			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0324105	98.71%	98.19%	97.09%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping		
1	3	4.6263	A		
0	3	4.5944	A		
4	3	4.2322		B	
2	3	4.14753		B	C
6	3	4.0709			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of size2.5 vs day

One-way ANOVA: size 4.0 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	5	0, 1, 2, 4, 6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	4	0.54206	0.135516	85.42	0.000
Error	10	0.01587	0.001587		
Total	14	0.55793			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0398315	97.16%	96.02%	93.60%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping	
0	3	4.6376	A	
1	3	4.6026	A	
2	3	4.27530		B
6	3	4.2291		B
4	3	4.2026		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of size 4.0 vs day

One-way ANOVA: day 0 versus s

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
s	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
s	2	0.001621	0.000810	0.51	0.622
Error	6	0.009460	0.001577		
Total	8	0.011080			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0397063	14.63%	0.00%	0.00%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

s	N	Mean	Grouping
2.5	3	4.6263	A
4.0	3	4.6026	A
0.5	3	4.59467	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day0 vs s

One-way ANOVA: day 2 versus s

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
s	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
s	2	0.026689	0.013344	120.65	0.000
Error	6	0.000664	0.000111		
Total	8	0.027352			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0105167	97.57%	96.77%	94.54%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

s	N	Mean	Grouping		
4.0	3	4.27530	A		
0.5	3	4.24460		B	
2.5	3	4.14753			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day2 vs s

One-way ANOVA: day 4 versus s

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
s	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
s	2	0.006590	0.003295	4.43	0.066
Error	6	0.004467	0.000744		
Total	8	0.011057			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0272851	59.60%	46.14%	9.11%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

s	N	Mean	Grouping
2.5	3	4.2322	A
4.0	3	4.2026	A
0.5	3	4.1661	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day4 vs s

One-way ANOVA: day 6 versus s

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
s	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
s	2	0.04120	0.020599	11.71	0.008
Error	6	0.01056	0.001759		
Total	8	0.05175			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0419437	79.60%	72.81%	54.11%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

s	N	Mean	Grouping	
4.0	3	4.2291	A	
0.5	3	4.1927	A	
2.5	3	4.0709		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day6 vs s

ตารางที่ 29 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาซวายที่แช่แข็งด้วยกล่องโฟมและบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 180 วัน

One-way ANOVA: day versus size 0.5

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size 0.5	29	1300, 7800, 11100, 11300, 11400, 12100, 12200, 12300, 12700, 12800, 13100, 13400, 13700, 13900, 14000, 14100, 14300, 14400, 14500, 14700, 15100, 15200, 15500, 15700, 16200, 16600, 16700, 16800, 17100

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size 0.5	28	124600	4450	3.26	0.129
Error	4	5454	1364		
Total	32	130054			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
36.9273	95.81%	66.45%	*

One-way ANOVA: day versus size 2.5

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$ *Equal variances were assumed for the analysis.*

Factor Information

Factor	Levels	Values
size 2.5	28	6900, 7600, 8000, 8700, 8900, 9250, 9600, 11300, 11500, 12300, 12700, 12800, 12900, 13100, 13500, 13600, 14200, 14800, 14900, 15100, 15200, 15300, 15700, 15800, 16200, 16300, 18400, 18500

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size 2.5	27	119201	4415	2.03	0.220
Error	5	10853	2171		
Total	32	130054			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
46.5900	91.65%	46.59%	*

One-way ANOVA: day versus size 4.0

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size 4.0	29	8700, 10700, 11800, 12200, 12250, 12300, 12600, 12800, 12900, 13000, 13100, 13700, 13900, 14000, 14200, 14800, 14900, 15000, 16400, 16500, 16800, 17100, 17200, 17300, 17900, 18100, 18200, 18300, 27900

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size 4.0	28	107254	3830	0.67	0.768
Error	4	22800	5700		
Total	32	130054			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
75.4992	82.47%	0.00%	*

One-way ANOVA: before versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$ *Equal variances were assumed for the analysis.*

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	2535556	1267778	0.34	0.726
Error	6	22473333	3745556		
Total	8	25008889			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1935.34	10.14%	0.00%	0.00%

One-way ANOVA: 30 min versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$ *Equal variances were assumed for the analysis.*

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	23635556	11817778	5.41	0.045
Error	6	13113333	2185556		
Total	8	36748889			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1478.36	64.32%	52.42%	19.71%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

size	N	Mean	Grouping
0.5	3	16700	A
2.5	3	13367	A
4.0	3	13167	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of 30 min vs size

One-way ANOVA: day 1 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	117926667	58963333	1.42	0.313
Error	6	249673333	41612222		
Total	8	367600000			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6450.75	32.08%	9.44%	0.00%

One-way ANOVA: day 7 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	21905000	10952500	67.75	0.000
Error	6	970000	161667		
Total	8	22875000			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
402.078	95.76%	94.35%	90.46%

Means

size	N	Mean	StDev	95% CI
0.5	3	12800	600	(12232, 13368)
2.5	3	9250	350	(8682, 9818)
4.0	3	12250.0	50.0	(11682.0, 12818.0)

Pooled StDev = 402.078

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

size	N	Mean	Grouping	
0.5	3	12800	A	
4.0	3	12250.0	A	
2.5	3	9250		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day 7 vs size

One-way ANOVA: day 15 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	4915556	2457778	0.91	0.453
Error	6	16273333	2712222		
Total	8	21188889			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1646.88	23.20%	0.00%	0.00%

One-way ANOVA: day 30 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	8068889	4034444	2.87	0.133
Error	6	8426667	1404444		
Total	8	16495556			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1185.09	48.92%	31.89%	0.00%

One-way ANOVA: day 60 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.



Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	24802222	12401111	14.63	0.005
Error	6	5086667	847778		
Total	8	29888889			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
920.748	82.98%	77.31%	61.71%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

size	N	Mean	Grouping	
4.0	3	16100	A	
2.5	3	14733	A	
0.5	3	12100		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day 60 vs size

One-way ANOVA: day 90 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	52260000	26130000	96.78	0.000
Error	6	1620000	270000		
Total	8	53880000			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
519.615	96.99%	95.99%	93.23%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

size	N	Mean	Grouping		
4.0	3	18200.0	A		
0.5	3	15100		B	
2.5	3	12300			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day 90 vs size

One-way ANOVA: day 120 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	10722222	5361111	4.54	0.063
Error	6	7080000	1180000		
Total	8	17802222			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1086.28	60.23%	46.97%	10.52%

One-way ANOVA: day 150 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	31206667	15603333	0.86	0.471
Error	6	109353333	18225556		
Total	8	140560000			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4269.14	22.20%	0.00%	0.00%

One-way ANOVA: day 180 versus size

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
size	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size	2	154482222	77241111	295.82	0.000
Error	6	1566667	261111		
Total	8	156048889			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
510.990	99.00%	98.66%	97.74%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

size	N	Mean	Grouping		
4.0	3	17200.0	A		
0.5	3	14933		B	
2.5	3	7500			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of day 180 vs size

ตารางที่ 30 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำเชื้อปลาชว่ายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วัน

One-way ANOVA: -20 0.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	108259063	15465580	26.13	0.000
Error	16	9468333	591771		
Total	23	117727396			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
769.266	91.96%	88.44%	81.90%

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping			
60	3	11550	A			
7	3	8850		B		
0	3	8550		B		
14	3	7100		B	C	
21	3	6300			C	D
1	3	5800			C	D
28	3	5133			C	D
90	3	4833				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -20 0.5 vs day

One-way ANOVA: -80 0.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	81034896	11576414	23.08	0.000
Error	16	8025000	501563		
Total	23	89059896			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
708.211	90.99%	87.05%	79.73%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping				
14	3	10400	A				
7	3	9733	A	B			
60	3	9267	A	B			
1	3	8600	A	B	C		
90	3	8200		B	C		
21	3	7150			C	D	
28	3	5900				D	E
0	3	4667					E

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -80 0.5 vs day

One-way ANOVA: -196 0.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	52206250	7458036	11.24	0.000
Error	16	10613333	663333		
Total	23	62819583			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
814.453	83.11%	75.71%	61.99%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping			
21	3	9033	A			
14	3	8200	A	B		
60	3	7800	A	B	C	
7	3	6667		B	C	
0	3	6333		B	C	D
1	3	6300		B	C	D
90	3	5567			C	D
28	3	4067				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -196 0.5 vs day

One-way ANOVA: -20 2.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	60093691	8584813	30.30	0.000
Error	16	4533783	283361		
Total	23	64627474			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
532.317	92.98%	89.92%	84.22%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping			
1	3	8300	A			
21	3	7333	A	B		
14	3	7233	A	B		
90	3	6767		B		
7	3	6567		B		
60	3	6533		B		
28	3	4700			C	
0	3	2955.00				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -20 2.5 vs day

One-way ANOVA: -80 2.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	203809896	29115699	51.45	0.000
Error	16	9055000	565938		
Total	23	212864896			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
752.288	95.75%	93.89%	90.43%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping			
90	3	12350	A			
1	3	10450	A			
7	3	10333	A			
14	3	8100		B		
60	3	6667		B	C	
21	3	5950			C	
28	3	5567			C	
0	3	2900				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -80 2.5 vs day

One-way ANOVA: -196 2.5 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	155676250	22239464	20.38	0.000
Error	16	17460000	1091250		
Total	23	173136250			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1044.63	89.92%	85.50%	77.31%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping		
90	3	13900	A		
21	3	8833		B	
14	3	8733		B	
1	3	7600		B	
7	3	7533		B	
60	3	7367		B	
0	3	6867		B	C
28	3	4267			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -196 2.5 vs day

One-way ANOVA: -20 4.0 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	73896250	10556607	7.18	0.001
Error	16	23513333	1469583		
Total	23	97409583			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1212.26	75.86%	65.30%	45.69%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping	
60	3	9600	A	
0	3	8133	A	
90	3	7167	A	B
1	3	7100	A	B
14	3	6933	A	B
21	3	6533	A	B
28	3	4167		B
7	3	4000		B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -20 4.0 vs day

One-way ANOVA: -80 4.0 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	69776562	9968080	29.84	0.000
Error	16	5345000	334063		
Total	23	75121562			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
577.981	92.88%	89.77%	83.99%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping		
90	3	11450	A		
21	3	8233		B	
14	3	8200		B	
60	3	7133		B	C
1	3	6500			C
0	3	6500			C
7	3	6233			C
28	3	5800			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -80 4.0 vs day

One-way ANOVA: -196 4.0 versus day

Method

Null hypothesis All means are equal

Alternative hypothesis Not all means are equal

Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
day	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
day	7	36702396	5243199	17.22	0.000
Error	16	4871667	304479		
Total	23	41574063			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
551.796	88.28%	83.16%	73.63%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

day	N	Mean	Grouping			
90	3	9750.0	A			
60	3	8600	A	B		
0	3	7300		B	C	
7	3	7200		B	C	
21	3	7067		B	C	
14	3	7033			C	
1	3	6867			C	
28	3	5233				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Simultaneous 95% CIs

Interval Plot of -196 4.0 vs day

ตารางที่ 31 ค่าสถิติประกอบการวิเคราะห์ผลปัจจัยหลักที่มีอิทธิพล ปฏิสัมพันธ์ของปัจจัย ความแปรปรวนร่วมของปัจจัย และความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อปลาสายแช่แข็งที่บรรจุในหลอดบรรจุขนาด 0.5, 2.5 และ 4.0 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 90 วันของการทดลอง

Main effect

General Linear Model: tt versus temp, day, size

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
temp	Fixed	3	-196, -80, -20
day	Fixed	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90
size	Fixed	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
temp	2	37707609	18853804	5.72	0.004
day	7	297963137	42566162	12.92	0.000
size	2	1652122	826061	0.25	0.778
Error	204	672150471	3294855		
Lack-of-Fit	60	579265021	9654417	14.97	0.000
Pure Error	144	92885450	645038		
Total	215	1009473339			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1815.17	33.42%	29.83%	25.35%

interaction

General Linear Model: tt versus temp, day, size

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
temp	Fixed	3	-196, -80, -20
day	Fixed	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90
size	Fixed	3	0.5, 2.5, 4.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
temp	2	37707609	18853804	29.23	0.000
day	7	297963137	42566162	65.99	0.000
size	2	1652122	826061	1.28	0.281
temp*day	14	170817704	12201265	18.92	0.000
temp*size	4	35772905	8943226	13.86	0.000
day*size	14	250964024	17926002	27.79	0.000
temp*day*size	28	121710388	4346800	6.74	0.000
Error	144	92885450	645038		
Total	215	1009473339			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
803.142	90.80%	86.26%	79.30%

Analysis of covariance

General Linear Model: tt versus size, temp, day

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
temp	Fixed	3	-196, -80, -20
day	Fixed	8	0, 1, 7, 14, 21, 28, 60, 90

