

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. สภาพของสิ่งแวดล้อม

ในขณะที่เก็บตัวอย่างปลาที่เป็นโรค วัดอุณหภูมิของน้ำได้ 29.5°C
pH 7.2 และปริมาณออกซิเจนที่อยู่น้ำมีค่า 3 ppm.

2. ผลการแยกแบคทีเรียที่ได้จากปลาชนิดต่าง ๆ ที่เป็นโรค

จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียจากปลาที่เป็นโรคได้ดังนี้คือ
 A_1 , A_2 , A_3 , A_4 และ A_5 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการแยกแบคทีเรียที่ได้จากปลาน้ำจืดที่เป็นโรค

เชื้อ	ตัวอย่างที่นำมาแยก	แหล่งตัวอย่างที่เก็บ
A_1	ปลาช่อน	ตำบลประจักษ์
A_2	ปลาไหล	ตำบลประจักษ์
A_3	ปลาสร้อย	ตำบลประจักษ์
A_4	ปลาหมอ	ตำบลประจักษ์
A_5	ปลาตะเพียน	ตำบลประจักษ์

3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

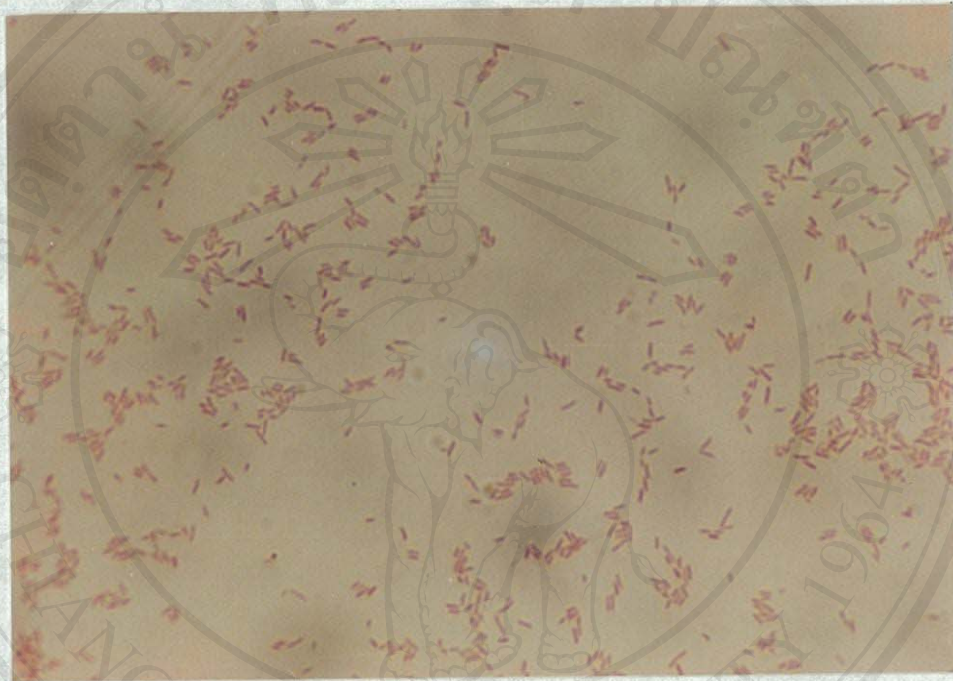
3.1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

เชื้อ A_1 , A_2 , A_3 , A_4 และ A_5 เมื่อนำมาศึกษาทางค่านสัณฐานวิทยา ลักษณะพื้นฐานที่ตรวจสอบคือ การติดสีกรัม, รูปร่าง, ขนาด, แฟลเจลลา,

ขนาดของโคโลนี และลักษณะของโคโลนี ผลการตรวจสอบพบว่า เป็นกลม, มีรูปร่างเป็นแท่ง มีแฟลเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ ขนาดของเซลล์เมื่อวัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Micrometer ในขณะที่ย้อมสีแบบกรัม พบว่ามีขนาด 0.5×2 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4) ขนาดของโคโลนี 1.5-2 มม. ลักษณะโคโลนีแบนและนูน ขอบเรียบ โปร่งแสง ดังแสดงในตารางที่ 5

4. ผลการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรียที่แยกได้

นำผลจากการศึกษาทางค่าน้ำตาลวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ของแบคทีเรียที่แยกได้ไปเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันโดยอาศัย จาก Buchanan และ Gibbons (1974), Cowan (1970), Skerman (1967), Gibbs และ Skinner (1966) ผลการเปรียบเทียบพบว่าเชื้อ A₁, A₂, A₃, A₄ และ A₅ คือ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งมีสายพันธุ์ต่างกันโดยใช้น้ำตาลซูโครส MR-VP และ O/F เป็นตัวแยก ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 สายพันธุ์ โดยเชื้อ A₂ และ A₃ เป็นสายพันธุ์เดียวกัน ส่วนเชื้อ A₁, A₄ และ A₅ เป็นคนละสายพันธุ์



