รายงานชุดโครงการวิจัย

อุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) และการพัฒนานวัตกรรมเพื่อการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย

Seasonal Occurrence of Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) and Innovation Development as Control Tool against Tetracycline-Resistant *Aeromonas* spp. in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Southern Thailand

กิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์ Kittichon U-taynapun
นิอร จิรพงศธรกุล Nion Chirapongsatonkul
ธรรมนูญ ง่านวิสุทธิพันธ์ Thammanoon Nganwisutthiphun
มณี ศรีชะนันท์ Manee Srichanun

คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2561–2562

รายงานชุดโครงการวิจัย

อุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) และการพัฒนานวัตกรรมเพื่อการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย

Seasonal Occurrence of Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) and Innovation Development as Control Tool against Tetracycline-Resistant *Aeromonas* spp. in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Southern Thailand

กิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์ Kittichon U-taynapun
นิอร จิรพงศธรกุล Nion Chirapongsatonkul
ธรรมนูญ ง่านวิสุทธิพันธ์ Thammanoon Nganwisutthiphun
มณี ศรีชะนันท์ Manee Srichanun

คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2561–2562

กิตติกรรมประกาศ

ชุดโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2561–2562 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช และสำเร็จโดยได้รับการสนับสนุน ความทุ่มเท และความตั้งใจของคณะทำงานอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณนายศุภณัฐ วัฒิธรรม นางสาวณัฏนิชา เมืองกาญจน์ นางสาวชัชชษา เทพอุบล นางสาวฟากีตะห์ บุปผาดง และนางสาวอรอนงค์ บุญเสริม ผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาปริญญาโท สาขาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและจัดการทรัพยากรประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช เกษตรกร และกรมประมง ในความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและสนับสนุนงานวิจัย

ชุดโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการย่อยจำนวน 4 โครงการ ได้แก่ โครงการที่ 1 เรื่อง อุบัติการณ์โรคเชิงฤดูกาล การต่อต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย โครงการที่ 2 เรื่อง ผลจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศอย่างฉับพลันต่อระบบภูมิคุ้มกันและการ ยอมรับเชื้อ *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โครงการที่ 3 เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรในรูปแบบอนุภาคนาโน เพื่อควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และโครงการที่ 4 เรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำหมัก Biofloc ต่อระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) และการแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas veronii* ที่แยกได้จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งมุ่งเน้นศึกษาอุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) ซึ่งเป็นโรคแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด โดยเฉพาะปลานิล โดยศึกษาในพื้นที่การเพาะเลี้ยงปลานิลในภาคใต้ของไทย รวมถึงศึกษารูปแบบปรากฏ (phenotype) และจีโนไทป์ (genotype) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในเชื้อแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* ที่ก่อให้เกิดโรค MAS ที่พบในการเลี้ยงปลานิลพื้นที่ภาคใต้ และมุ่งเน้นพัฒนาสมุนไพร และสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมแบคทีเรียสาเหตุของโรค MAS ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อลดการสูญเสียระหว่างการเพาะเลี้ยงปลานิล รวมถึงส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นไปในรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่ปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค สอดคล้องกับนโยบายการผลิตอาหารปลอดภัย

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและประเทศต่อไป

คณะผู้วิจัย
สิงหาคม 2563

บทคัดย่อ

ชุดโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการย่อยทั้งหมด 4 โครงการ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาอุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicemia (MAS) ในปลานิลที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคใต้ของไทย และศึกษารูปแบบปรากฏและยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline รวมถึงยีนความรุนแรงในเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ก่อโรค MAS เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรค MAS ในปลานิลทั้งในรูปแบบผลิตภัณฑ์สมุนไพรและผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำเลี้ยง Biofloc โดยผลการศึกษาเชิงสำรวจ พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วยที่แสดงอาการ MAS ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียชนิด *A. veronii* ซึ่งมีระดับการต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline แตกต่างกัน เชื้อที่ทดสอบส่วนใหญ่ต่อต้านยา Oxytetracycline และ Tetracycline (อย่างใดอย่างหนึ่ง) ในขณะที่เชื้อบางไอโซเลทแสดงการต่อต้านยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด อุณหภูมิน้ำในบ่อเลี้ยงปลานิลมีความแตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ ช่วงอุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิน้ำระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส) และช่วงอุณหภูมิผันแปร (อุณหภูมิน้ำระหว่าง 22-33.5 องศาเซลเซียส) ซึ่งพบในช่วงเปลี่ยนฤดูจากฤดูร้อนสู่ฤดูฝน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างฉับพลันส่งผลเล็กน้อยต่อการเจริญเติบโต แต่ลดการแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. อย่างชัดเจน รวมถึงส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล ทำให้ปลานิลที่เลี้ยงภายใต้ช่วงอุณหภูมิผันแปรอย่างฉับพลันมีความไวต่อการยอมรับเชื้อ *A. veronii* ได้สูงกว่าปลานิลที่เลี้ยงในช่วงอุณหภูมิปกติ นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ ฝาง กระเทียม และข่า ซึ่งเป็นสมุนไพรท้องถิ่น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ และเป็นสาเหตุของโรค MAS ได้ โดยสารสกัดที่ได้โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวสกัดมีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ได้ดีกว่าน้ำและน้ำมัน ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *A. veronii* แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ผู้วิจัยได้พัฒนาสารสกัดสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรผสมระหว่างสารสกัดเอทานอลของฝางและกระเทียมในรูป crude extracted bio-nanoparticle และทดลองผสมอาหารให้ปลานิลกิน พบว่า crude extracted bio-nanoparticle ที่เตรียมได้ช่วยทำให้ปลานิลมีความต้านทานต่อเชื้อ *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc ที่เป็นสารผสมระหว่างน้ำเลี้ยง Biofloc กับของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *A. veronii* ที่ใช้ทดสอบได้ โดยคาดว่าโปรตีนในน้ำเลี้ยง Biofloc สามารถควบคุมระบบควอรัมเซนซิงในการสื่อสารของแบคทีเรียก่อโรค *A. veronii* ยิ่งไปกว่านั้น ผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc ยังช่วยดึงดูดการกิน กระตุ้นภูมิคุ้มกันและความต้านทานต่อเชื้อ *A. veronii* ในปลานิล ผลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดในชุดโครงการนี้เป็นองค์ความรู้ที่ช่วยเพิ่มความเข้าใจโรค MAS รวมถึงช่วยเป็นแนวทางให้เกษตรกรเฝ้าระวัง และจัดการกับการเกิดโรค MAS ได้อย่างเหมาะสม หลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยใช้ทางเลือกที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติเพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียต่อต้านยาปฏิชีวนะ และยัง

เป็นวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เกษตรกรผู้เลี้ยง รวมถึงผู้บริโภค ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรค MAS ด้วยชีววิธี และส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: การต่อต้านยาปฏิชีวนะ, ควอรัมเซนซิง, น้ำเลี้ยงไบโอฟลอค, แบคทีเรีย *Aeromonas* spp., แบคทีเรีย *Aeromonas veronii*, ปลานิล, โรค Motile Aeromonas Septicemia (MAS), สมุนไพร, อุบัติการณ์เชิงฤดูกาล