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
size*temp	2	36615766	18307883	5.93	0.003
size*day	7	267679832	38239976	12.39	0.000
size*temp*day	14	112427031	8030502	2.60	0.002
Error	192	592750709	3087243		
Lack-of-Fit	48	499865259	10413860	16.14	0.000
Pure Error	144	92885450	645038		
Total	215	1009473339			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1757.06	41.28%	34.25%	28.56%

Multiple linear regression

Regression Analysis: tt versus day, temp

Stepwise Selection of Terms

 α to enter = 0.05, α to remove = 0.05

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	3	9810447669	3270149223	253.21	0.000
day	1	1948116423	1948116423	150.85	0.000
temp	1	3423562066	3423562066	265.09	0.000
day*temp	1	608566483	608566483	47.12	0.000
Error	213	2750801356	12914560		
Lack-of-Fit	69	2657915906	38520520	59.72	0.000
Pure Error	144	92885450	645038		
Total	216	12561249025			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
3593.68	78.10%	77.79%	77.60%

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	3	7275487317	2425162439	97.73	0.000
day*size	1	1395924106	1395924106	56.25	0.000
temp*size	1	2351621696	2351621696	94.76	0.000
day*temp*size	1	354153293	354153293	14.27	0.000
Error	213	5285761708	24815783		
Lack-of-Fit	69	5192876258	75259076	116.67	0.000
Pure Error	144	92885450	645038		
Total	216	12561249025			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4981.54	57.92%	57.33%	57.19%

ภาคผนวก ก

ผลการวิเคราะห์ความไวต่อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 32 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Micrococcus* โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

ชนิดของแบคทีเรีย	Inhibition zone diameter (mm)																	
	P			CN			AK			T0B			E					
OC strains	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3
	26-37	26-37	26-37	19-27	19-27	19-27	20-26	20-26	20-26	19-29	19-29	19-29	22-30	22-30	22-30	22-30	22-30	22-30
	30	30.5	28	24	23	23	24.5	23	22	22.5	22.5	22	26.5	22.5	24	26.5	22.5	24
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	CIP			NOR			OFX			F			DA					
	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3
	22-30	22-30	22-30	18-22	24-30	24-30	24-30	24-28	24-28	17-28	17-28	17-28	24-28	24-28	24-28	24-28	24-28	24-28
22.5	23	23	21	22	22	27	27	26	22	21.5	21	24.5	26	24.5	24.5	26	24.5	
	SXT			C			AZM			TE								
	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3	ซ้ 1	ซ้ 2	ซ้ 3
	24-32	19-26	19-26	19-26	24-30	24-30	21-26	21-26	21-26	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25
27	25	24	24	23	23	20	20	21	32	30	30	32	30	30	32	30	30	

หมายเหตุ Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)

ตารางที่ 33 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *Ko. kristinae* (ไอโซเลต 1) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	29	S	S
		ซ้ำ 2	29	S	
		ซ้ำ 3	28	R	
	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	26	S	S
		ซ้ำ 2	28	S	
		ซ้ำ 3	27	S	
Aminoglycolides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	30	S	S
		ซ้ำ 2	28	S	
		ซ้ำ 3	28	S	
	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	23.5	S	S
		ซ้ำ 2	24.5	S	
		ซ้ำ 3	24	S	
	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	20.5	S	S
		ซ้ำ 2	20	S	
		ซ้ำ 3	20.5	S	
Macrolides	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	24	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	24	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คัดต่อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 33 การแสดงควมไวต่อสารปฏิชีวนะของ *Ko. kristinae* (ไอโซเลท 1) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ซ้ำ 1	7.5	R	R
		ซ้ำ 2	8	R	
		ซ้ำ 3	8	R	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1	0	R	R
		ซ้ำ 2	0	R	
		ซ้ำ 3	0	R	
	Norfloxacin (10)	ซ้ำ 1	0	R	R
		ซ้ำ 2	0	R	
		ซ้ำ 3	0	R	
Nitrofurans	Ofloxacin (10)	ซ้ำ 1	0	R	R
		ซ้ำ 2	0	R	
		ซ้ำ 3	0	R	
	Nitrofurantoin (300)	ซ้ำ 1	22	S	S
		ซ้ำ 2	22	S	
		ซ้ำ 3	21	S	
Lincomycins	Clindamycin (2)	ซ้ำ 1	14	R	R
		ซ้ำ 2	15	I	
		ซ้ำ 3	14	R	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อต้านสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 33 การแสดงควมไวต่อสารปฏิชีวนะของ *Ko. kristinae* (ไอโซเลท 1) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้ำ 1	26.5	S	S
		ซ้ำ 2	27	S	
		ซ้ำ 3	22	S	
Phenicolis	Chloramphenicol (30)	ซ้ำ 1	22	S	S
		ซ้ำ 2	22	S	
		ซ้ำ 3	22.5	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่ต่อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 34 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลท 2) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (mcg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	22.5	R	R
		ซ้ำ 2	25	R	
		ซ้ำ 3	25	R	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	19	S	S
		ซ้ำ 2	20	S	
		ซ้ำ 3	20	S	
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	23	S	S
		ซ้ำ 2	22.5	S	
		ซ้ำ 3	23	S	
Macrolides	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	13.5	I	I
		ซ้ำ 2	13.5	I	
		ซ้ำ 3	14.5	I	
Macrolides	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	33	S	S
		ซ้ำ 2	33	S	
		ซ้ำ 3	33	S	
Macrolides	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	38	S	S
		ซ้ำ 2	38	S	
		ซ้ำ 3	40	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 34 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลต 2) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ข้อ	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ข้อ 1	15	I	I
		ข้อ 2	14	R	
		ข้อ 3	15	I	
	Ciprofloxacin (5)	ข้อ 1	22.5	S	S
		ข้อ 2	23.5	S	
		ข้อ 3	22	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)	ข้อ 1	10	R	R
		ข้อ 2	11	R	
		ข้อ 3	10.5	R	
	Ofloxacin (10)	ข้อ 1	19.5	S	S
		ข้อ 2	20	S	
		ข้อ 3	20	S	
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	ข้อ 1	6.5	R	R
		ข้อ 2	7	R	
		ข้อ 3	7.5	R	
Lincomycins	Clindamycin (2)	ข้อ 1	7.5	R	R
		ข้อ 2	8	R	
		ข้อ 3	7	R	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 34 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลท 2) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้้า 1	S	S
		ซ้้า 2	S	
		ซ้้า 3	S	
Phenicol	Chloramphenicol (30)	ซ้้า 1	I	I
		ซ้้า 2	I	
		ซ้้า 3	I	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่ต่อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 35 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลต 3) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	หมายเลข	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	25	R	R
		ซ้ำ 2	25.5	R	
		ซ้ำ 3	24.5	R	
	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	20	S	S
		ซ้ำ 2	20.5	S	
		ซ้ำ 3	21	S	
Aminoglycolides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	23.5	S	S
		ซ้ำ 2	23.5	S	
		ซ้ำ 3	23	S	
	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	14.5	I	I
		ซ้ำ 2	14.5	I	
		ซ้ำ 3	14	I	
Macrolides	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	33	S	S
		ซ้ำ 2	34.5	S	
		ซ้ำ 3	35	S	
	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	41	S	S
		ซ้ำ 2	41	S	
		ซ้ำ 3	39	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไม่นานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 35 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลท 3) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ซ้11	I	I
		ซ้12	I	
		ซ้13	R	
	Ciprofloxacin (5)	ซ้11	S	S
		ซ้12	S	
		ซ้13	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)	ซ้11	R	R
		ซ้12	R	
		ซ้13	I	
	Ofloxacin (10)	ซ้11	S	S
		ซ้12	S	
		ซ้13	S	
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	ซ้11	R	R
		ซ้12	R	
		ซ้13	R	
Lincomycins	Clindamycin (2)	ซ้11	R	R
		ซ้12	R	
		ซ้13	R	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 35 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลท 3) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้ำ 1			36	S	S
		ซ้ำ 2			31.5	S	
		ซ้ำ 3			27.5	S	
Phenicolis	Chloramphenicol (30)	ซ้ำ 1			16.5	S	S
		ซ้ำ 2			17	S	
		ซ้ำ 3			16.5	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 36 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลท 4) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	26	R	R
		ซ้ำ 2	26	R	
		ซ้ำ 3	27	R	
	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	21	S	S
		ซ้ำ 2	20	S	
		ซ้ำ 3	20	S	
Aminoglycolides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	28	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	23	S	
	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	14.5	I	I
		ซ้ำ 2	14	I	
		ซ้ำ 3	14	I	
	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	34	S	S
		ซ้ำ 2	34	S	
		ซ้ำ 3	34	S	
Macrolides	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	40	S	S
		ซ้ำ 2	40	S	
		ซ้ำ 3	40	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 36 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarii* (ไอ โซลเลท 4) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (mcg)	ซ้ำ 1 ซ้ำ 2 ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ซ้ำ 1	14	R	I
		ซ้ำ 2	16	I	
		ซ้ำ 3	16	I	
	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1	26	S	S
		ซ้ำ 2	25	S	
		ซ้ำ 3	25	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)	ซ้ำ 1	12	R	R
		ซ้ำ 2	12	R	
		ซ้ำ 3	11.5	R	
	Ofloxacin (10)	ซ้ำ 1	22	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	20	S	
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	ซ้ำ 1	10	R	R
		ซ้ำ 2	10	R	
		ซ้ำ 3	10	R	
Lincomycins	Clindamycin (2)	ซ้ำ 1	0	R	R
		ซ้ำ 2	11	R	
		ซ้ำ 3	10	R	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 36 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (ไอโซเลท 4) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้ำ 1			36	S	S
		ซ้ำ 2			38	S	
		ซ้ำ 3			20	S	
Phenicol	Chloramphenicol (30)	ซ้ำ 1			16	I	I
		ซ้ำ 2			15	I	
		ซ้ำ 3			15	I	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 37 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

ชนิดของแบคทีเรีย	Inhibition zone diameter (mm)														
	P			CN			AK			TOB			E		
QC strains	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3
	26-37	26-37	26-37	19-27	19-27	19-27	20-26	20-26	20-26	19-29	19-29	19-29	22-30	22-30	22-30
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	33	32.5	30	27	24	25	24.5	24	26	27	25	27	25	26	27
	CIP			NOR			OFX			F			DA		
	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3
	22-30	22-30	22-30	18-22	24-30	24-30	24-30	24-28	24-28	17-28	17-28	17-28	24-28	24-28	24-28
	27	27	27	22	28	28	28	28	26	27.5	26	26	27	28	26
	SXT			C			AZM			TE					
	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3	ซ้ ซ้ 1	ซ้ ซ้ 2	ซ้ ซ้ 3
	24-32	19-26	19-26	19-26	24-30	24-30	21-26	21-26	21-26	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25	20-25
	32	26	26	26	26.5	27.5	20	20.5	19.5	30	31	31	30	28	26

หมายเหตุ Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Tetracycline (TE), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)

ตารางที่ 38 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 5) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (μg)	การปฏิชีวนะ (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	R	R
		ซ้ำ 2	R	
		ซ้ำ 3	R	
	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	S	S
		ซ้ำ 2	S	
		ซ้ำ 3	S	
Aminoglycolides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	S	S
		ซ้ำ 2	S	
		ซ้ำ 3	S	
	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	S	S
		ซ้ำ 2	S	
		ซ้ำ 3	S	
Macrolides	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	I	I
		ซ้ำ 2	I	
		ซ้ำ 3	I	
	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	I	I
		ซ้ำ 2	I	
		ซ้ำ 3	I	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ค่อนข้างดื้อต่อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 38 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลต 5) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ข้อ 1	ข้อ 2	ข้อ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ข้อ 1			8	R	R
		ข้อ 2			8	R	
		ข้อ 3			8	R	
	Ciprofloxacin (5)	ข้อ 1			25	S	S
		ข้อ 2			24	S	
		ข้อ 3			26	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)	ข้อ 1			23.5	S	S
		ข้อ 2			24	S	
		ข้อ 3			23	S	
	Ofloxacin (10)	ข้อ 1			24.5	S	S
		ข้อ 2			23.5	S	
		ข้อ 3			23	S	
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	ข้อ 1			22	S	S
		ข้อ 2			20	S	
		ข้อ 3			21	S	
Lincomycins	Clindamycin (2)	ข้อ 1			21	S	S
		ข้อ 2			23	S	
		ข้อ 3			24	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 38 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 5) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้ำ 1			22	S	
		ซ้ำ 2			20	S	S
		ซ้ำ 3			23	S	
Phenicolis	Chloramphenicol (30)	ซ้ำ 1			23	S	
		ซ้ำ 2			23	S	S
		ซ้ำ 3			22	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังกล่าวปฏิชีวนะ