ภาพที่ 4 แสดงเซลล์ของ A. hydrophila ซึ่งมีรูปร่างแบบแท่ง กรัมนลบ ขนาด
0.5 x 2 ไมโครเมตร ขนาดขยายของภาพ 1000 เท่า

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

Characters	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
Gram	-	-	-	-	-
Cell morphology	rod	rod	rod	rod	rod
Polar flagellum	+	+	+	+	+
Size of cell	0.5x2 um	0.5x2 um	0.5x2 um	0.5x2 um	0.5x2 um
Size of colony	1.5-2 mm	1.5-2 mm	1.5-2 mm	1.5-2 mm	1.5-2 mm
Colony morphology					
Flat and raised	+	+	+	+	+
Smooth	+	+	+	+	+
translucent	+	+	+	+	+
Hemolysis complete	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	+	+
O/F	F/gas	F/gas	F/gas	F	F/gas

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Characters	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
Motility	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
Decarboxylase arginine	+	+	+	+	+
Growth without NaCl	+	+	+	+	+
Growth 2 % NaCl	+	+	+	+	+
Growth 4 % NaCl	+	+	+	+	+
Growth 6 % NaCl	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	+
VP	-	-	-	-	+
Acid from					
glucose	+	+	+	+	+
lactose	-	-	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Characters	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
manitol	+	+	+	+	+
sucrose	- (d)	+	+	+	+
arabinose	- (d)	- (d)	- (d)	- (d)	- (d)
maltose	+	+	+	+	+
A.H. medium					
top	K	K	K	K	K
bott	A	A	A	A	A
motility	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
หมายเหตุ	d = different strains give different reactions				
	+ = Positive				
	- = Negative				
	F = Fermentation				
	A = acid reaction (ที่หลอดเป็นสีแดง)				
	K = alkaline reaction (ที่ผิวหน้าของอาหารเป็นสีม่วง)				

5. ผลการพิสูจน์สาเหตุการทำให้เกิดโรคโดยอาศัย Koch's postulate

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากปลาแต่ละชนิดฉีดเข้าไปในตัวปลาชนิดเดิม ผลการทดลองในปลาแต่ละชนิดได้ผลดังนี้

ปลาช่อน

หลังจากที่ปลาช่อนได้รับการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* เข้าไปสู่ตัว แล้วสังเกตผลภายใน 1 สัปดาห์ พบว่าเมื่อฉีดเข้าไปตอนแรก เกล็ดปลาจะฟู ไม่แนบติดกับผิวหนัง มีอาการบวมแดงบริเวณที่ฉีดอย่างเห็นได้ชัด บางตัวเกล็ดหลุด บางครั้งมีเมือกออกมา ในวันที่ 2 ของการทดลอง เกล็ดปลาจะหลุดเป็นบริเวณกว้างขึ้น เนื้อเยื่อเป็นสีขาวมีเมือกออกมา เกล็ดที่อยู่รอบ ๆ แผลเป็นสีแดงเข้ม บางตัวมีอาการบวมแดงที่แผล ปลายังสามารถว่ายน้ำได้ และในเวลาต่อมาบริเวณที่เป็นบาดแผล เนื้อเยื่อจะหลุดออกทำให้เป็นหลุมลึก (ภาพที่ 5) รอบเกล็ดจะชำรุด และในที่สุดก็จะตาย ตรงข้ามกับปลากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จะมีลักษณะแข็งแรงไม่มีบาดแผลในช่วงการทดลอง

ปลาไหล

ปลาไหลกลุ่มทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *A. hydrophila* อาการที่แสดงออกมาให้เห็นในช่วงแรกคือ เคลื่อนที่ช้าลง ส่วนมากจะหยุดนิ่ง และโผล่ขึ้นสู่น้ำบ่อยขึ้น ผิวหนังยังไม่แสดงอาการใด ๆ เกิดขึ้น ในวันที่ 2 ของการทดลอง ปลาไหลที่ได้รับเชื้อจะหยุดนิ่งมากขึ้น ว่ายน้ำไม่มีทิศทาง การทรงตัวไม่ดี บริเวณที่เป็นทวารหนักจะมีสีแดงเกิดขึ้นแต่ไม่ชัดเจน ในวันที่ 3 ของการทดลอง ปลาไหลว่ายน้ำอย่างไม่มีทิศทาง และขณะที่ว่ายอยู่จะหงายท้องจับได้ง่าย โผล่ขึ้นสู่น้ำตลอดเวลาและหยุดนิ่ง พบว่ามีฟองก๊าซจากการหายใจเกิดขึ้นเรื่อย ๆ ในวันที่ 4 ของการ