Abstract

This research program consists of 4 research projects with an ultimate goal of studying the seasonal occurrence of Motile Aeromonas Septicemia (MAS) disease in Nile tilapia cultured in Southern Thailand. Antibiotic-resistant phenotype and genes involving in antibiotic resistance against Tetracycline group as well as virulence genes in MAS-causing *Aeromonas* spp. was focused. We also aimed to develop the products, herbal extracts and protein from biofloc fermentation medium that were able to control the MAS disease. Based on the survey, dominant species isolated from MAS-expressing Nile tilapia was *A. veronii*. The degrees of antibiotic Tetracycline resistance were varied among the obtained *Aeromonas* isolates. Most of them resisted against either Oxytetracycline or Tetracycline while some isolates expressed multi-antibiotic resistance. The data observed from the rearing tilapia pond suggested there were two different temperature ranges; normal range (24-30°C) and fluctuating temperature range (22-33.5°C) which could be found during season changes (summer to rainy season). An abrupt temperature change slightly affected the growth of *Aeromonas* spp., conversely, it could obviously reduce the expression of virulence genes of these pathogenic bacterial isolates as well as influenced the immune system of Nile tilapia. Consequently, the susceptibility to *A. veronii* was higher in tilapia fish reared under the abrupt temperature change than those cultured under normal temperature range. In addition, herbal extracts obtained from local herbal plants including sappan (*Caesalpinia sappan*), garlic (*Allium sativum*) and galangal (*Alpinia galanga*) were able to inhibit the growth of antibiotic resistant *A. veronii* which was a causing agent of MAS. Ethanolic herbal extracts exhibited stronger inhibitory effect than aqueous and oil-extracted substances. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were varied among the herbs and extraction solvents. A mixture of ethanolic extracts of sappan and garlic, in a ratio of 1:1, was further developed in a form of crude extracted bio-nanoparticle and tested for its efficiency in Nile tilapia through oral administration. The results suggested that the produced crude extracted bio-nanoparticle could enhance the disease resistance of tilapia against antibiotic *resistant A. veronii*. Moreover, the biofloc medium product (PBFCM) was produced by mixing biofloc fermentation medium with vinasse, residues from bioethanol production of which a major component is yeast. PBFCM was able to inhibit the growth of test *A. veronii*. Its ability was presumably due to the protein within the fermentation medium could control quorum sensing, a communication system between the pathogenic *A. veronii* cells. Furthermore,

PBFCM could increase diet attractability, stimulate the immunity and enhance disease resistance of Nile tilapia against *A. veronii*. The obtained results altogether from all research projects in this program are knowledge that increase understanding of MAS disease and provide the surveillance concern and practices to suitably manage this disease. Our results also provide the alternative biological substances to control the antibiotic resistant bacteria and avoid using antibiotic. These biological based procedures are environmentally friendly, safe for farmers and customers which enhance sustainability of aquaculture.

Keywords: Antibiotic resistance, Quorum sensing, Biofloc fermentation medium, *Aeromonas* spp., *Aeromonas veronii*, Nile tilapia (*Orechromis niloticus*), Motile Aeromonas Septicemia (MAS), Herbs, seasonal occurrence

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของชุดโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของชุดโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของชุดโครงการวิจัย	3
1.5 เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของชุดโครงการวิจัย	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	6
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	22
บทที่ 5 สรุปผลที่ได้ในชุดโครงการวิจัย	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	46

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 จำนวน ชนิด และการต้านทานยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วยแสดงอาการ MAS ในพื้นที่ภาคใต้	23
3.1 Inhibition zone ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ	32
3.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC)	33
4.1 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยง Biofloc	36

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *Aeromonas* spp. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	24
1.2 สัดส่วนการต้านทานยาปฏิชีวนะ 5 ชนิดของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วย	25
2.1 รูปแบบอุณหภูมิในรอบวันของบ่อเลี้ยงปลานิล	27
2.2 กราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่างกัน คือ อุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิผันแปรในช่วงร้อนและมีฝน	28
2.3 การแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่างกัน คือ อุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิผันแปรในช่วงร้อนและมีฝน	28
2.4 Humoral innate immune parameters ในปลานิลที่เวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน หลังจากเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน	30
2.5 อัตราการตายของปลานิลที่เลี้ยงภายใต้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิรูปแบบต่างกัน ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน แล้วกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. veronii*	31
3.1 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ หลังได้รับอาหารผสม crude extracted bio-nanoparticle	34
3.2 อัตราการตายของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม crude extracted bio-nanoparticle เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ผสมน้ำเลี้ยง Biofloc ที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น 50% แป้ง + 50% กากน้ำตาล ที่ผ่านการทำ lyophilize	37
4.2 การแสดงออกของยีน quorum sensing ของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโปรตีนจากน้ำเลี้ยง Biofloc ที่เลี้ยงเป็นเวลา 12 และ 15 วัน ที่ความเข้มข้น 5% เปรียบเทียบกับอาหาร TSB	38
4.3 การดึงดูดการกิน (attractability) ของปลานิลที่ทดสอบกับอาหารทดสอบต่าง ๆ ที่มีกากถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc (PBFCM) ความเข้มข้นต่าง ๆ	39
4.4 อัตราการตายของปลานิลที่กินอาหารผสมผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน แล้วฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. veronii*	40

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

จากจากการบริการวิชาการภายใต้โครงการพัฒนาอาชีพตามแนวพระราชดำริเศรษฐกิจพอเพียงในลุ่มน้ำ ปากพนัง ของสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยระหว่างปี 2557-2559 พบว่ามีเกษตรกรจำนวนมากในพื้นที่ได้ร้องขอความช่วยเหลือทางวิชาการ เนื่องจากประสบปัญหาการเกิดโรคระบาดในการเลี้ยงปลานิล ส่งผลให้ผลผลิตของเกษตรกรเสียหายร้อยละ 30-80 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงการเปลี่ยนฤดูจากฤดูร้อนเป็นฤดูฝน (ช่วงเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม) และเปลี่ยนจากฤดูฝนเป็นฤดูร้อน (ช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม) จะพบอัตราการตายของปลานิลสูง และเมื่อคณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างและศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในปลาป่วยมากกว่าร้อยละ 90 เกี่ยวข้องกับโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) ซึ่งเชื้อก่อโรคชนิดนี้จะประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในสกุล *Aeromonas* โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *A. veronii*, *A. hydrophila* และ *A. jandaei* เป็นต้น รวมถึงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ที่พบมีคุณสมบัติในการต่อต้านยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะยาในกลุ่ม Tetracycline ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะหลักที่กรมประมงประกาศให้เกษตรกรใช้ในการควบคุมโรคแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อเกิดการระบาดของโรคจะทำให้เกษตรกรไม่สามารถควบคุมการระบาดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ซึ่งในหลายกรณีทำให้เกษตรกรสูญเสียผลผลิตจนถึงขั้นขาดทุน จากปัญหานี้คณะผู้วิจัยได้ลงพื้นที่สำรวจการเกิดโรคเบื้องต้นในการเลี้ยงปลานิลเขตภาคใต้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่เป็นแหล่งเลี้ยงสำคัญ ได้แก่ พื้นที่เลี้ยงบริเวณแม่น้ำตาปี จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช พื้นที่รอบทะเลสาบสงขลาและพื้นที่ตำบลลำป่า อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง พบว่าโรค MAS เป็นโรคระบาดหลักและสร้างความเสียหายรุนแรงให้แก่เกษตรกรและปริมาณผลผลิตปลานิลในพื้นที่ภาคใต้