ตารางที่ 39 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 6) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	จำนวน	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	12	R	R
		ซ้ำ 2	12	R	
		ซ้ำ 3	12.5	R	
	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	25	S	S
		ซ้ำ 2	24.5	S	
		ซ้ำ 3	26	S	
Aminoglycolides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	27.5	S	S
		ซ้ำ 2	27	S	
		ซ้ำ 3	26	S	
	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	23	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	23	S	
Macrolides	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	17	I	I
		ซ้ำ 2	17	I	
		ซ้ำ 3	17	I	
	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	19	I	I
		ซ้ำ 2	20	I	
		ซ้ำ 3	20	I	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อต้านสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 39 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลต 6) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (μg)	จำนวน	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Tetracycline	Tetracycline (30)	ซ้ำ 1	9	R	R
		ซ้ำ 2	9	R	
		ซ้ำ 3	8	R	
	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1	25	S	S
		ซ้ำ 2	25	S	
		ซ้ำ 3	26	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)	ซ้ำ 1	23	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	23	S	
	Ofloxacin (10)	ซ้ำ 1	23	S	S
		ซ้ำ 2	23.5	S	
		ซ้ำ 3	24	S	
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)	ซ้ำ 1	21.5	S	S
		ซ้ำ 2	22	S	
		ซ้ำ 3	22	S	
Lincomycins	Clindamycin (2)	ซ้ำ 1	22	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	22	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 39 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 6) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้ำ 1			23	S	S
		ซ้ำ 2			22.5	S	
		ซ้ำ 3			22	S	
Phenicolis	Chloramphenicol (30)	ซ้ำ 1			23	S	S
		ซ้ำ 2			23	S	
		ซ้ำ 3			22	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 40 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 7) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (μg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Penicillin	Penicillin (10 ยูนิท)	ซ้ำ 1	11	R	R
		ซ้ำ 2	10	R	
		ซ้ำ 3	11	R	
	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	21.5	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	22	S	
Aminoglycolides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	25	S	S
		ซ้ำ 2	25	S	
		ซ้ำ 3	23.5	S	
	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	22	S	S
		ซ้ำ 2	22	S	
		ซ้ำ 3	22	S	
Macrolides	Azithromycin (15)	ซ้ำ 1	16	I	I
		ซ้ำ 2	16	I	
		ซ้ำ 3	16	I	
	Erythromycin (15)	ซ้ำ 1	19	I	I
		ซ้ำ 2	18	I	
		ซ้ำ 3	18	I	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อต้านสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 40 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 7) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Tetracycline	Tetracycline (30)		8	R	R
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	8	R	
	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	8	R	
	Ciprofloxacin (5)		25	S	S
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	25	S	
	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	24	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)		22	S	S
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	22	S	
	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	22	S	
	Ofloxacin (10)		23	S	S
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	24	S	
	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	23	S	
Nitrofurans	Nitrofurantoin (300)		20	S	S
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	21	S	
	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	20	S	
Lincomycins	Clindamycin (2)		21.5	S	S
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	23	S	
	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	22	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไม่นานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 40 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (ไอโซเลท 7) โดยมี *S. aureus* ATCC® 29213 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้ำ 1			20	S	
		ซ้ำ 2			22	S	S
		ซ้ำ 3			20	S	
Phenicolis	Chloramphenicol (30)	ซ้ำ 1			21	S	
		ซ้ำ 2			21	S	S
		ซ้ำ 3			21	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 41 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853

ชนิดของแบคทีเรีย	Inhibition zone diameter (mm)											
	FEP			ATM			MEM			CN		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	25-31	25-31	25-31	23-29	23-29	23-29	27-33	27-33	27-33	17-23	17-23	17-23
	29	29	28	24	25	24	32	32	33	20	21	21
	AK			TOB			CIP					
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3			
	18-26	18-26	18-26	20-26	20-26	20-26	25-33	25-33	25-33			
	25	25	25	23	23	23	30	30	29			

หมายเหตุ Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)

ตารางที่ 42 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* (ไอโซเลท 8) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (μg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ข้อ 1	ข้อ 2			
Cephalosporins	Cefazidime (30)*	ข้อ 1	30	S	S
		ข้อ 2	30	S	
		ข้อ 3	28	S	
Monobactams	Aztreonam (30)	ข้อ 1	26	S	S
		ข้อ 2	25	S	
		ข้อ 3	24.5	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ข้อ 1	34	S	S
		ข้อ 2	33	S	
		ข้อ 3	31	S	
	Gentamicin (10)	ข้อ 1	21	S	S
		ข้อ 2	22	S	
		ข้อ 3	20	S	
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ข้อ 1	25	S	S
		ข้อ 2	25	S	
		ข้อ 3	25	S	
	Tobramycin (10)	ข้อ 1	24	S	S
		ข้อ 2	23	S	
		ข้อ 3	22.5	S	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ข้อ 1	29	S	S
		ข้อ 2	31	S	
		ข้อ 3	31	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, *กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3

ตารางที่ 43 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. fluorescens* (ไอโซเลขที่ 9) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (μg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ข้อ 1	ข้อ 2			
Cephalosporins	Cefiazidime (30)*	ข้อ 1	25	S	S
		ข้อ 2	26.5	S	
		ข้อ 3	25.5	S	
Monobactams	Aztreonam (30)	ข้อ 1	23	S	S
		ข้อ 2	24	S	
		ข้อ 3	23	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ข้อ 1	32	S	S
		ข้อ 2	34	S	
		ข้อ 3	33	S	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ข้อ 1	19	S	S
		ข้อ 2	20	S	
		ข้อ 3	19	S	
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ข้อ 1	22	S	S
		ข้อ 2	23	S	
		ข้อ 3	22	S	
Aminoglycosides	Tobramycin (10)	ข้อ 1	24	S	S
		ข้อ 2	23	S	
		ข้อ 3	22.5	S	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ข้อ 1	35	S	S
		ข้อ 2	33.5	S	
		ข้อ 3	34	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, *กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3

ตารางที่ 44 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. putida* (ไอโซเลท 10) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ข้อ	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Cephalosporins	Ceftazidime (30)*	ข้อ 1	26	S	S
		ข้อ 2	25	S	
		ข้อ 3	28	S	
Monobactams	Aztreonam (30)	ข้อ 1	24	S	S
		ข้อ 2	23	S	
		ข้อ 3	24.5	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ข้อ 1	33	S	S
		ข้อ 2	33	S	
		ข้อ 3	35	S	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ข้อ 1	20	S	S
		ข้อ 2	20	S	
		ข้อ 3	21	S	
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ข้อ 1	23	S	S
		ข้อ 2	24	S	
		ข้อ 3	22	S	
Quinolones	Tobramycin (10)	ข้อ 1	23	S	S
		ข้อ 2	23	S	
		ข้อ 3	23	S	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ข้อ 1	33.5	S	S
		ข้อ 2	34	S	
		ข้อ 3	32.5	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, *กลุ่มยาเซฟทาโลสปอรินรุ่นที่ 3

ตารางที่ 45 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. putida* (ไอโซเลท 11) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Cephalosporins	Cefiazidime (30)*	ซ้ำ 1	25.5	S	S
		ซ้ำ 2	25	S	
		ซ้ำ 3	27	S	
Monobactams	Aztreonam (30)	ซ้ำ 1	23	S	S
		ซ้ำ 2	22.5	S	
		ซ้ำ 3	23	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซ้ำ 1	35	S	S
		ซ้ำ 2	35	S	
		ซ้ำ 3	34	S	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	20	S	S
		ซ้ำ 2	19.5	S	
		ซ้ำ 3	20	S	
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	22.5	S	S
		ซ้ำ 2	23	S	
		ซ้ำ 3	21.5	S	
Quinolones	Tobramycin (10)	ซ้ำ 1	21	S	S
		ซ้ำ 2	22.5	S	
		ซ้ำ 3	21	S	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1	34	S	S
		ซ้ำ 2	33	S	
		ซ้ำ 3	33	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, *กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3

ตารางที่ 46 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. oryzae* (ไอโซเลท 12) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/R	สรุป
	ซึ้ง 1	ซึ้ง 2			
Cephalosporins	Cefazidime (30)*	ซึ้ง 1	26	S	S
		ซึ้ง 2	27	S	
		ซึ้ง 3	28	S	
Monobactams	Aztreonam (30)	ซึ้ง 1	22	S	S
		ซึ้ง 2	24	S	
		ซึ้ง 3	24	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซึ้ง 1	33	S	S
		ซึ้ง 2	31	S	
		ซึ้ง 3	35	S	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ซึ้ง 1	19	S	S
		ซึ้ง 2	19	S	
		ซึ้ง 3	20	S	
	Amikacin (30)	ซึ้ง 1	24	S	S
		ซึ้ง 2	23	S	
		ซึ้ง 3	23,5	S	
Quinolones	Tobramycin (10)	ซึ้ง 1	22	S	S
		ซึ้ง 2	22	S	
		ซึ้ง 3	22	S	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ซึ้ง 1	34	S	S
		ซึ้ง 2	34	S	
		ซึ้ง 3	34	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, *กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3

ตารางที่ 47 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Stenophotomonas* โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

ชนิดของแบคทีเรีย	Inhibition zone diameter (mm)														
	PRL			CAZ			CN			CIP			FEP		
QC strains	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
	25-33	25-33	25-33	22-29	22-29	22-29	17-23	17-23	17-23	25-33	25-33	25-33	25-31	25-31	25-31
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	28	30	27.5	27	28	26	20.5	22	21	31.5	33	32	29	28.5	28
	AK			ATM			MEM			NOR					
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
	18-26	18-26	18-26	23-29	23-29	23-29	27-33	27-33	27-33	22-29	22-29	22-29	22-29	22-29	22-29
	26	25	25	25.5	26	25	32.5	32	32.5	29	29	28			

หมายเหตุ Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Gentamicin (CN), Ciprofloxacin (CIP), Cefepime (FEP), Amikacin (AK), Aztreonam (ATM), Ofloxacin (OFX), Meropenem (MEM) และ Norfloxacin (NOR)

ตารางที่ 48 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (ไอโซเลท 13) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/R	สรุป
	ซ้11	ซ้12			
Penicillins	Piperacillin (100)*	ซ้11	19	I	I
		ซ้12	20	I	
		ซ้13	20	I	
Cephalosporins	Cefazidime (30)**	ซ้11	26	S	S
		ซ้12	29	S	
		ซ้13	25	S	
Monobactams	Cefepime (30)***	ซ้11	17	I	I
		ซ้12	18	S	
		ซ้13	17	I	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซ้11	14	R	R
		ซ้12	12	R	
		ซ้13	9.5	R	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ซ้11	8	R	R
		ซ้12	10	R	
		ซ้13	9	R	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่ต่อสารปฏิชีวนะ

*ยากลุ่มเพนิซิลลินในกุ่มย่อยแอนตี้ซูโดโมเนล เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3,

***กุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4

ตารางที่ 48 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (ไอโซเลท 13) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1	0	R	R
		ซ้ำ 2	0	R	
		ซ้ำ 3	0	R	
	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1	28	S	S
		ซ้ำ 2	29	S	
		ซ้ำ 3	28	S	
Quinolones	Norfloxacin (10)	ซ้ำ 1	22	S	S
		ซ้ำ 2	22	S	
		ซ้ำ 3	20	S	
	Ofloxacin (5)	ซ้ำ 1	27	S	S
		ซ้ำ 2	29	S	
		ซ้ำ 3	27.5	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 49 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (ไอโซเลท 14) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2			
Penicillins	Piperacillin (100)*	ซ้ำ 1	18	I	I
		ซ้ำ 2	20.5	I	
		ซ้ำ 3	21	S	
Cephalosporins	Ceftazidime (30)**	ซ้ำ 1	27	S	S
		ซ้ำ 2	27	S	
		ซ้ำ 3	29	S	
	Cefepime (30)***	ซ้ำ 1	17	I	I
		ซ้ำ 2	17.5	I	
		ซ้ำ 3	18.5	S	
Monobactams	Aztreonam (30)	ซ้ำ 1	14	R	R
		ซ้ำ 2	13	R	
		ซ้ำ 3	11	R	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซ้ำ 1	14	R	R
		ซ้ำ 2	11	R	
		ซ้ำ 3	14	R	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ซ้ำ 1	11	R	R
		ซ้ำ 2	11	R	
		ซ้ำ 3	11.5	R	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดื้อต่อสารปฏิชีวนะ

*ยากกลุ่มเพนิซิลลินในกลุ่มย่อยแอนติซูโดโมโนดเพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3,

***กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4

ตารางที่ 49 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (ไอโซเลท 14) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1			0	R	R
		ซ้ำ 2			0	R	
		ซ้ำ 3			0	R	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1			30	S	S
		ซ้ำ 2			30	S	
		ซ้ำ 3			29	S	
	Norfloxacin (10)	ซ้ำ 1			21	S	S
		ซ้ำ 2			26.5	S	
		ซ้ำ 3			23	S	
Ofloxacin (5)	Ofloxacin (5)	ซ้ำ 1			29	S	S
		ซ้ำ 2			28.5	S	
		ซ้ำ 3			29	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 50 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (ไอโซเลท 15) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (mcg)		Inhibition zone diameter (mm)	S/R	สรุป
	ชื่อยา	ความเข้มข้น			
Penicillins	Piperacillin (100)*	ชื่อยา 1	24	S	S
		ชื่อยา 2	21	S	
		ชื่อยา 3	21	S	
Cephalosporins	Cefazidime (30)**	ชื่อยา 1	30	S	S
		ชื่อยา 2	28.5	S	
		ชื่อยา 3	28	S	
Monobactams	Cefepime (30)***	ชื่อยา 1	21	S	S
		ชื่อยา 2	21	S	
		ชื่อยา 3	19	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ชื่อยา 1	12	R	R
		ชื่อยา 2	11.5	R	
		ชื่อยา 3	contamination	-	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ชื่อยา 1	13.5	R	R
		ชื่อยา 2	13.5	R	
		ชื่อยา 3	contamination	-	
		ชื่อยา 1	9.5	S	S
		ชื่อยา 2	9	S	
		ชื่อยา 3	9.5	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

*ยากดเมเพนิซิลลินในกลุ่ย่อยแอนตีซูโดโมเนล เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กลุ่ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3,

***กลุ่ยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4

ตารางที่ 50 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (ไอโซเลท 15) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Aminoglycosides	Amikacin (30)	ซ้ำ 1			0	R	
		ซ้ำ 2			0	R	R
		ซ้ำ 3			contamination	-	
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ซ้ำ 1			28.5	S	
		ซ้ำ 2			28	S	S
		ซ้ำ 3			29	S	
	Norfloxacin (10)	ซ้ำ 1			22	S	
		ซ้ำ 2			22	S	S
		ซ้ำ 3			contamination	-	
Ofloxacin (5)	ซ้ำ 1			29	S		
	ซ้ำ 2			27.5	S	S	
	ซ้ำ 3			contamination	-		

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดื้อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 51 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Acinetobacter* โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 เป็นชุดควบคุม

ชนิดของแบคทีเรีย	Inhibition zone diameter (mm)											
	PRL			CAZ			CFP			MEM		
<i>QC strains</i>	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
	25 - 33	25 - 33	25 - 33	22 - 29	22 - 29	22 - 29	25 - 31	25 - 31	25 - 31	27 - 33	27 - 33	27 - 33
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	29	29	29	28	28.5	29	29	29	29.5	33	33	32
	CN			AK			TOB			CIP		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
	17 - 23	17 - 23	17 - 23	18 - 26	18 - 26	18 - 26	20 - 26	20 - 26	20 - 26	25 - 33	25 - 33	25 - 33
	21	21.5	21	26	25	25	24	24.5	23	31	32	30

หมายเหตุ Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CFP), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP),

ตารางที่ 52 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกลุ่ม *Acinetobacter* โดยมี *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุดควบคุม

ชนิดของแบคทีเรีย	Inhibition zone diameter (mm)									
	TZP			TE			SXT			
QC strains	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 3
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	24-30	24-30	24-30	18-25	18-25	18-25	23-29	23-29	23-29	23-29
	28	28	28	27.5	27	28.5	29	28	28	29

หมายเหตุ Piperacillin-tazobactam (TZP), Tetracycline (TE) และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)

ตารางที่ 53 การแสดงคามไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 16) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุด

ควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillins	Piperacillin (100)*	ซ้ำ 1	S	
		ซ้ำ 2	I	I
		ซ้ำ 3	I	
β-Lactam/β-Lactamase	Piperacillin-tazobactam	ซ้ำ 1	S	
		ซ้ำ 2	S	S
		ซ้ำ 3	S	
Cephalosporins	Ceftazidime (30)**	ซ้ำ 1	S	
		ซ้ำ 2	S	S
		ซ้ำ 3	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซ้ำ 1	S	
		ซ้ำ 2	S	S
		ซ้ำ 3	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คัดต่อสารปฏิชีวนะ

*ยากกลุ่มเพนิซิลลินในกลุ่มย่อยแอมพิซิโดไมนอล เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3,

***กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4

ตารางที่ 53 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 15) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุด

ควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (mg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/M/R	สรุป	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	S		
		ที่ 13	S		
	Amikacin (30)	ที่ 11	22.5	S	S
		ที่ 12	22.5	S	
		ที่ 13	22	S	
Tobramycin (10)	ที่ 11	21	S	S	
	ที่ 12	20.5	S		
	ที่ 13	20	S		
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	26		
		ที่ 13	26		
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	25		
		ที่ 13	25.5		
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	26		
		ที่ 13	24		

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คัดต่อสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 54 การแสดงความสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 17) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุด

ควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillins	Piperacillin (100)*	ซ้ำ 1	I	I
		ซ้ำ 2	I	
		ซ้ำ 3	I	
β-Lactam/β-Lactamase	Piperacillin-tazobactam	ซ้ำ 1	S	S
		ซ้ำ 2	S	
		ซ้ำ 3	S	
Cephalosporins	Ceftazidime (30)**	ซ้ำ 1	S	S
		ซ้ำ 2	S	
		ซ้ำ 3	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซ้ำ 1	S	S
		ซ้ำ 2	S	
		ซ้ำ 3	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังกล่าวปฏิชีวนะ

*ยากลุ่มเพนิซิลลินในกลุ่มย่อยแอนติซูโดโมโนด เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3,

***กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4

ตารางที่ 54 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 17) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุด

ควบคุม (ต่อ)

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ซ้า 1	S	S	
		ซ้า 2	S		
		ซ้า 3	S		
	Amikacin (30)	ซ้า 1	24	S	S
		ซ้า 2	29.5	S	
		ซ้า 3	24	S	
	Tobramycin (10)	ซ้า 1	21	S	S
		ซ้า 2	21.5	S	
		ซ้า 3	22	S	
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ซ้า 1	S	S	
		ซ้า 2	25.5		
		ซ้า 3	25		
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ซ้า 1	S	S	
		ซ้า 2	26		
		ซ้า 3	26		
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ซ้า 1	S	S	
		ซ้า 2	23		
		ซ้า 3	21.5		

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดต่อการปฏิชีวนะ

ตารางที่ 55 การแสดงค่าความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 18) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุด

ควบคุม

กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (µg)	หมายเลข	Inhibition zone diameter (mm)	S/I/R	สรุป
Penicillins	Piperacillin (100)*	ซ้ำ 1	20	I	I
		ซ้ำ 2	20.5	I	
		ซ้ำ 3	20.5	I	
β-Lactam/β-Lactamase	Piperacillin-tazobactam	ซ้ำ 1	22.5	S	S
		ซ้ำ 2	22.5	S	
		ซ้ำ 3	22	S	
Cephalosporins	Ceftazidime (30)**	ซ้ำ 1	21	S	S
		ซ้ำ 2	21	S	
		ซ้ำ 3	21	S	
	Cefepime (30)***	ซ้ำ 1	21	S	S
		ซ้ำ 2	21	S	
		ซ้ำ 3	21	S	
Carbapenems	Meropenem (10)	ซ้ำ 1	24	S	S
		ซ้ำ 2	25.5	S	
		ซ้ำ 3	24	S	

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อดังกล่าวปฏิชีวนะ

*ยาในกลุ่มเพนิซิลลินในกุ่มย่อยแอนตี้โซโดโมนอล เพนิซิลลิน (Antipseudomonal penicillins), **กุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 3,

***กุ่มยาเซฟาโลสปอรินรุ่นที่ 4

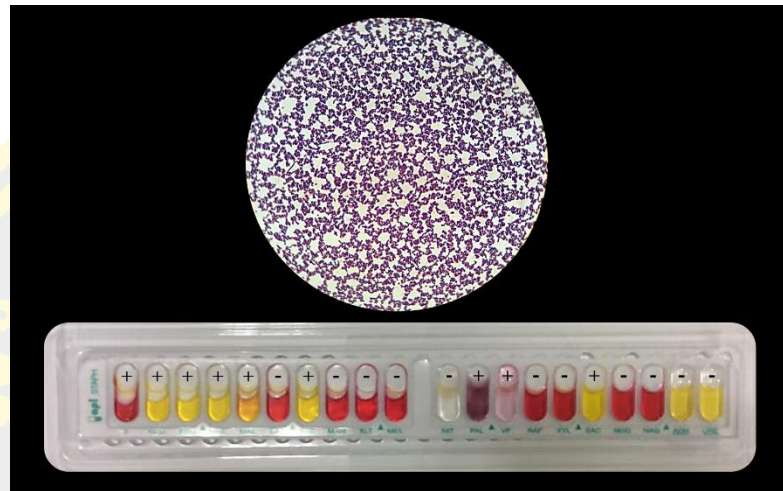
ตารางที่ 55 การแสดงความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ไอโซเลท 18) โดยมี *P. aeruginosa* ATCC® 27853 และ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นชุด

ควบคุม (ต่อ)

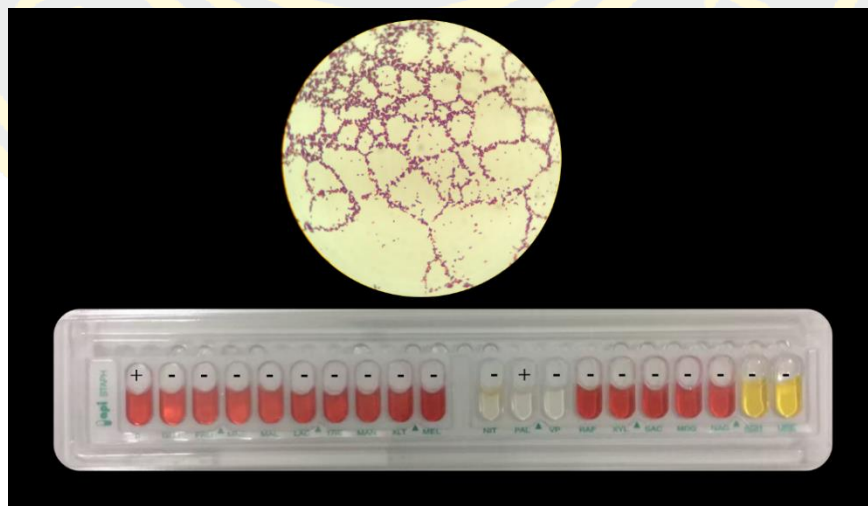
กลุ่มสารปฏิชีวนะ	สารปฏิชีวนะ (mg)	Inhibition zone diameter (mm)	S/M/R	สรุป	
Aminoglycosides	Gentamicin (10)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	S		
		ที่ 13	S		
	Amikacin (30)	ที่ 11	23.5	S	S
		ที่ 12	23.5	S	
		ที่ 13	24	S	
		ที่ 11	21.5	S	
		ที่ 12	21.5	S	
		ที่ 13	23	S	
Tetracyclines	Tetracycline (30)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	S		
		ที่ 13	S		
Quinolones	Ciprofloxacin (5)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	S		
		ที่ 13	S		
		ที่ 11	28		S
		ที่ 12	28		S
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75)	ที่ 11	S	S	
		ที่ 12	S		
		ที่ 13	S		
		ที่ 11	26		S
		ที่ 12	25		S
		ที่ 13	25.5		S