ทดลอง พบว่าที่ผิวหนังของปลาไหลจะมีเลือดคั่งเป็นหย่อม และบริเวณที่เป็นทวารหนักจะมีสีแดงเข้มในที่สุดก็ตาย ตรงข้ามกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจะแข็งแรง และไม่เกิดอาการดังกล่าวข้างต้น (ภาพที่ 6)



ก



ข

ภาพที่ 5 ภาพ ก : ปลาซ่อนเป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อจะไม่เกิดอาการของโรค

ข : ปลาซ่อนเป็นกลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* จะมีบาดแผลเกิดขึ้นตามลำตัว หลังจากได้รับเชื้อภายในเวลา 4 วัน



ก



ข

ภาพที่ 6 ภาพ ก : ปลาไหลเป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำกลั่นที่ขาเชื่อจะไม่เกิดอาการของโรค

ข : ปลาไหลเป็นกลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* จะเกิดเลือดคั่งเป็นหย่อมตามผิวหนัง และที่บริเวณทวารหนัก หลังจากได้รับเชื้อภายใน 3-5 วัน

ปลาสลิก

ในการทดลองนี้ใช้ปลานิลแทนปลาสลิก ผลการทดลองพบว่าหลังจากฉีดเชื้อ A. hydrophila ให้กับปลานิลอาการที่แสดงออกให้เห็นคือ เกล็ดหลุดมีเลือดคั่งบริเวณบาดแผล การว่ายน้ำจะน้อยลงไม่ค่อยเคลื่อนที่ จะตายภายใน 1 วัน (ภาพที่ 7) ตรงข้ามกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจะแข็งแรงและไม่แสดงอาการของโรค

ปลาหมอ

หลังจากที่ปลาหมอกุ่มทดลองได้รับเชื้อ A. hydrophila เข้าไปแล้ว จะแสดงอาการของโรคคือ ปลาไม่ค่อยเคลื่อนที่ บางครั้งจะโผล่ขึ้นมาหายใจบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไป จะมีลักษณะบวม เกล็ดฟู เป็นสีแดงขาว ในวันที่ 2 ของการทดลอง บริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไปจะมีเมือกสีขาวขุ่นหลุดออกมาเกล็ดจะหลุด ส่วนเกล็ดที่อยู่รอบ ๆ จะฟูขึ้นมา และเกล็ดของปลาจะมีสีแดง ในวันที่ 3 ของการทดลอง ปลาที่ได้รับเชื้อจะอยู่ตามผิวน้ำ โดยส่วนใหญ่จะหยุดนิ่งอยู่กับที่ และบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไปจะมีลักษณะคล้ายเนื้อเปื่อยหลุดออกไปและในที่สุดก็จะตาย ตรงข้ามกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจะแข็งแรง และไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 8)

ปลาทะเพียน

หลังจากปลาทะเพียนกลุ่มทดลองได้รับเชื้อ A. hydrophila แล้วอาการที่แสดงออกมาในระยะเริ่มต้นคือ เกล็ดหลุด และฟูเล็กน้อย บริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไปจะมีสีแดงขาว ตามเกล็ดจะมีเลือดคั่งเห็นเป็นสีแดงซีด มีการตาย 1 ใน 5 ของปลาที่ทดลอง ในวันที่ 2 ของการทดลอง บาดแผลจะเห็นชัดเจนมาก เนื้อบวมขึ้นมามีเลือดคั่งรอบบริเวณบาดแผล ที่บริเวณทวารหนักจะมีเลือดคั่งเป็นสีแดง เมื่อตายแล้วจะมีกลิ่นเหม็นมาก (ภาพที่ 9)