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเสนอชุดโครงการอุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) และการพัฒนานวัตกรรมเพื่อการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย เพื่อทำการศึกษาข้อมูลเชิงลึกของโรค MAS ทั้งในแง่ของอุบัติการณ์ของโรคเชิงฤดูกาล การต่อต้านยาปฏิชีวนะทั้งในแง่ของพื้นที่การระบาด ลักษณะปรากฏของการต้านทางยาปฏิชีวนะ รวมถึงความหลากหลายของยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ที่พบในพื้นที่ภาคใต้ ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการพัฒนาสารควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค MAS และเป็นข้อมูลฐานในการเปรียบเทียบการวิวัฒนาการของยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในอนาคต นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้เล็งเห็นความสำคัญของการพัฒนาสารชีวภาพเพื่อควบคุมและป้องกันเชื้อก่อโรค MAS กลุ่มต่อต้านยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เนื่องจากการได้รับข้อมูลของเกษตรกรที่ระบุว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จึงจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อก่อโรค และประเด็นนี้เป็นประเด็นสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรจำเป็นจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงปลานิล ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการในการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน 2 รูปแบบ ได้แก่ 1. การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรในรูปแบบอนุภาคนาโน โดยนำองค์

ความรู้ที่ได้ศึกษาวิจัยในอดีตของสารสมุนไพรในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง มาทำการวิเคราะห์และสังเคราะห์เพื่อสรุป กลุ่มสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะกลุ่มต่อต้านยาปฏิชีวนะและมีศักยภาพในการผลิตเชิงปริมาณ จากนั้นจะทำการศึกษาสัดส่วนการผสมสารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดต่อประสิทธิภาพ การทำลายเชื้อ *Aeromonas* spp. กลุ่มต้อนต้านยาปฏิชีวนะ และพัฒนารูปแบบการนำส่งผลิตภัณฑ์สารผสมสมุนไพรออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบนาโนพาติเคิล และศึกษาประสิทธิภาพการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. กลุ่มต้อนต้านยาปฏิชีวนะในปลานิล 2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำหมัก Biofloc ซึ่งมีผลต่อระบบ ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas veronii* ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยเทคโนโลยีไบโอฟลอค พบว่าแบคทีเรียในการผลิตไบโอฟลอคสามารถผลิต extracellur product ที่มีผลต่อการรบกวนการผลิตโปรตีนของยีน LuxI และ LuxR ซึ่งเป็นยีนสำคัญในระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* จึงทำให้แบคทีเรีย *Aeromonas* spp. มีความสามารถในการก่อโรคลดลง ซึ่งหากได้ผลการศึกษาจากโครงการย่อยทั้ง 3 โครงการคณะผู้วิจัยคาดว่าจะทำประโยชน์ให้แก่เกษตรกรได้อย่างกว้างขวางและลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคจากต่างประเทศรวมถึงพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตปลานิลในการเป็นอาหารปลอดภัยที่ปราศจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงและพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคในเกษตรอุตสาหกรรมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันในกลุ่มเกษตรอุตสาหกรรมของประเทศไทยในเวทีโลก

1.2 วัตถุประสงค์ของชุดโครงการวิจัย

1) เพื่อศึกษาอุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) ในการเลี้ยงปลานิลและผลกระทบทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงในพื้นที่สำคัญของภาคใต้

2) เพื่อศึกษารูปแบบปรากฏ (Phenotype) และคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของการต้านทานยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ยีนความรุนแรงในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค MAS ที่พบในการเลี้ยงปลานิลเขตภาคใต้

3) เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรผสมในรูปแบบนาโนพาติเคิลเพื่อความคุมโรค Motile MAS ในปลานิล

4) เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำเลี้ยง Biofloc ในการควบคุมระบบ Quorum sensing และความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas veronii* ในปลา

1.3 ขอบเขตของชุดโครงการวิจัย

ชุดโครงการวิจัยเรื่อง อุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) และการพัฒนานวัตกรรมเพื่อการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย ประกอบด้วยโครงการย่อย จำนวน 4 โครงการ ได้แก่

โครงการย่อยที่ 1 เรื่อง อุบัติการณ์โรคเชิงฤดูกาล การต่อต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย

โครงการย่อยที่ 2 เรื่อง ผลจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศอย่างฉับพลันต่อระบบภูมิคุ้มกันและการยอมรับเชื้อ *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

โครงการย่อยที่ 3 เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรในรูปแบบอนุภาคนาโน เพื่อควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

โครงการย่อยที่ 4 เรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำหมัก Biofloc ต่อระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) และการแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas veronii* ที่แยกได้จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

โครงการย่อยทั้ง 4 ดำเนินการเป็นอิสระต่อกันแต่ข้อมูล ผลงานวิจัย องค์ความรู้ที่ได้จากแต่ละโครงการสามารถนำมาบูรณาการกันเพื่อให้บรรลุเป้าประสงค์ในการควบคุมโรค MAS ในปลานิลได้ โดยเน้นการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่เป็นแบคทีเรียสาเหตุสำคัญของโรค MAS ซึ่งจะศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการเกิดโรคทั้งต่อตัวปลานิล และเชื้อก่อโรค รวมถึงเน้นวิธีการควบคุมโรค MAS โดยการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ได้แก่ สารสกัดทางสมุนไพร รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี เพื่อตอบสนองต่อการผลิตอาหารปลอดภัยและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของชุดโครงการวิจัย

โรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) เป็นโรคสำคัญและสร้างผลกระทบอย่างรุนแรงต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก และเป็นโรคที่สำคัญและพบระบาดในการเลี้ยงปลานิลเขตภาคใต้ของไทย จากการตรวจสอบเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า เชื้อ *Aeromonas* spp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค MAS ที่ระบาดในบริเวณภาคใต้ พบเป็นสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะหลักที่กรมประมงอนุญาตให้เกษตรกรใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้เกษตรกรไม่สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคและการระบาดได้อย่างเหมาะสม และทำให้เกษตรกรจำเป็นจะต้องใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ซึ่งอาจมีผลตกค้างของยาปฏิชีวนะในปลานิล ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงการวิจัย ซึ่งประกอบด้วยโครงการย่อยจำนวน 3 โครงการ โดยมีกรอบแนวคิดของชุดโครงการวิจัยที่จะศึกษาข้อมูลเชิงลึกของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่มีการระบาดในแหล่งเลี้ยงปลานิลที่สำคัญของภาคใต้ โดยทำการศึกษาทั้งในแง่ของพื้นที่การระบาด