หมายเหตุ S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คัดต่อสารปฏิชีวนะ

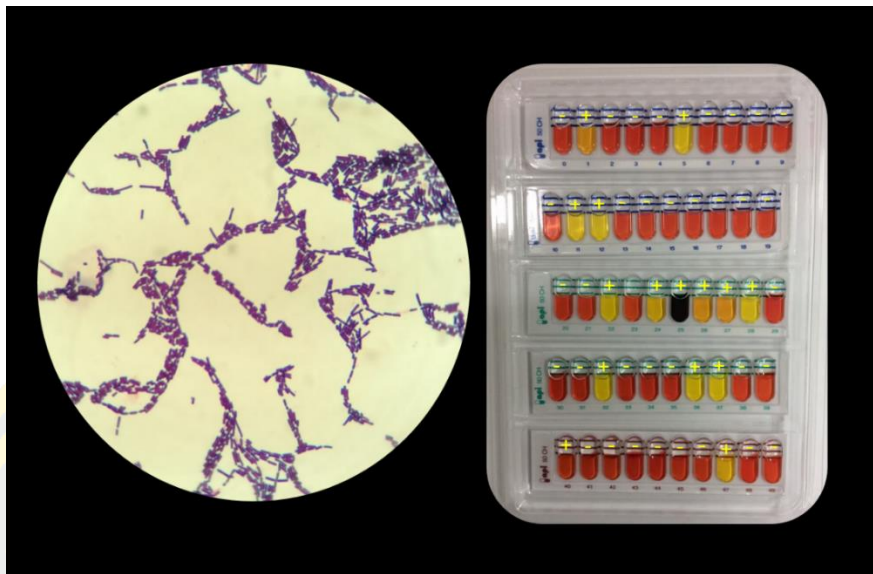
ภาคผนวก ข
ภาพผลการทดลอง



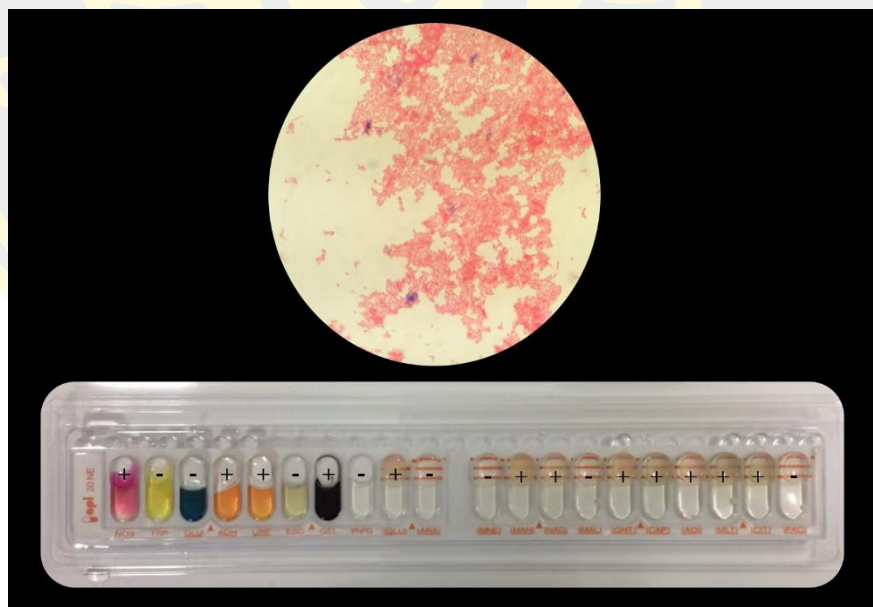
ภาพ 24 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *Ko. kristinae*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



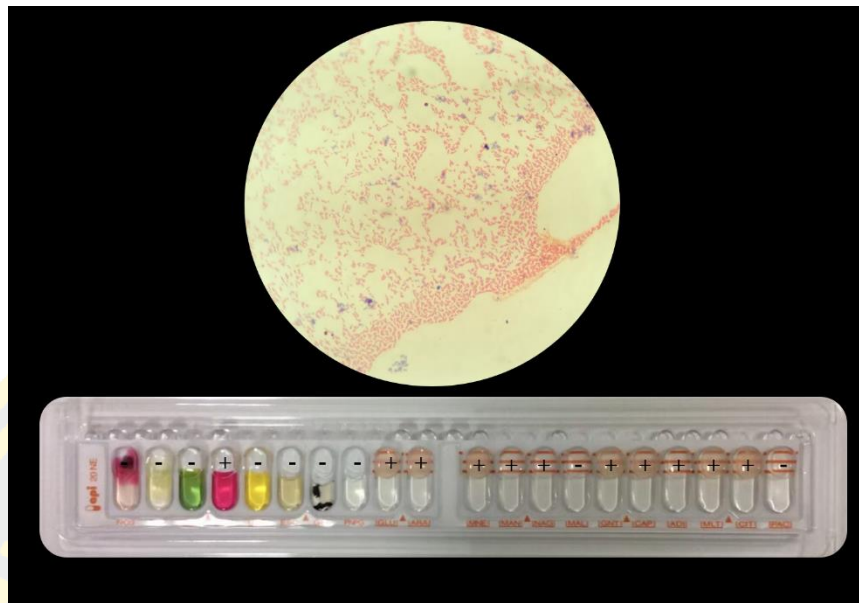
ภาพ 25 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *K. sedentarius*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



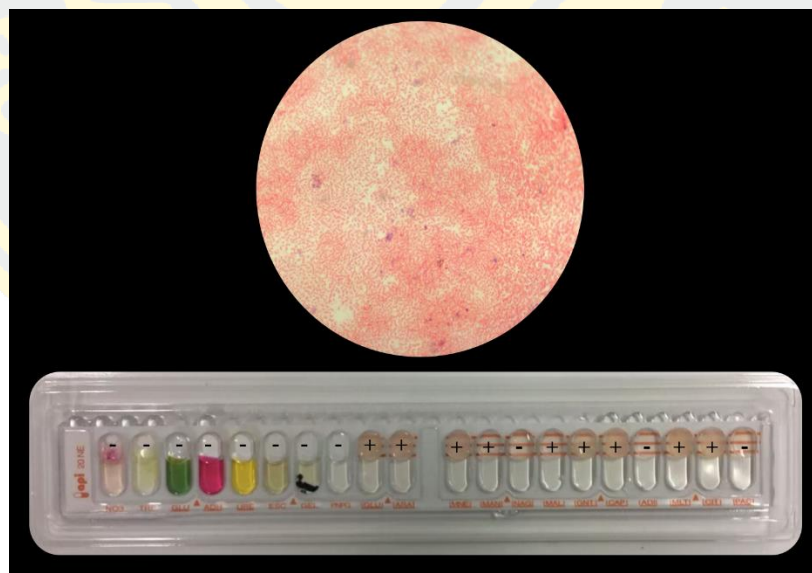
ภาพ 26 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *B. cereus*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



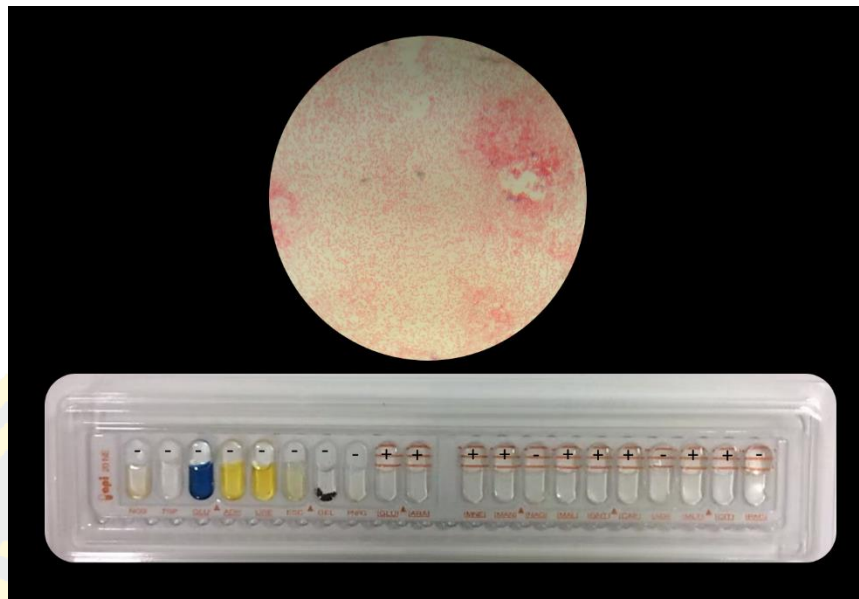
ภาพ 27 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *P. aeruginosa*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



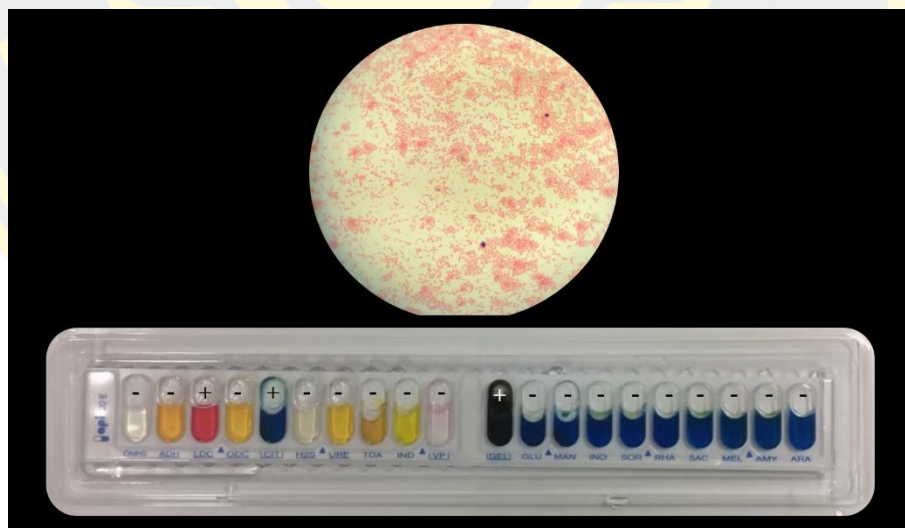
ภาพ 28 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *P. fluorescens*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



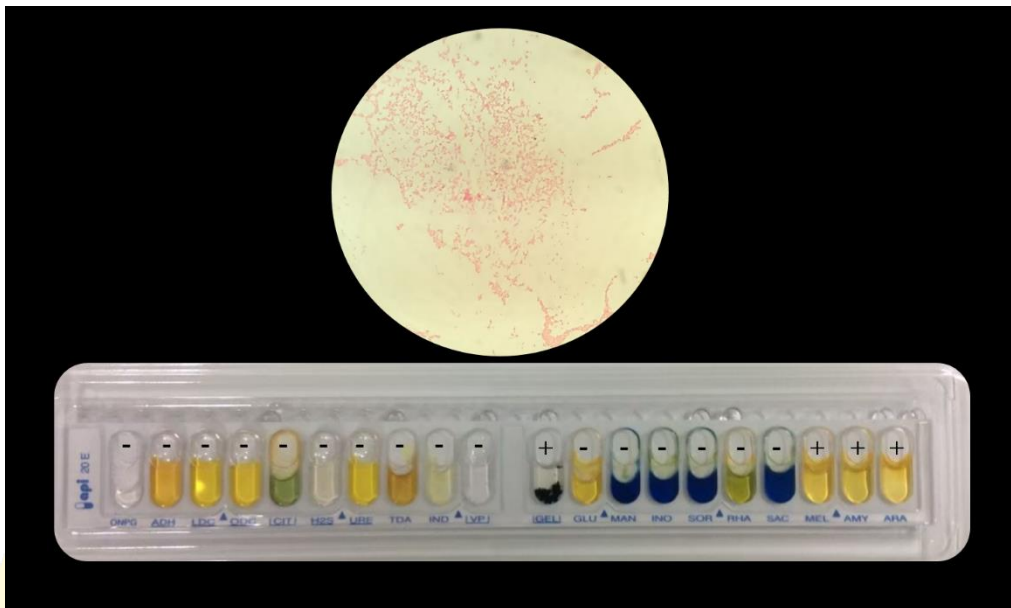
ภาพ 29 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *P. putida*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



ภาพ 30 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *P. oryzae*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

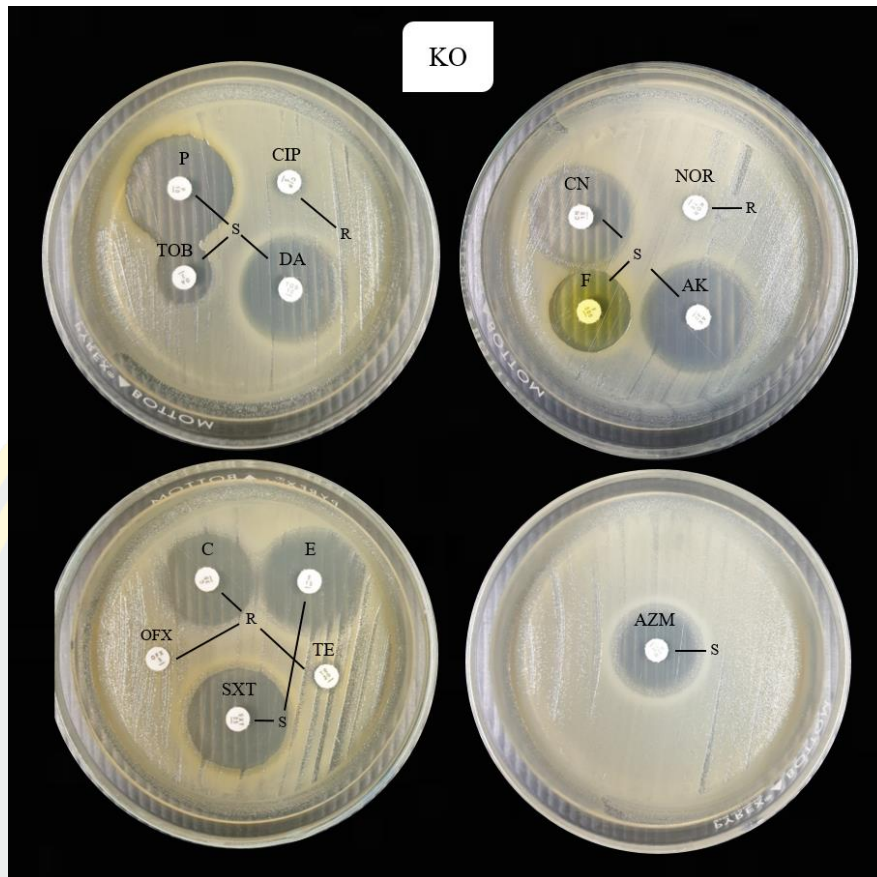


ภาพ 31 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *S. maltophilia*
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ



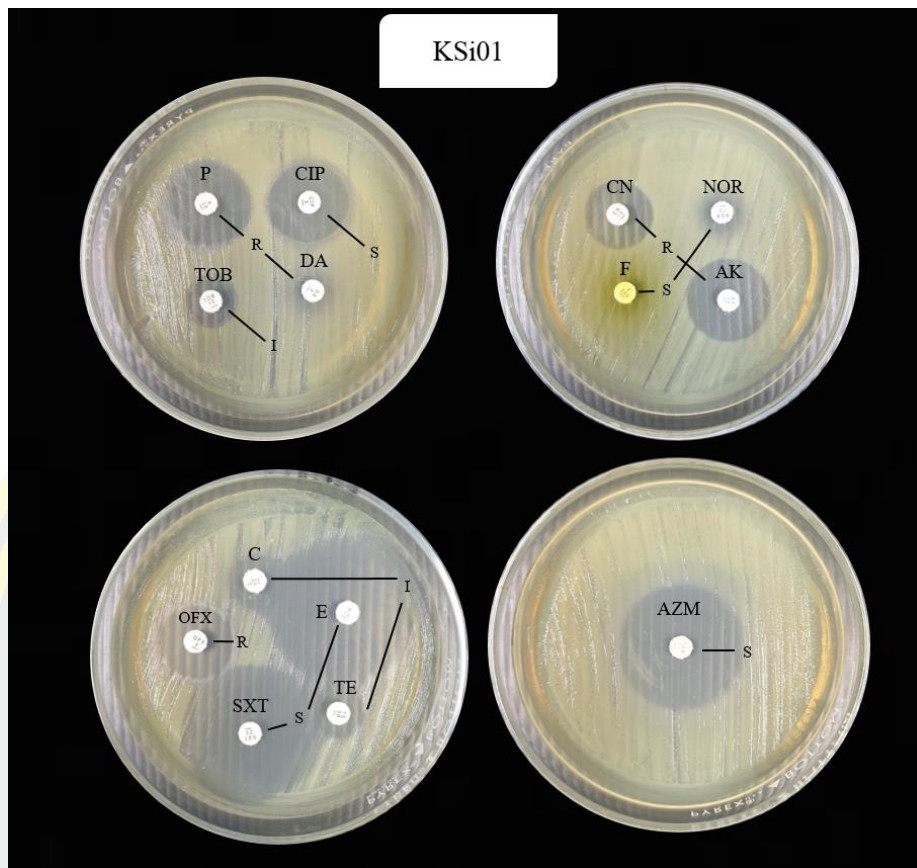
ภาพ 32 ภาพการย้อมสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และผลการการจำแนกแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Kit ของ *A. baumannii*,
+ ผลเป็นบวก, - ผลเป็นลบ

BURAPHA UNIVERSITY



ภาพ 33 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *Ko. kristinae* ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)



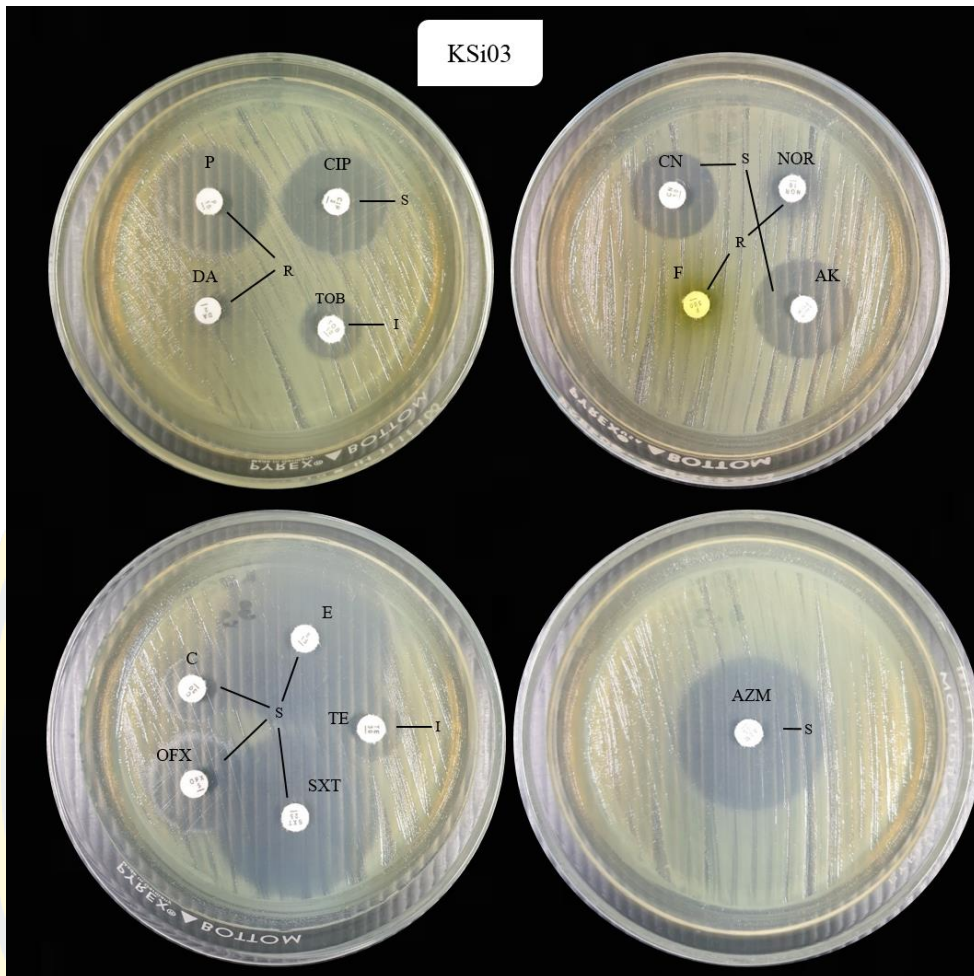
ภาพ 34 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (KSi01) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, R คือต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)



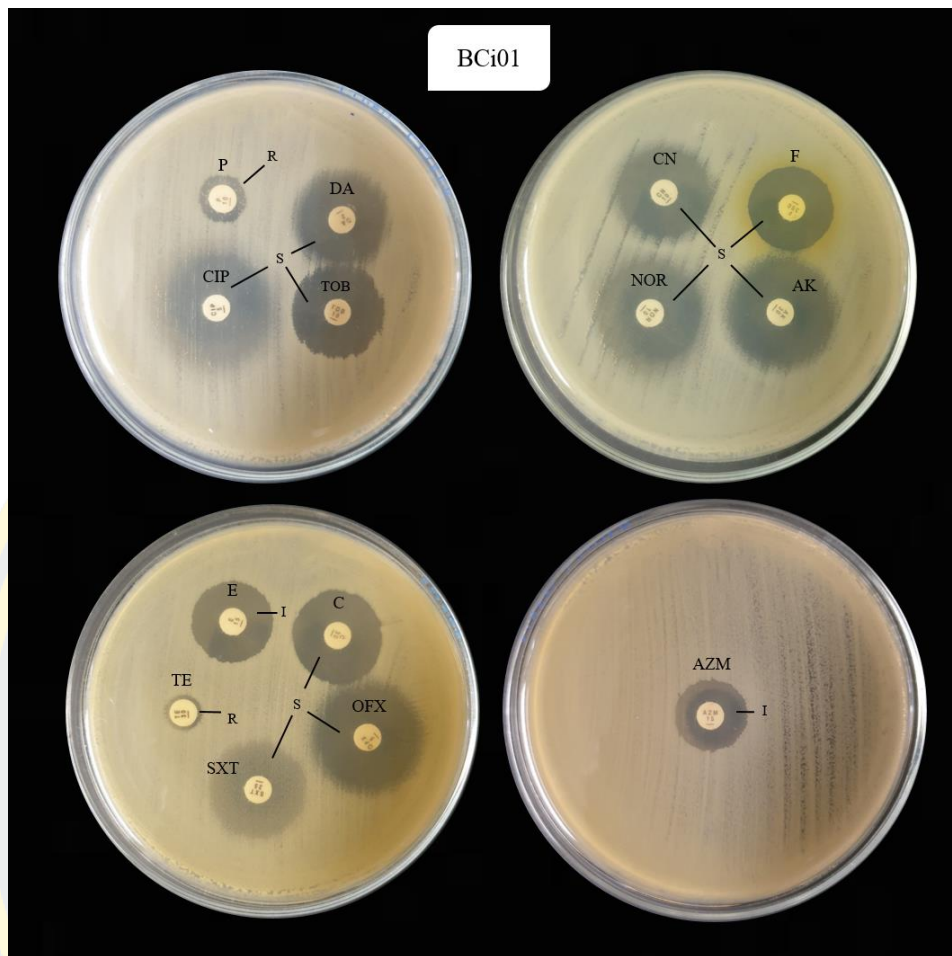
ภาพ 35 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (KSi02) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, R คือต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)



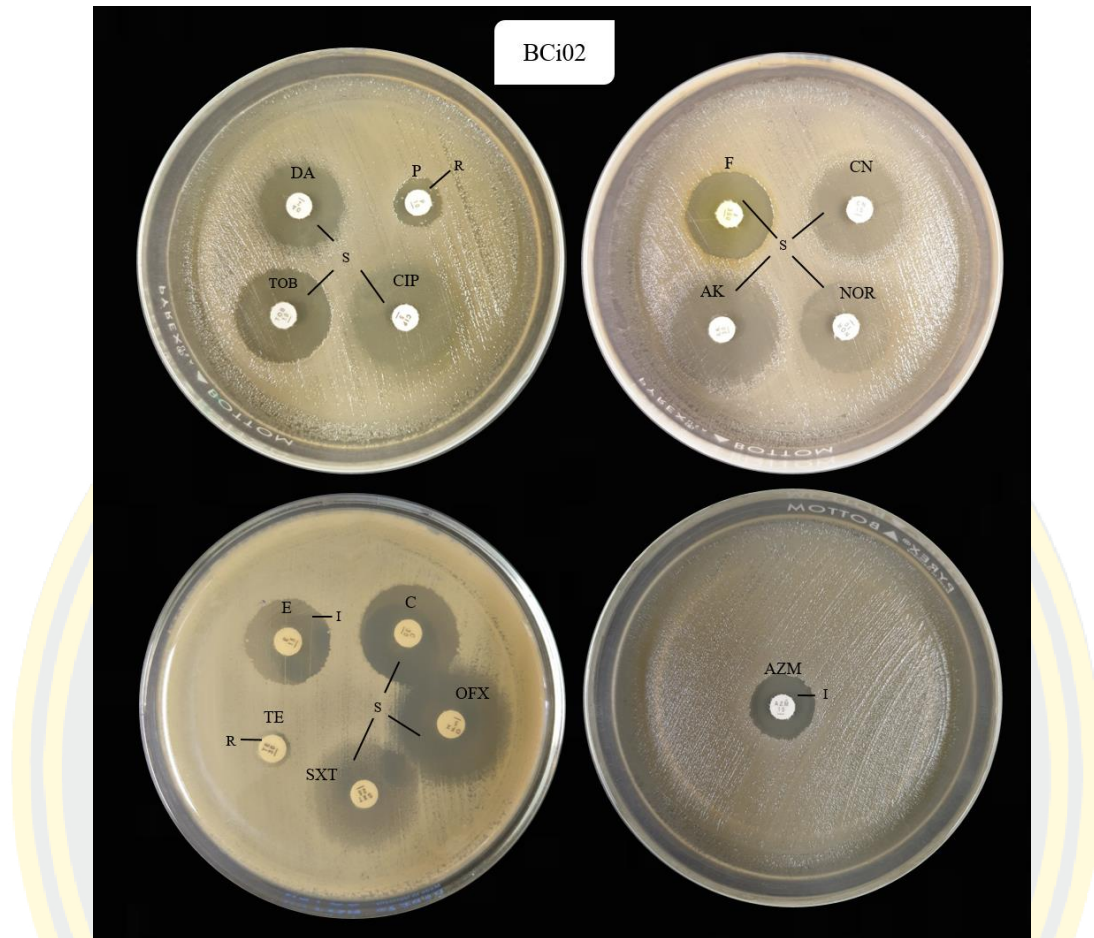
ภาพ 36 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *K. sedentarius* (KSi03) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, R คือต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Erythromycin (E), Ciprofloxacin (CIP), Norfloxacin (NOR), Ofloxacin (OFX), Nitrofurantoin (F), Clindamycin (DA), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)