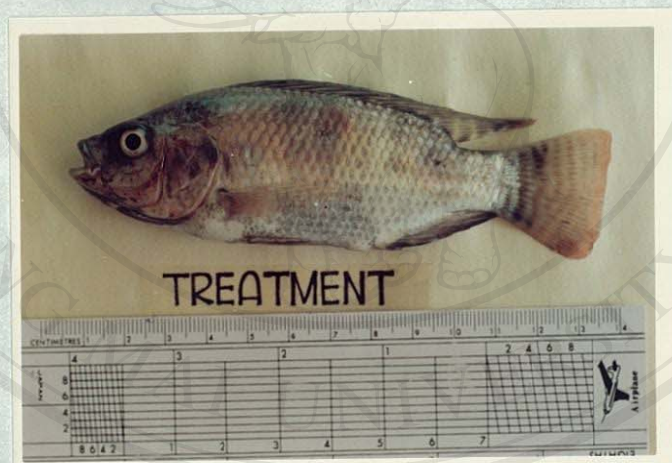
จากปลาที่ปรากฏอาการเป็นโรคแต่ละชนิด เมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ซึ่งเคยพบว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกับที่แยกได้จากปลาเป็นโรคในธรรมชาติ

6. ผลของ pH ต่อการเจริญ

ผลการทดสอบความทนทานของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในช่วง pH ต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรีย 5 isolates เจริญได้ในช่วง pH 4.0 ถึง 11.5 และจะหยุดเจริญเติบโตในช่วง pH 3.5 และ 12.0 ในอาหาร Nutrient broth ดังแสดงในตารางที่ 6



ก



ข

ภาพที่ 7 ภาพ ก : ปลานิลเป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อจะไม่เกิดอาการของโรค

ข : ปลานิลเป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ A. hydrophila เกล็ด จะหลุดมีเลือดคั่งที่บริเวณบาดแผลหลังจากได้รับเชื้อภายใน

1. วัน



ก



ข

ภาพที่ 8 ภาพ ก : ปลาหมอเป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อจะไม่เกิดอาการของโรค

ข : ปลาหมอเป็นกลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* เกิดแผลพุพองและฟูขึ้นมา เนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังจะหลุดออกหลังจากได้รับเชื้อ 3 วัน



ก



ข

ภาพที่ 9 ภาพ ก : ปลาทะเียนเป็นกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำกลั่นที่ผ่านเชื้อจะไม่เกิดอาการของโรค

ข : ปลาทะเียนกลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อ *A. hydrophila* เกิดแผลจุดและพุพองเล็กน้อยมีเลือดคั่งบริเวณบาดแผลและทวารหนักหลังจากได้รับเชื้อภายในเวลา 1-2 วัน

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบความทนทานของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในระดับ pH
ต่าง ๆ ภายใน 24 ชม.

pH	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
3.5	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+
4.5	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
11.5	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + = เจริญได้ดี

- = ไม่เจริญเลย

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ

ผลการทดสอบความทนทานของเชื้อแบคทีเรียในช่วงอุณหภูมิ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 isolates ยังสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 55-59°ซ ในเวลา 2, 4, 6 และ 8 นาที่ และหยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 60°ซ โดยใช้เวลาในการให้ความร้อนตั้งแต่ 2 นาที่ ขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 7

8. ผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญ

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาที่เป็นโรคมาทดสอบกับสารปฏิชีวนะ ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 ดังนี้

A. hydrophila ที่แยกได้จากปลาช่อนเมื่อนำมาทดสอบกับสารปฏิชีวนะ 16 ชนิด พบว่าเชื้อชนิดนี้จะไวต่อยาพวก streptomycin, tetracycline, chloramphenicol และ nalidixic acid จะคือยาพวก ampicillin, erythromycin, bacitracin, gentamicin, clindamycin, colistin, lincomycin, novobiocin และ penicillin-G และกึ่งคือ กึ่งไวต่อยาพวก polymyxin-B, vancomycin และ kanamycin

A. hydrophila ที่แยกได้จากปลาไหล เมื่อนำมาทดสอบกับสารปฏิชีวนะ 16 ชนิด พบว่าเชื้อชนิดนี้จะไวต่อยาพวก erythromycin, tetracycline, colistin, gentamicin, vancomycin, streptomycin, nalidixic acid และ chloramphenicol จะคือยาพวก ampicillin, bacitracin, clindamycin, lincomycin, novobiocin, polymyxin-B และ polymyxin-G และกึ่งคือ กึ่งไวต่อยาพวก kanamycin

A. hydrophila ที่แยกได้จากปลาสด เมื่อนำมาทดสอบกับสาร

ปฏิชีวนะ 16 ชนิด พบว่าเชื้อชนิดนี้จะไวต่อยาพวก erythromycin, tetracycline, vancomycin, streptomycin, chloramphenicol, nalidixic acid และ kanamycin จะคือยาพวก ampicillin, bacitracin, clindamycin, colistin, lincomycin, novobiocin, penicillin-G และ polymyxin-B และถึงคือ ถึงไวต่อยาพวก gentamicin