และอุบัติการณ์เชิงฤดูกาล รวมถึงข้อมูลของยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการให้ความรู้แก่เกษตรกร นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังให้ความสำคัญต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะ ภายใต้แนวคิดของการประยุกต์ใช้สมุนไพรท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานและการทดลองการฆ่าเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นไว้เป็นจำนวนมาก โดยโครงการจะนำข้อมูลการศึกษาทั้งหมดมาสังเคราะห์และสรุปสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่โดดเด่น จากนั้นจะทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร(พัฒนาตำรับยา) ทั้งนี้เนื่องจากมีผลการวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นถึงศักยภาพการเสริมฤทธิ์ของสมุนไพรในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาเศรษฐกิจ (Harikishnan and Balasundaram, 2005; Mohamad and Abasali, 2010) และศึกษาศักยภาพการทำลายเชื้อ *Aermonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะและพัฒนารูปแบบการนำส่งสารผสมของสารสกัดสมุนไพรในรูปแบบนาโนพาติเคิล ซึ่งทางคณะผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถพัฒนาสารผสมสมุนไพรขึ้นเป็นตำรับยาเพื่อใช้ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค MAS ต่อต้านยาปฏิชีวนะและมีความสามารถในการผลิตเชิงการค้าเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะต่อไป นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึงกลไกการก่อโรคของเชื้อ *Aeromonas* spp. พบว่าการเพิ่มปริมาณของเชื้อและการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงจะเกี่ยวข้องกับระบบ ควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) หรือการสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรีย โดย *Aeromonas* sp. จะผลิตโปรตีน N-Acyl homoserine lactone (AHL) ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและผลิต virulence factors (Natrah et al., 2012) นอกจากนี้การตรวจเอกสารยังพบข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของ AHL ที่แบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ผลิต (Chu et al., 2010) รวมถึงแบคทีเรียหลายสกุลที่พบใน Biofloc ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงการศึกษาผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำหมัก Biofloc ต่อระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) และการแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *A. varonii* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค MAS ที่สำคัญและมีการแพร่ระบาดในพื้นที่การเลี้ยงของภาคใต้ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในการหมัก Floc และการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนในน้ำเลี้ยง Biofloc จะนำไปสู่องค์ความรู้ที่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีคุณสมบัติการยับยั้งหรือลดการทำงานของโปรตีน AHL ในระบบระบบควอรัมเซนซิงของเชื้อ *A. veronii* ต่อต้านยาปฏิชีวนะและคาดหวังว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จะมีส่วนช่วยเกษตรกรในการควบคุมโรค MAS และสนับสนุนให้เกษตรกรลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการผลิตปลานิล

1.5 เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของชุดโครงการวิจัย

ระดับยุทธศาสตร์ชาติ

1. การพัฒนากระบวนการผลิตสินค้าเกษตรที่มีคุณภาพ เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตสินค้าเกษตร ให้มีความเข้มแข็ง และมั่นคง

2. การเพิ่มประสิทธิภาพและศักยภาพการผลิตภาคเกษตร รวมถึงการเพิ่มขีดความสามารถทางการตลาดของสินค้าเกษตร

ระดับมหาวิทยาลัย

1. การวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบริหารจัดการด้านการเกษตร
2. การวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลผลิตทางด้านการเกษตร
3. การวิจัยเพื่อตอบสนองความต้องการของชุมชน
4. การวิจัยเพื่อช่วยให้เกษตรกรมีความรู้ความสามารถเพิ่มขึ้น
5. การวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและคุณภาพด้านการเกษตรให้กับเกษตรกร

ระดับจังหวัด

1. พัฒนาการผลิตภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม
2. พัฒนาการสัตว์น้ำเศรษฐกิจในจังหวัดและภาคใต้
3. เป็นการพัฒนาศักยภาพด้านการผลิตของกลุ่มเกษตรกร เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิต และการพัฒนาที่ยั่งยืน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาองค์ความรู้ใหม่ในการเข้าใจและจัดการโรค MAS จากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีการระบาดพื้นที่ภาคใต้ของไทย
2. ลดการสูญเสียและเพิ่มรายได้ในการเลี้ยงปลานิลให้แก่เกษตรกร
3. พัฒนาองค์ความรู้ใหม่และสามารถถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลและปลาน้ำจืดอื่น ๆ

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 โรค Motile Aeromonas Septicemia (MAS) ในปลานิล

นับแต่ทศวรรษที่ 1970 เป็นต้นมา การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงการค้าทั่วโลกมีการขยายตัวกว่า 9.0% ต่อปี ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของโลก โดยมีสัตว์น้ำที่สำคัญหลายชนิดทั้งในกลุ่มกุ้งทะเล ปลาทะเลและปลาน้ำจืด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทยมีปริมาณสัดส่วนการผลิตปลานิลสูงสุดในกลุ่มปลาน้ำจืด โดยมีปริมาณการผลิตในปี 2552 ที่ปริมาณ 221,042 ตัน อันดับที่สอง ได้แก่ ปลาดุก ซึ่งมีปริมาณการผลิต 130,063 ตัน จากสถานการณ์การผลิตปลานิลในปี 2554 คาดว่าจะมีผลผลิตรวมทั้งประเทศลดลงจากปีก่อนหน้า 22.3% เหลือเพียง 139,263 ตัน เนื่องจากปัญหาด้านอุทกภัย แต่อย่างไรก็ตาม ในปี 2555 คาดว่าจะมีผลผลิตประมาณ 179,849 ตัน โดยผลผลิตปลานิลส่วนใหญ่จะจำหน่ายภายในประเทศ ซึ่งในปี 2554 มีการส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์จำนวนเพียง 11,910 ตัน ทั้งนี้เนื่องจากราคาปลานิลในประเทศสูงกว่าราคาที่จำหน่ายในตลาดโลก โดยแนวโน้มการผลิตปลานิลของไทยมีแนวโน้มที่จะเพิ่มพื้นที่การผลิตและกำลังการผลิตต่อหน่วยพื้นที่เพื่อรองรับการขยายตัวของความต้องการบริโภคภายในประเทศ (เกวลิน, 2555) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นถึงปริมาณและศักยภาพการผลิตปลาน้ำจืดเชิงการค้าของประเทศไทย รวมถึงในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศ แต่อย่างไรก็ตามการขยายตัวของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังคงประสบปัญหา ทั้งในด้านราคาอาหารสำเร็จรูปที่สูงขึ้น และปัญหาของมลภาวะจากการทิ้งของเสียอินทรีย์จำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาโรคระบาด ซึ่งปัญหาดังกล่าวไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะประเทศไทย หากแต่เกิดขึ้นในประเทศกำลังพัฒนาที่มีศักยภาพในการผลิตอาหารสู่ตลาดโลกด้วยเช่นกัน (Subasinhge, 2005; Matos et al., 2006) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงปลานิลบริเวณภาคใต้ของไทย เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมทำการเลี้ยงปลานิลในบ่อดินและแบบกระชัง โดยการเลี้ยงแบบกระชังพบได้ทั้งในแม่น้ำขนาดใหญ่และกระชังในบ่อดิน โดยใช้ลูกพันธุ์ปลานิลจากบริษัทผู้ผลิตลูกพันธุ์ขนาดใหญ่ของประเทศเป็นหลัก นอกจากนี้จะใช้ลูกปลานิลจากส่วนราชการ เช่น กรมประมงในพื้นที่ รวมถึงเกษตรกรซึ่งเพาะพันธุ์ปลานิลในพื้นที่ อย่างไรก็ตามกำลังการผลิตลูกพันธุ์ปลานิลในพื้นที่ภาคใต้ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ทำให้ต้องนำลูกพันธุ์ปลาจากบริษัทผู้ผลิตลูกพันธุ์ปลานิลรายใหญ่ของประเทศซึ่งมีฐานการผลิตในพื้นที่ภาคกลาง โดยนิยมนำลูกปลาขนาดเล็กน้ำหนัก 0.25 กรัม/ตัว ขนส่งทางอากาศยานเข้ามาเลี้ยงในพื้นที่ภาคใต้ ซึ่งจากระบบการจัดหาลูกพันธุ์ปลานิลทำให้การเลี้ยงปลานิลในพื้นที่ภาคใต้เสี่ยงต่อการรับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากการผลิตลูกพันธุ์และกระจายสู่แหล่งเลี้ยงต่าง ๆ ในพื้นที่ รวมถึงปัญหาการสะสมของสารอินทรีย์ในพื้นที่การเพาะเลี้ยงปลานิล โดยโรคที่พบระบาดรุนแรงในพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ โรคตัวด่าง (Columnaris disease) Streptococcosis และ Motile Aeromonas Septicaemia (MAS)