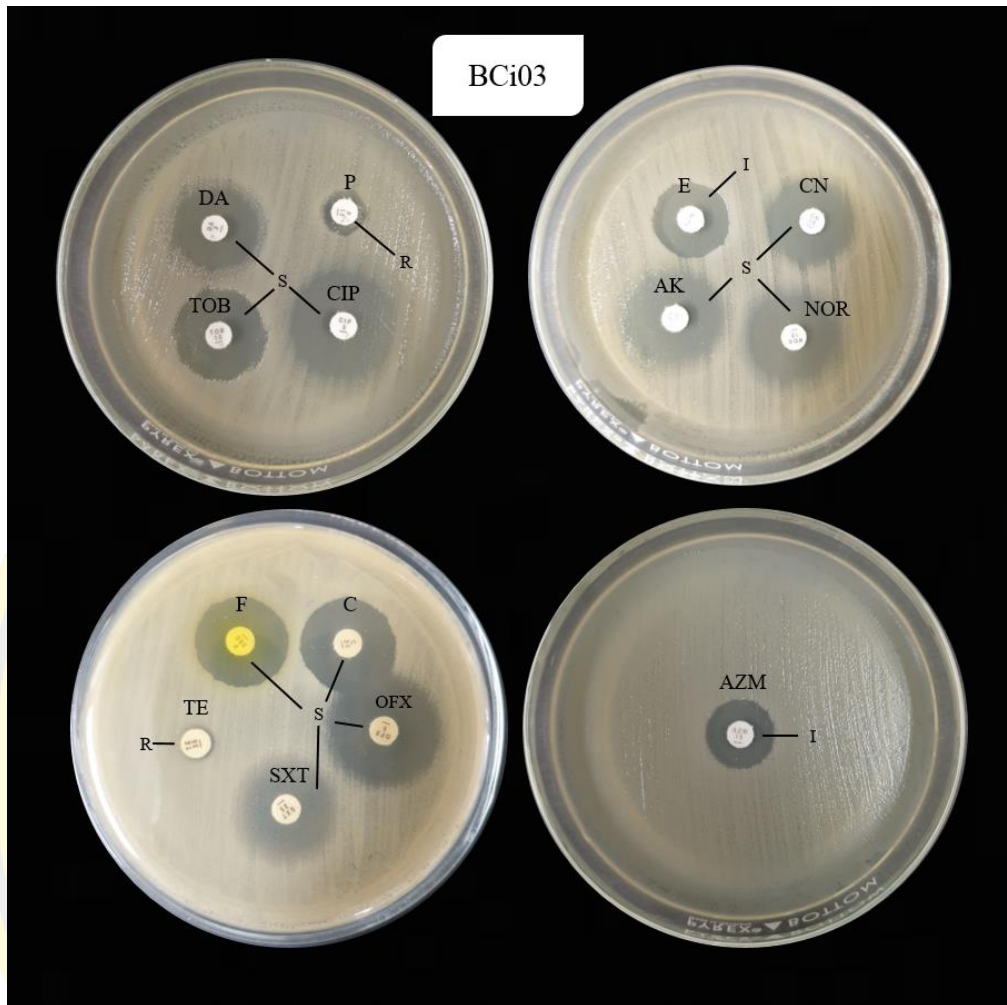
ภาพ 37 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi01) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คื้อต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Clindamycin (DA), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Erythromycin (E), Amikacin (AK), Norfloxacin (NOR), Gentamicin (CN), Nitrofurantoin (F), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Ofloxacin (OFX), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)



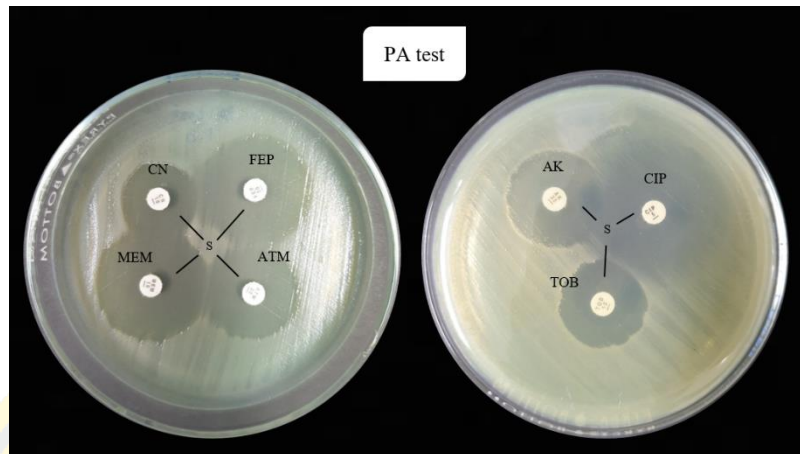
ภาพ 38 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi02) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวกานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คี้อต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Clindamycin (DA), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Erythromycin (E), Amikacin (AK), Norfloxacin (NOR), Gentamicin (CN), Nitrofurantoin (F), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Ofloxacin (OFX), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)

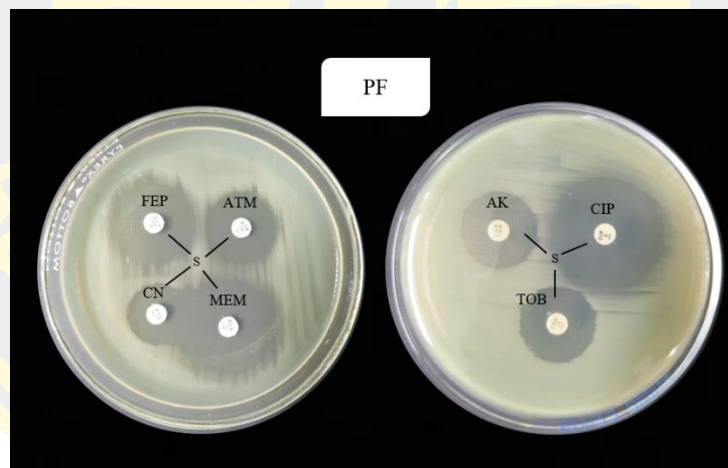


ภาพ 39 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *B. cereus* (BSi03) ด้วยวิธี disk diffusion

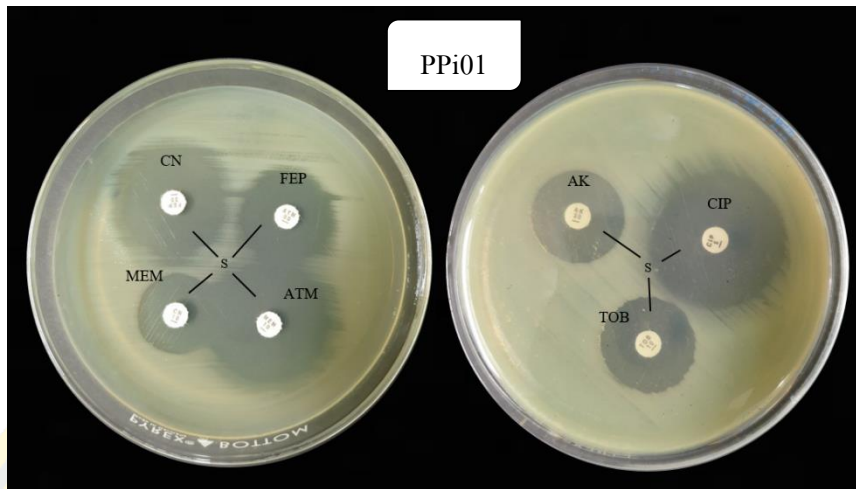
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คื้อต่อสารปฏิชีวนะ, Penicillin (P), Clindamycin (DA), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Erythromycin (E), Amikacin (AK), Norfloxacin (NOR), Gentamicin (CN), Nitrofurantoin (F), Tetracycline (TE), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT), Ofloxacin (OFX), Chloramphenicol (C) และ Azithromycin (AZM)



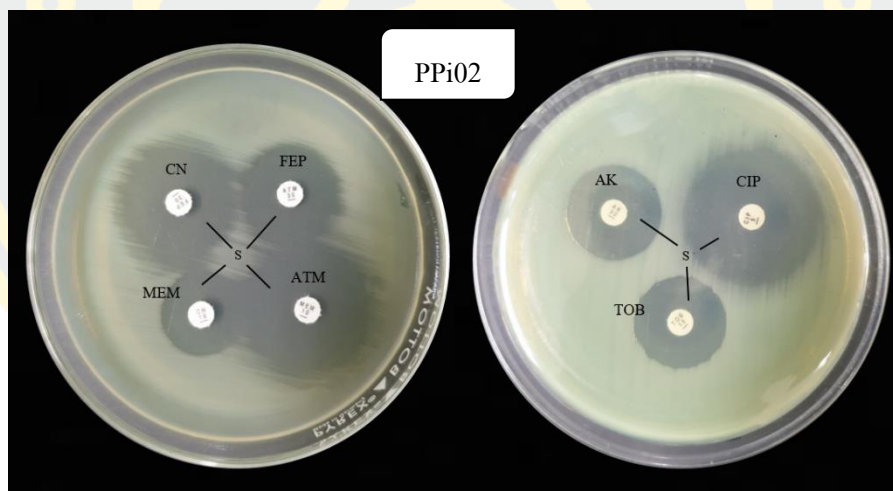
ภาพ 40 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* (PA test) ด้วยวิธี disk diffusion
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM),
Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)



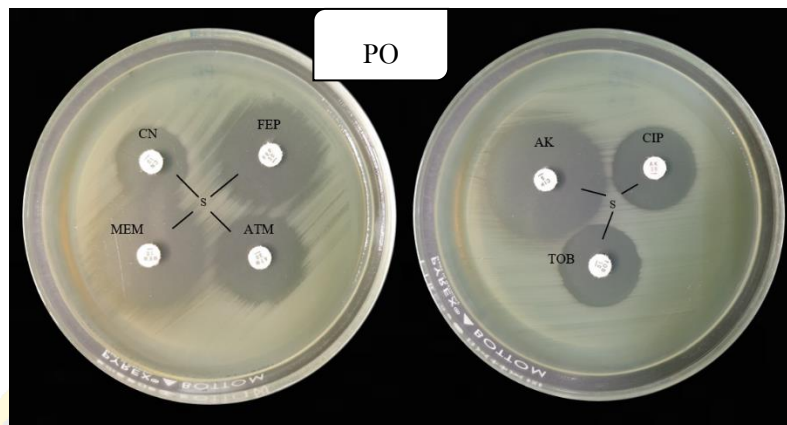
ภาพ 41 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. fluorescens* (PF) ด้วยวิธี disk diffusion
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM),
Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)



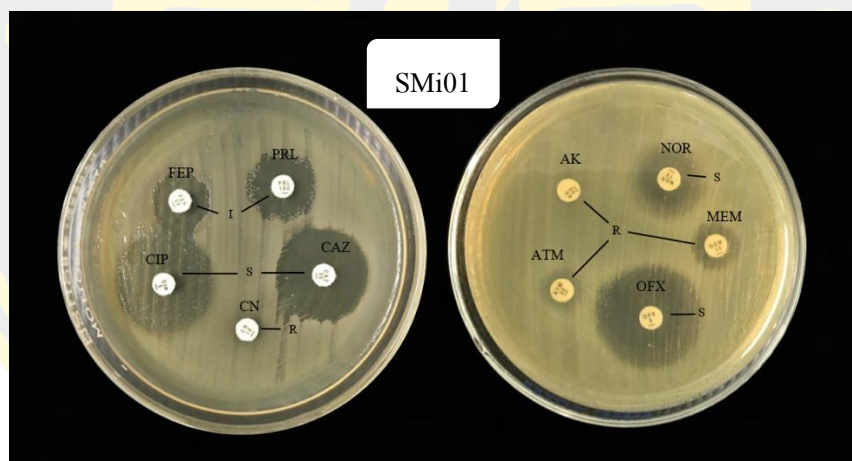
ภาพ 42 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. putida* (PPi01) ด้วยวิธี disk diffusion
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM),
Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)