A. hydrophila ที่แยกได้จากปลาหมอ เมื่อนำมาทดสอบกับสาร

ปฏิชีวนะ 16 ชนิด พบว่าเชื้อชนิดนี้จะไวต่อยาพวก erythromycin, kanamycin, vancomycin, streptomycin, nalidixic acid และ tetracycline จะคือยาพวก ampicillin, bacitracin, clindamycin, colistin, lincomycin, novobiocin, penicillin-G และ gentamicin และถึงคือ ถึงไวต่อยาพวก polymyxin-B

A. hydrophila ที่แยกได้จากปลาตะเพียน เมื่อนำมาทดสอบกับ

สารปฏิชีวนะ 16 ชนิด พบว่าเชื้อชนิดนี้จะไวต่อยาพวก vancomycin, tetracycline, chloramphenicol และ nalidixic acid จะคือยาพวก ampicillin, bacitracin, erythromycin, gentamicin, polymyxin-B, clindamycin, colistin, streptomycin และ penicillin-G และถึงคือ ถึงไวต่อยาพวก kanamycin และ novobiocin

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบความทนทานของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในระดับอนุหุณี และเวลาต่าง ๆ สังเกตผลใน 24 ชม.

ชนิดของเชื้อ	เวลา (นาที่)	จำนวนโคโลนีที่อนุหุณีต่าง ๆ				
		55°C	56°C	57°C	58°C	59°C 60°C
<u>A. hydrophila</u> สายพันธุ์ที่แยก ได้จากปลาช่อน	2	TM	TM	TM	TM	365
	4	TM	TM	TM	TM	240
	6	TM	TM	TM	TM	222
	8	TM	TM	TM	TM	180
<u>A. hydrophila</u> สายพันธุ์ที่แยก ได้จากปลาไหล	2	TM	TM	TM	TM	TM
	4	TM	TM	TM	TM	200
	6	TM	TM	TM	TM	160
	8	TM	TM	TM	TM	109
<u>A. hydrophila</u> สายพันธุ์ที่แยก ได้จากปลาสลิด	2	TM	TM	TM	TM	TM
	4	TM	TM	TM	TM	256
	6	TM	TM	TM	TM	230
	8	TM	TM	TM	TM	165

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ชนิดของเชื้อ	เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีที่อุณหภูมิต่าง ๆ				
		55°C	56°C	57°C	58°C	59°C 60°C
<u>A. hydrophila</u> สายพันธุ์ที่แยก ได้จากปลาหมอ	2	TM	TM	TM	TM	315
	4	TM	TM	TM	TM	248
	6	TM	TM	TM	TM	204
	8	TM	TM	TM	TM	180
<u>A. hydrophila</u> สายพันธุ์ที่แยก ได้จากปลาตะเพียน	2	TM	TM	TM	TM	298
	4	TM	TM	TM	TM	269
	6	TM	TM	TM	TM	218
	8	TM	TM	TM	TM	190

หมายเหตุ TM = Too much

- = ไม่มีการเจริญ

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของ clear zone ที่ทดสอบกับสารปฏิชีวนะ 16 ชนิด โดยใช้สื่อแบบซีรี่ส์แยกโคจากปลาชนิดต่าง ๆ

สารปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น ต่อแผ่น	ค่าเฉลี่ยของ clear zone (มม.) จากซีรี่ส์แยกโค				
		A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
Ampicillin	10 µg	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Erythromycin	15 µg	11.5	18.7	19.3	18.0	11.7
Bacitracin	10 units	6.3	7.0	7.4	7.8	6.3
Gentamicin	10 µg	10.0	28.7	13.0	12.0	9.0
Polymyxin-B	300 units	9.0	8.0	8.0	9.5	8.0
Clindamycin	2 µg	6.0	6.0	7.7	6.0	6.2
Vancomycin	30 µg	10.0	13.0	13.0	14.3	18.3
Streptomycin	10 µg	19.3	16.3	17.0	19.5	11.0
Colistin	10 µg	7.0	7.3	7.0	7.8	6.5
Chloramphenicol	30 µg	33.5	31.2	31.3	32.5	32.0
Lincomycin	2 µg	6.0	7.0	6.0	6.0	6.0
Novobiocin	30 µg	10.8	14.3	14.7	13.2	18.7
Penicillin-G	10 units	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Nalidixic acid	30 µg	30.0	22.0	21.0	29.8	29.3
Kanamycin	30 µg	15.0	16.0	18.0	18.0	14.3
Tetracycline	30 µg	22.5	21.3	22.0	22.8	23.5