MAS เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย พบการแพร่ระบาดในสัตว์น้ำหลายชนิดและก่อให้เกิดปัญหาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจทั่วโลก MAS เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas* spp. ซึ่งพบเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. jandaei* เป็นต้น (Aravena-Román et al., 2012) โดยเชื้อ *Aeromonas* sp. จัดอยู่ใน Family

Aeromonadaceae ซึ่งปัจจุบันได้มีการจัดอนุกรมวิธานด้วยระบบ Bergey's manual of systematic bacteriology volume II โดยจัดอยู่ในอยู่ในไฟลัม Proteobacteria ชั้น Gammaproteobacteria โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้นตรง ขนาดความยาวโดยทั่วไปประมาณ 1.0-1.5 ไมครอน (2-4.5 เท่าของความกว้าง) เคลื่อนที่โดยใช้ flagellum ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างสารสี ภายในสาย DNA ประกอบด้วย Gaunine-Cytosine จำนวน 57-63% ไม่มีแคปซูล ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) โดยทั่วไปมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวลหรือสีเหลืองอ่อน มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ บางครั้งพบเป็นสายสั้น ๆ เจริญได้ทั้งในสภาพมี/ไม่มีออกซิเจน พบได้ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำจืดโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง ซึ่งเชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ในปลา เช่น เกิดการตกเลือด ท้องบวมและเกล็ดพอง โดยปกติโรค MAS สามารถก่อให้เกิดการตายของปลานิล 50-100% ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างรุนแรงในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลของประเทศไทยและทั่วโลก กลไกพื้นฐานของการเกิดโรค MAS ในปลา เริ่มจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจะเข้าสู่ตัวปลาทางปาก ผิวหนัง เหงือกหรือเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย จากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนภายในร่างกายจากการแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด โดยอาการของโรคแบ่งออกเป็นอาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน อาการรุนแรงแบบเฉียบพลันที่มีลักษณะท้องมาน บวมน้ำ และแผลตื้น แบบเป็นแผลเรื้อรังตามตัว และแบบไม่แสดงอาการของโรค การวินิจฉัยโรค สามารถทำได้โดยการเพาะเชื้อจากอวัยวะเป้าหมายของปลาที่ปรากฏอาการติดเชื้อ เช่น แยกเชื้อโดยเพาะเชื้อที่แยกได้จากแผล และอวัยวะเป้าหมายโดยการ Streak บน Aeromonas selective agar หรือ TSA แล้วบ่มไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง มีรายงานว่าคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Aeromonas* spp. คล้ายกับแบคทีเรียใน Family Enterobacteraceae คือ เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่ว ๆ ไป สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารและให้พลังงาน เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุดประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ในช่วง pH 5.5-9.0 และสามารถผลิต extracellular enzymes ได้แก่ hemolysins, cytotoxins, enterotoxin, gelatinase, lecitinase, ribonuclease, deoxyribonuclease, caseinase, elastase, staphylolyase รวมถึง resistance factor โดยการถ่ายทอดทาง plasmid ทำให้เพิ่มความรุนแรงของเชื้อมากขึ้น ส่วนปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ทดสอบพบว่า cytochome oxidase test ให้ผลบวก สามารถสร้าง indole ได้ เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ หรือ Aeromonas selective agar ซึ่งใช้แยกเชื้อนี้ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีลักษณะใส

ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas*

เชื้อ *Aeromonas* spp. ก่อโรคโดยการผลิตโปรตีนที่เรียกว่า "ปัจจัยความรุนแรง" ขึ้นและปลดปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อใช้ประโยชน์ต่าง ๆ (Méndez et al., 2012, Romero et al., 2016, Meng et al., 2017, Peatman et al., 2018) ได้แก่

1. การผลิตเอนไซม์ เพื่อให้แบคทีเรียสามารถเข้าสู่สัตว์น้ำได้ (invasion the host) เช่น protease, lipase และ elastase

2. การผลิตโปรตีนหรือสารพิษ เพื่อก่อโรคในสัตว์น้ำ (cause disease) เช่น hemolysin และ aerolysin

3. การผลิตโปรตีนและโพลีแซกไรด์ เพื่อช่วยป้องกันการทำลายเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ (evade host defenses) เช่น capsular และ s-layer

4. การผลิตสารต่าง ๆ เพื่อช่วยดึงแร่ธาตุและสารอาหารจากสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการเจริญเติบโต (acquire iron and nutrients) เช่น siderophores

5. การผลิตโปรตีนช่วยเจริญเติบโตและความอยู่รอดในธรรมชาติที่มีการเปลี่ยนแปลงไปได้ (sense environmental change) เช่น lipopolysaccharide (LPS), O-antigens, capsular serotypes, s-layer และระบบ quorum sensing

(1) Hemolysin

Hemolysin เป็นสารพิษสำคัญในสกุล Aeromonas ควบคุมการผลิตด้วยยีน cytolytic enterotoxin (Act) ผลิตได้ 3 รูปแบบคือ α-hemolysin, β-hemolysin และ γ-Hemolysin สารพิษชนิดนี้ทำหน้าที่เข้าจับและทำลายเม็ดเลือดแดงของสัตว์น้ำ (Lee et al., 1990)

(2) Protease

Protease เป็น proteolytic enzymes อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ ทำให้เกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ protease ช่วยย่อยโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ของสัตว์น้ำ และใช้กรดอะมิโนที่ได้เป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโต มีการศึกษาเอนไซม์ protease ในเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. เช่น serine protease, aminopeptidases, metalloproteases (Esteve and Birkbeck, 2004)

(3) Lipase

Lipase หรือ triacylglycerol hydrolases เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันเพื่อเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เอนไซม์ lipase มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ของเชื้อแบคทีเรีย เช่น เอนไซม์ glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase (GCAT) เป็น extracellular enzyme ที่ผลิตจากเชื้อ *A. salmonicida* และ *A. hydrophila* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 kDa

(4) Lipopolysaccharides

Lipopolysaccharides (LPS) คือส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบและเป็นโมเลกุลที่ถูกจดจำ และกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของสัตว์น้ำผ่าน toll-like receptors 4 (TLR4) ได้ เมื่อเซลล์แบคทีเรียแตกจะปลดปล่อย LPS ออกสู่สิ่งแวดล้อม และอวัยวะภายในสัตว์น้ำกลายเป็นสารพิษที่เรียกว่า endotoxin ประกอบด้วย hydrophobic lipid A, polysaccharide และ

O-antigen ซึ่งหากสัตว์น้ำมีการสะสม LPS toxin ปริมาณมากจะส่งผลให้สัตว์น้ำป่วย มีความดันเลือดผิดปกติ เซลล์เม็ดเลือดแตกและเกิดการอักเสบ ซึ่งอาจทำให้สัตว์น้ำตายได้

(5) Colonic acid

Colonic acid เป็นกลุ่ม extracellular polysaccharide ชนิดหนึ่งที่พบใน *E. coli* และวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยหน้าที่สำคัญของ colonic acid คือ ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรีย และเพิ่มศักยภาพในการบุกรุกเซลล์ในสัตว์น้ำ นอกจากนี้สาร colonic acid ยังเป็นส่วนประกอบของ extracellular polymeric substances (EPSs) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อยึดเกาะเข้าด้วยกันเกิดเป็น biofilm