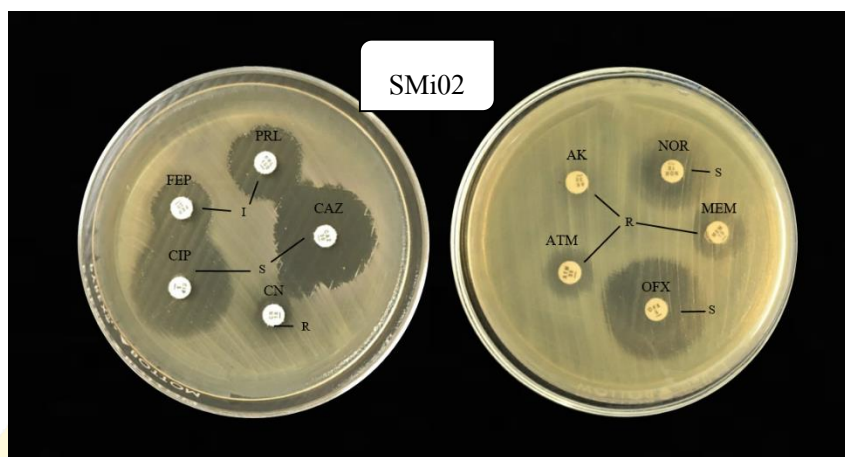
ภาพ 43 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. putida* (PPi02) ด้วยวิธี disk diffusion
S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM),
Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)



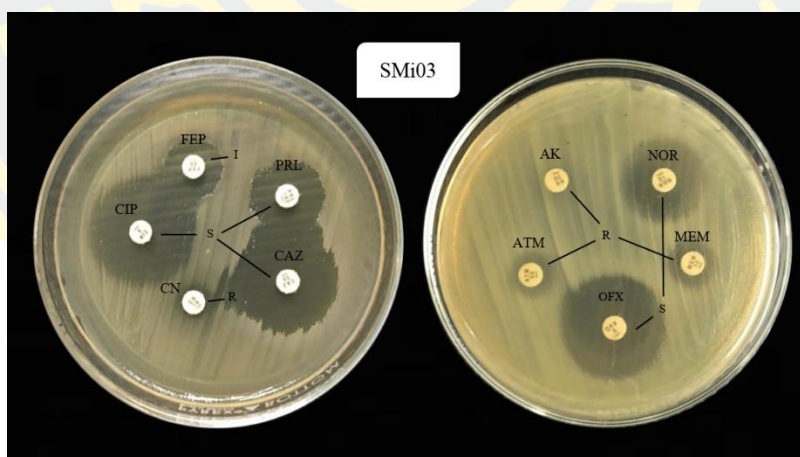
ภาพ 44 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *P. oryzae* (PO) ด้วยวิธี disk diffusion S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, Cefepime (FEP), Aztreonam (ATM), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB) และ Ciprofloxacin (CIP)



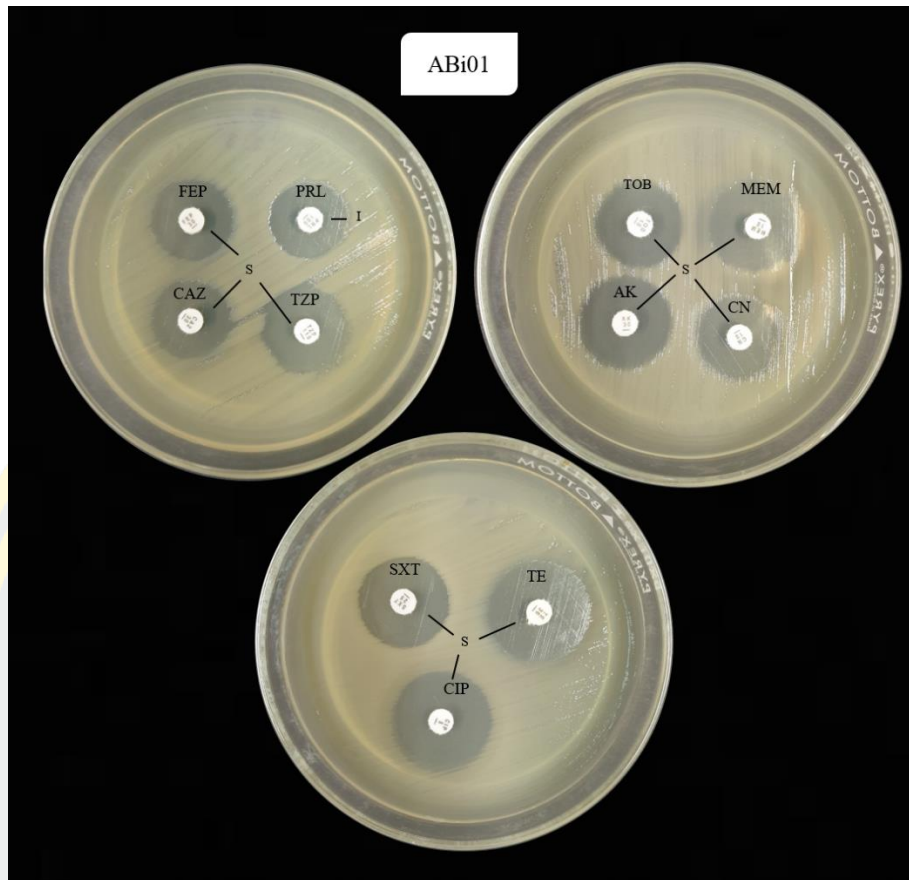
ภาพ 45 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi01) ด้วยวิธี disk diffusion S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ ตื้อต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Gentamicin (CN), Ciprofloxacin (CIP), Cefepime (FEP), Amikacin (AK), Aztreonam (ATM), Ofloxacin (OFX), Meropenem (MEM) และ Norfloxacin (NOR)



ภาพ 46 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi02) ด้วยวิธี disk diffusion S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คี้อต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Gentamicin (CN), Ciprofloxacin (CIP), Cefepime (FEP), Amikacin (AK), Aztreonam (ATM), Ofloxacin (OFX), Meropenem (MEM) และ Norfloxacin (NOR)

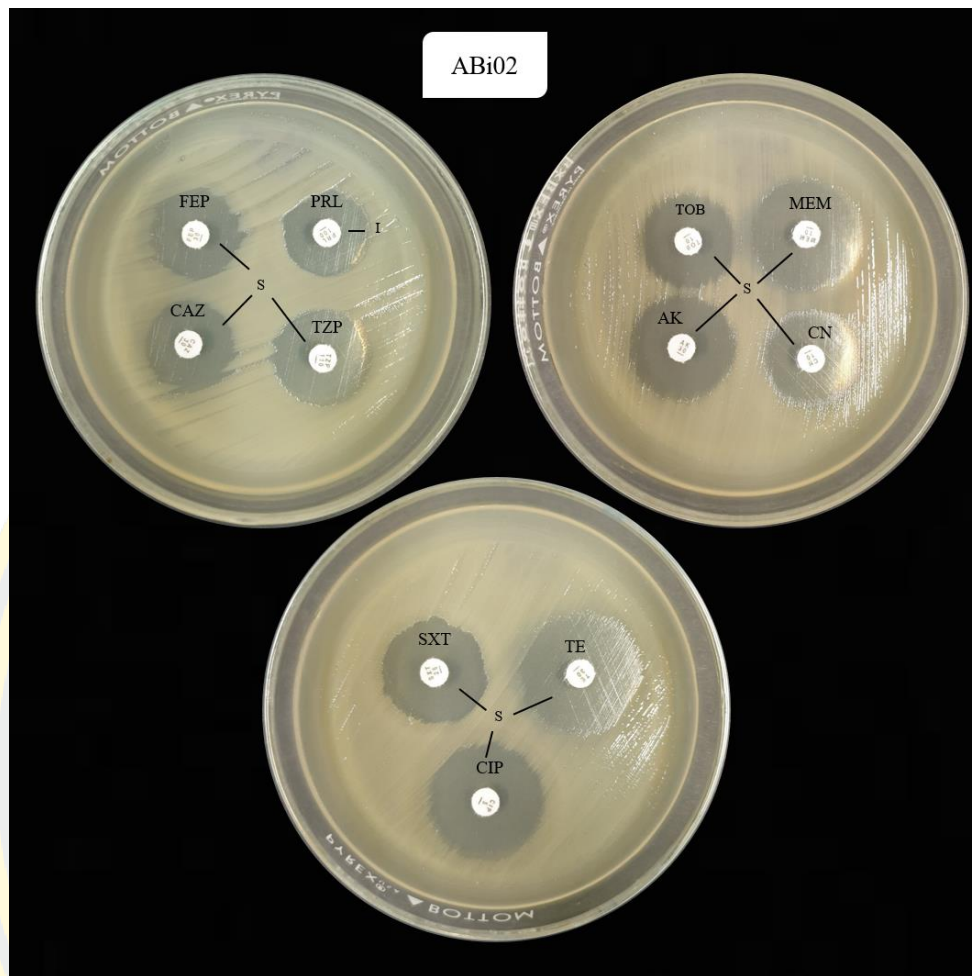


ภาพ 47 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *S. maltophilia* (SMi03) ด้วยวิธี disk diffusion S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, R คือ คี้อต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Gentamicin (CN), Ciprofloxacin (CIP), Cefepime (FEP), Amikacin (AK), Aztreonam (ATM), Ofloxacin (OFX), Meropenem (MEM) และ Norfloxacin (NOR)



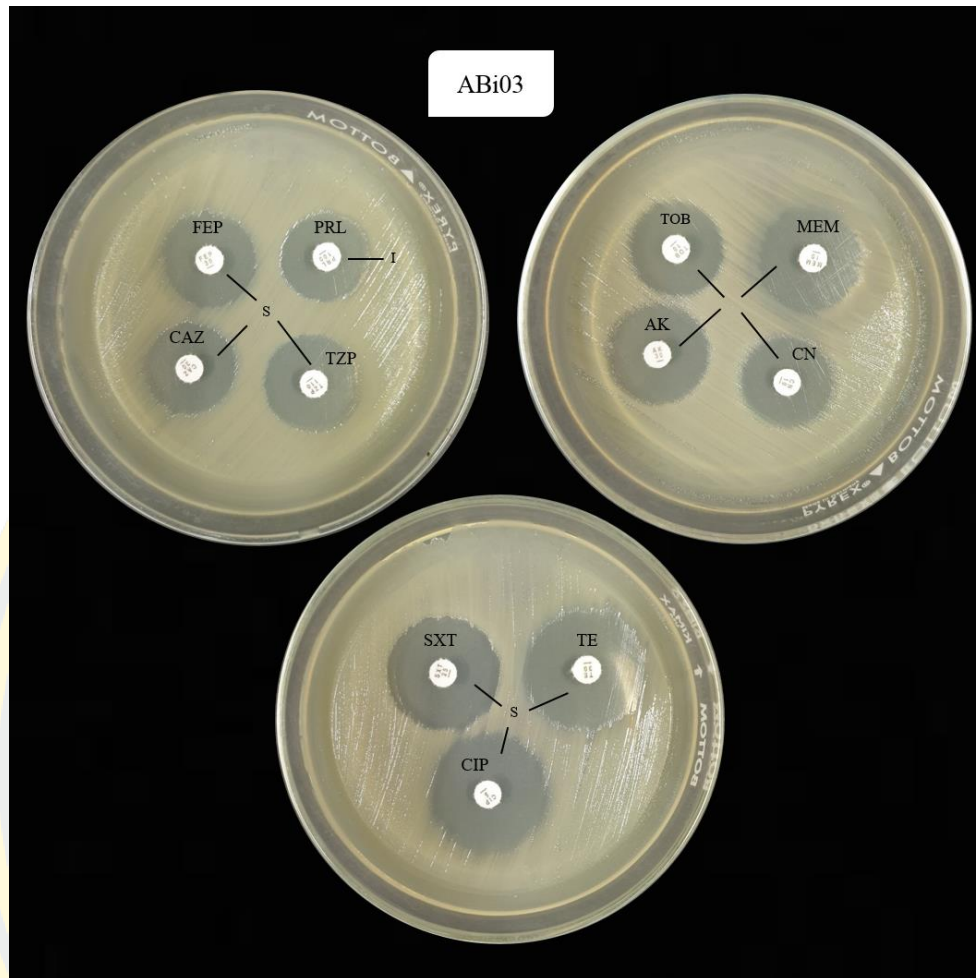
ภาพ 48 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi01) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CFP), Piperacillin-tazobactam (TZP), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Tetracycline (TE) และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)



ภาพ 49 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi02) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไวต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไวปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CFP), Piperacillin-tazobactam (TZP), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Tetracycline (TE) และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)



ภาพ 50 ผลความไวต่อสารปฏิชีวนะของ *A. baumannii* (ABi03) ด้วยวิธี disk diffusion

S คือ ไรต่อสารปฏิชีวนะ, I คือ ไรปานกลางต่อสารปฏิชีวนะ, Piperacillin (PRL), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (CFP), Piperacillin-tazobactam (TZP), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Tetracycline (TE) และ Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)