(6) Capsules

Capsules เป็น virulence factor ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นล้อมรอบผนังเซลล์ และมีบทบาทหน้าที่สำคัญหลายประการ เช่น แบคทีเรียผลิตขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองจากระบบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ เพื่อป้องกันการทำลายเซลล์จากกระบวนการ phagocytosis และช่วยป้องกันการทำลายเซลล์จากยาปฏิชีวนะ รวมถึงทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้

2.2 ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic)

ยาปฏิชีวนะเป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียและกลุ่มสิ่งมีชีวิตใกล้เคียงแบคทีเรีย เช่น ริกเคทเซีย คลาไมเดียและกลุ่มโปรโตซัวบางกลุ่ม แต่อย่างไรก็ตายาปฏิชีวนะไม่สามารถควบคุมหรือทำลายเชื้อไวรัส และเชื้อปรสิตได้ ซึ่งทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ กรมประมงได้กำหนดและให้ความหมายของยาต้านจุลชีพดังนี้ ยาต้านจุลชีพ หมายถึง สารประกอบเคมีที่ได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ ซึ่งมีผลต่อต้านหรือทำลายเชื้อจุลชีพอื่น ๆ นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังจัดเป็นยาต้านจุลชีพด้วย การขึ้นทะเบียนยาต้านจุลชีพที่เป็นยารักษาโรคในสัตว์น้ำอยู่ภายใต้การควบคุมของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โดยมีการขึ้นทะเบียนยารักษาโรคสัตว์น้ำถูกต้อง 12 ตัวยา ซึ่งแต่ละตัวยาจะมีข้อบ่งใช้กับสัตว์น้ำที่แตกต่างกันตามชนิด

ยาที่ขึ้นทะเบียนรักษาโรคสัตว์น้ำอย่างถูกต้อง 12 ตัวยา ได้แก่ เอนโรฟล็อกซาซิน (enrofloxacin), ซาราฟล็อกซาซิน (sarafloxacin), ออกโซลินิก แอซิด (oxolinic acid), ออกซีเตตร้าซัยคลิน (oxytetracyclin), ซัลฟาไดเมททอกซีน-ออร์เมทโธพริม (sulfadimethoxin-ormethoprim), ซัลฟาไดเมททอกซี-ไตรเมทโธพริม (sulfadimethoxin-trimethoprim), ซัลฟาไดเมททอกซีน (sulfadimethoxin), ซัลฟาโมโนเมททอกซีน(sulfamonomethoxin), ซัลฟาไดอาซีน (salfadiazine) ไตรเมทโธพริม (trimethoprim), ออร์เมทโธพริม (ormethoprim) และโทลทราซูริล (toltrazuril) นอกจากนี้ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 303 พ.ศ. 2550 ได้ระบุยาต้านจุลชีพ และยาฆ่าแมลงที่อนุญาตให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 3 ตัวยา ได้แก่ 1) ยาในกลุ่ม tetracycline เช่น chlortetracycline, oxytetracycline และ tetracycline 2) flumequin และ 3) deltamethrin

ยาปฏิชีวนะอาจจัดแบ่งกลุ่มได้หลายประเภทตามคุณลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

1. ในด้านการออกฤทธิ์ (mode of action) สามารถแบ่งยาปฏิชีวนะได้เป็นกลุ่มออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocidal antibiotics) ซึ่งยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาทั้งหลายในกลุ่ม betalactams, aminoglycosides และ fluoroquinolones เป็นต้น และกลุ่มออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรีย (Bacteriostatic antibiotics) จากนั้นแบคทีเรียจะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาทั้งหลายในกลุ่ม macrolides, chloramphenicols และ tetracyclines เป็นต้น
2. ในด้านการออกฤทธิ์ต่อกลุ่มของแบคทีเรีย เช่น ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียหลายกลุ่ม (broad-spectrum antibiotics) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก หรือยากลุ่ม (narrow-spectrum antibiotics) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น
3. การแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action) ของยาปฏิชีวนะในการทำอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรีย

กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ (Mechanisms of action)

กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพจะตั้งอยู่บนพื้นฐาน คือ ให้ยามีผลเฉพาะต่อเชื้อก่อโรคและไม่มีผลหรือมีผลเล็กน้อยต่อเซลล์ของมนุษย์ (selective toxicities) สามารถแบ่งตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพได้ 4 แบบ ได้แก่

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (inhibition of cell wall synthesis) กลุ่มยาและยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams, vancomycin, bacitracin, cycloserine, isoniazid และ ethambutol ยากลุ่มนี้ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนที่แตกต่างกัน แต่มีผลที่เหมือนกันคือทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถทนทานต่อความกดดันภายในเซลล์ที่สูงกว่าความกดดันของสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์มาก ๆ ได้ มีการแตกสลาย (lysis) ของเซลล์ตามมา ยาที่ออกฤทธิ์โดยกลไกนี้จึงมีผลเป็น bactericidal และออกฤทธิ์ได้เฉพาะต่อเชื้อที่กำลังมีการเจริญเติบโต แบ่งตัว หรือการสร้างผนังเซลล์อยู่เท่านั้น

2. กลุ่มที่ขัดขวางการทำงานเยื่อหุ้มเซลล์ (inhibition of cell membrane function) กลุ่มยาและยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ polymyxins, nystatin, amphotericin B, imidazoles, triazoles และ allylamines ยาในกลุ่มนี้จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลทำให้กลไกการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป มีการสูญเสีย macromolecules และ ions ต่าง ๆ ที่สำคัญของเซลล์ออกสู่ภายนอก ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ (bactericidal) ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ได้ทุกขณะ ไม่ว่าเชื้อแบคทีเรียจะกำลังมีการเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวอยู่หรือไม่ก็ตาม

3. ยับยั้งการสร้างโปรตีนในเซลล์ (inhibition of cellular protein synthesis) กลุ่มยาและยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ aminoglycosides, spectinomycin, tetracyclines, chloramphenicol, clindamycin และ macrolides ยากลุ่มนี้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียในขั้นตอนต่าง ๆ แตกต่างกันไป เช่น erythromycin ยับยั้งในขั้นตอนของการสังเคราะห์ initiation complex (mRNA-ribosome-f-methionul tRNA complex) และขั้นตอน translocation ยา Tetracyclines ยับยั้งในขั้นตอนที่ aminoacyl-tRNA จะเข้าไปจับกับ A site (acceptor site) ของ ribosome และ chloramphenicol ยับยั้งในขั้นตอนการต่อสายเปปไทด์ transpeptidation เป็นต้น

4. ยับยั้งการสร้างสารพันธุกรรม (inhibition of nucleic acid synthesis) กลุ่มยาและยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ griseofulvin, 5-fluorocytosine, rifampin, pyrazinamide, para-aminosalicylic acid, quinolones, sulfonamides, trimethoprime, pyrimethamine และ sulfone ยาในกลุ่มนี้ เช่น ritampicinสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และยาในกลุ่ม quinolones ได้แก่ nalidxic acid รวมถึงยาในกลุ่ม fluoroquinolones สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และยาในกลุ่ม quinolones ได้แก่ nalidixic acid และยาในกลุ่ม fluoroquinolones ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากกรดนิวคลิอิกจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ดังนั้นยาเหล่านี้จึงมักจะให้ผลเป็น bactericidal พวกที่ขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึม (Inhibition of metabolic process) ตัวอย่าง เช่น ยาในกลุ่ม sulfonamides และ trimethoprim ซึ่งขัดขวางการสังเคราะห์กรดโฟลิก (folic acid) ของเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้โดยทั่วไปให้ผลเป็น bacteriostatic แต่อาจให้ผลเป็น bactericidal ได้ในบางสภาวะ เช่น เมื่อใช้ยากลุ่ม sulfonamides ร่วมกับยา trimethoprim

ยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline

คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline เป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มตำรับยาเดี่ยว 244 ตำรับ ตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีสูตรโมเลกุล $C_{22}H_{24}N_2O_9$ และน้ำหนักโมเลกุล 460.434 g/mol มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองรสขม และละลายน้ำได้จำกัดที่มี pH เท่ากับ 7 ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์สูงสุดที่ pH ระหว่าง 5.5-6 ภายใต้อุณหภูมิและ pH ที่ไม่เหมาะสม ยากลุ่ม tetracycline จะเกิดการสลายตัวโดยมีการเกิดการย่อย (degradation) และ การจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของสูตรโครงสร้างทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค นอกจากนี้ที่ pH ต่ำ (2.0-6.0) กลุ่มยานี้จะเกิด epimerization เกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็วถ้า pH สูง กลุ่มยา tetracycline จะเกิด isomerization ไปเป็น isotetracycline โดยเฉพาะอย่างยิ่งยา chlortetracycline จะเกิดการสลายตัวได้เร็วที่สุด จะเปลี่ยนเป็น isotetracycline ทันทีที่ pH 7.5 คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของกลุ่มยา tetracycline คือ สามารถที่จะรวมตัวกับอิออนของพวกไดวาเลนท์และไตรวาเลนท์ เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำยานี้ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อ anaerobic bacteria, rickettsiae, chlamydiae, Mycoplasma, spiro-chetes และ protozoa บางชนิดโดยกลไกการออกฤทธิ์ของยา กลุ่ม tetracycline โดยโมเลกุลของยาไปจับกับสารแมกนีเซียมบนส่วนของ

plasma membrane ของเชื้อแบคทีเรีย แล้วเข้าไปอยู่ใน cytoplasm และมีการรวมตัวกับส่วน 30S ของ ribosome ในเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์นั้น ๆ ยากลุ่ม tetracycline มีคุณสมบัติการเป็น chelating agents ที่ดีดังนั้นยากลุ่มนี้สามารถรวมตัวกับอิออนชนิดต่าง ๆ เช่น Ca หรือ Mg ในอาหารหรือรวมตัวกับอิออนในน้ำ ทำให้เสื่อมฤทธิ์ไปได้ง่าย ยาในกลุ่ม tetracycline ที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำปัจจุบันมีรายงาน มี 3 ชนิด ได้แก่ chlortetracycline oxytetracycline และ tetracycline นิยมให้ยาทางปากโดยผสมอาหารหรือแช่สัตว์น้ำในสารละลายยาปฏิชีวนะ ยาจะมีการดูดซึมหลังจากที่ยาผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหารและลำไส้ หลังจากดูดซึมแล้วบางส่วนของยาจะเกิดเมแทบอลิซึม ค่า bioavailability (ค่าแสดงบริเวณยาที่มีสิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้จริง) ของยาในกลุ่ม tetracycline มีค่าค่อนข้างต่ำทั้งในปลาและกุ้งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่มีรายงานในมนุษย์ ดังนั้นการใช้ยากลุ่ม tetracycline ต้องใช้บ่อย ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลามาก ยา oxytetracycline ที่ผสมในอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป หรืออาหารสด พบว่าประมาณ 20-30% ของยาที่ผสมในอาหารเท่านั้นที่สัตว์น้ำจะได้รับเข้าไป ส่วนที่เหลือของยาบางส่วนอาจละลายน้ำและรวมตัวกับสารต่าง ๆ รวมทั้งตะกอนดินในน้ำบริเวณที่มีการเลี้ยงปลา ซึ่งอาจมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในบริเวณดังกล่าว ทำให้เชื้อเหล่านี้ดื้อยาได้

2.3 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

การดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อก่อโรคแบ่งออกได้ 2 แบบ (วีรวรรณ, 2549)

1. Natural resistance เป็นลักษณะการดื้อยาที่มีอยู่เดิมตามธรรมชาติของเชื้อก่อโรคนั้น ๆ ซึ่งอาจเป็นผลจากยาเข้าไปออกฤทธิ์ไม่ได้หรือไม่มี target ให้ยาออกฤทธิ์ เช่น เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ดื้อต่อยา penicillin G sodium หรืออาจเกิดจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ทำลายยา

2. Acquired resistance เป็นการดื้อยาที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น ภายหลังการเกิด acquired resistance นับเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นทั่วโลก เนื่องจากทำให้การรักษาโรคติดเชื้อยากขึ้นหรือไม่มียาต้านจุลชีพใช้ในการรักษา เสียค่าใช้จ่ายในการรักษามากขึ้นและผู้ป่วยมีโอกาสเกิดภาวะทุพลภาพหรือเสียชีวิตได้สูงขึ้น ซึ่งสาเหตุของการเกิด acquired resistance อย่างรวดเร็วมักเป็นผลจากการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางและไม่เหมาะสมทั้งในด้านของการเกษตรและวงการแพทย์ เชื้อก่อโรคส่วนหนึ่งจะพยายามปรับตัวเพื่อการอยู่รอดหลังจากที่มีการสัมผัสกับยาต้านจุลชีพ (selective antimicrobial exposures) กลไกการดื้อยาแบบนี้อาจเกิดได้หลายวิธี คือ

2.1. Chromosomal mediated resistance การเกิด gene mutation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ค่อนข้างยากและเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติในทุกครั้งที่เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน โดยส่วนใหญ่จะไม่เกี่ยวข้องกับยาต้านจุลชีพทำให้เชื้อที่ดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะมีอยู่จำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อที่ไวต่อยา นอกจากนี้เชื้อที่เกิดการดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะอ่อนแอกว่าเชื้อที่ไวต่อยา จึงไม่ค่อยก็ให้เกิดปัญหามากนัก ยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพทำลายเชื้อที่ไวต่อยาไปมาก เชื้อที่ดื้อต่อยาเหล่านี้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นและก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาตามมา การเกิด gene mutation นี้อาจส่งผลให้เชื้อก่อโรคมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อบุเซลล์หรือผนังเซลล์ โดยเฉพาะในส่วนที่ยาไปออกฤทธิ์ ทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้หรืออาจ

ทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ออกมาทำลายยา การดื้อยาโดยวิธีนี้จะถ่ายทอดเฉพาะใน species เดียวกัน

2.2. Plasmid mediated resistance เป็นวิธีการสำคัญที่สุดที่ก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรคอย่างรวดเร็วและแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง สาเหตุของการดื้อยาแบบนี้เกิดจากการถ่ายทอด resistance plasmids (R-plasmids) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซมในเซลล์ของแบคทีเรีย (extrachromosomal genetic elements) ที่บรรจุ resistance genes (R-genes) ของการดื้อยาไว้ การดื้อยาโดยวิธีนี้มักจะทำให้เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิด และสามารถถ่ายทอดได้ทั้งใน species เดียวกันและข้าม species นอกจากควบคุมความคงทนของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแล้ว plasmids ยังมีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของเชื้อก่อโรคตามสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เพื่อการอยู่รอด ควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ความสามารถในการก่อโรค ภาวะเมแทบอลิซึมและความคงทนต่อสารต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเชื้อก่อโรค plasmids ยังมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง (self-replication) การส่งผ่าน R-plasmids ไปยังเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ส่วนใหญ่อาศัยวิธีที่เรียกว่า conjugation ซึ่งเป็นวิธีการส่งผ่าน R-plasmids โดยตรงจากเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่มี R-plasmids ไปยังเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ไม่มี R-plasmids การส่งผ่าน R-plasmids โดยวิธีนี้จำเป็นต้องมี genes อีกชนิดหนึ่งเพิ่มเติมโดยจะเป็นตัวกำหนดให้มีการเริ่มต้นกระบวนการถ่ายทอด plasmids นอกจากนี้แล้วการส่งผ่าน R-plasmids ยังทำได้โดยวิธี transduction ซึ่งจำเป็นต้องอาศัย bacteriophage เป็นพาหะส่งผ่านไป

2.3. Transposon mediated resistance นอกจาก plasmids แล้ว transposons จัดเป็น extrachromosomal genetic elements อีกชนิดหนึ่งที่สามารถส่งผ่าน R-genes ได้ โดยเป็นการส่งผ่าน R-genes จาก plasmid หนึ่งไปยัง plasmid หรือ chromosome หรือ bacteriophage อื่น ข้อแตกต่างจาก plasmids คือ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ transposons ขึ้นอยู่กับการแบ่งตัวของ chromosome, bacteriophage หรือ plasmid ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง โดยทั่วไปการส่งผ่าน transposons จาก chromosome ของแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งต้องมีการสอดแทรกของ transposons เข้าไปใน plasmids หรือ bacteriophage และอาศัยการส่งผ่าน plasmids หรือ bacteriophage อีกที อย่างไรก็ตามมีการค้นพบ transposons ที่ไม่จำเป็นต้องอาศัย plasmids หรือ bacteriophage เรียก transposons ชนิดนี้ว่า conjugative transposons ซึ่งพบได้ในแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ transposons ยังมีส่วนสำคัญอย่างมากต่อองค์ประกอบที่เป็นตัวกำหนดให้เกิดการดื้อยาหลายขนานใน R-plasmids

เชื้อก่อโรคแต่ละชนิดสามารถเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้หลายชนิดซึ่งมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันออกไป ขณะเดียวกันการดื้อยาแต่ละชนิดสามารถเกิดได้จากหลายกลไก กลไกการดื้อยาต้านจุลชีพที่พบได้ คือ

1. การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายยา (Enzymatic inhibition) เช่น เอนไซม์ β-lactamase ทำลายยาในกลุ่ม β-lactams เอนไซม์ acetyltransferase ทำลายยา chloramphenicol และ aminoglycoside modifying enzyme สลายยาในกลุ่ม aminoglycosides
2. การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ (Target alteration) ได้แก่

2.1. การลด affinity ของเป้าหมายต่อยาต้านจุลชีพ เช่น การลด affinity ของ penicillin binding proteins (PBPs) ต่อยา penicillin ใน *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*

2.2. การสร้างเป้าหมายใหม่หรือเปลี่ยนแปลงเส้นทางเมแทบอลิซึม เช่น การสร้าง PBP ชนิดใหม่ซึ่งไม่เคยมีมาก่อนใน methicillin-resistant *S. aureus*

2.3. การสร้างเป้าหมายหรือเส้นทางเมแทบอลิซึมให้มากเกิน เช่น การสร้างเอนไซม์ dihydropteroate synthase ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา sulfonamides ให้มากขึ้น

2.4. การป้องกันไม่ให้ยาเข้าสู่เป้าหมายเช่น การดื้อยา vancomycin ของเชื้อ Enterococcus

3. การลดการนำยาเข้าเซลล์ของเชื้อก่อโรค (Decrease uptake) ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

3.1. การลดการซึมผ่านของยาเช่น การดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ *P. aeruginosa*

การขับยาออกจากเซลล์ของเชื้อก่อโรค เช่น การดื้อยาของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ต่อยา tetracycline การดื้อยาในกลุ่ม β-lactams ของเชื้อ *P. aeruginosa*

ยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะ Tetracycline (Tetracycline genes)

วีรวรรณ (2549) กล่าวถึงกลไกการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ในรูปแบบของการเกี่ยวข้องกับยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะชนิด *tet*A, *tet*B, *tet*C, *tet*D, *tet*E, *tet*G, *tet*H, *tet*K, *tet*L และ *tet*A(P) โดยอาศัยโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำหน้าที่ขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ เพื่อลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ ยีนที่มีหน้าที่ดังกล่าวพบได้ในแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *tet*A, *tet*C, *tet*D, *tet*E, *tet*G และ *tet*H ในขณะที่ยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะที่พบในแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *tet*K, *tet*L และ *tet*A(P) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Villedieu (2011) ที่รายงานว่ามียีน 13 ยีนที่ช่วยในการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ ได้แก่ *tet*A, *tet*B, *tet*C, *tet*D, *tet*E, *tet*G, *tet*H, *tet*, *tet*Y, *tet*Z และ *tet*30 ซึ่งพบในแบคทีเรียแกรมลบ และยีนที่ขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ที่พบในแกรมบวก ได้แก่ *tet*K และ *tet*L โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์มีกระจายอยู่ทั่วไป และถ่ายทอดยีนเหล่านี้ผ่านทางพลาสมิด ซึ่งเป็นการถ่ายทอดในรูแบบ conjugative นอกจากนี้ยับมียีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานยาปฏิชีวนะเป็นยีนควบคุมการผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซมจากปฏิกิริยาของยาปฏิชีวนะ โดยยีนเหล่านี้ได้แก่ *tet*M, *tet*O, *tet*S, *tet*B(P) และ *tet*Q ในขณะที่ยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะชนิด *tet*X ทำหน้าที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ในการทำลายโครงสร้างยาปฏิชีวนะ Tetracycline โดยยีนควบคุมการต่อต้านยาปฏิชีวนะ Tetracycine หลายชนิดที่กล่าวถึง จะช่วยในการขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์เพื่อลดความเข้มข้นของยา กลุ่มยีนที่ควบคุมการผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซมจากปฏิกิริยาของยาปฏิชีวนะ และกลุ่มยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ทำลายโครงสร้างของยาปฏิชีวนะโดยตรง

2.4 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากสภาวะโลกร้อนต่อการเกิดโรคสัตว์น้ำ

ปัจจุบันได้มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกในหลายมิติและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง (Karvonen et al., 2010) และนำไปสู่การพัฒนาและการศึกษาถึงผลกระทบต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการผลิตอาหาร ซึ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็เป็นกิจกรรมรูปแบบหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเลี้ยงปลา ซึ่งเป็นรูปแบบของการเลี้ยงกลางแจ้ง และได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมโดยตรง ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลทางภาคใต้ของไทย มีรูปแบบการเลี้ยงที่สำคัญ สองลักษณะได้แก่ การเลี้ยงในรูปแบบบ่อดินและการเลี้ยงในกระชัง ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ ก็จะส่งผลต่อปลาที่เลี้ยงโดยตรง ซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมถือเป็นปัจจัยความเครียดที่สำคัญประการหนึ่งของสัตว์น้ำ และส่งผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและสภาวะภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ จากการศึกษาของ Lafferty (2009) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลต่ออุบัติการณ์ของโรคหลายชนิด ซึ่งผลของอุณหภูมิต่อการเกิดโรคนั้นเกิดจากปัจจัยทั้งในแง่ของผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการลดลงของระดับภูมิคุ้มกันในปลา (Guerreiro et al., 2014) และกระตุ้นให้เชื้อก่อโรคสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง (Yang et al., 2014) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ซึ่งสามารถเจริญได้ระหว่างอุณหภูมิ 4-42 องศาเซลเซียส จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลกระตุ้นการผลิตโปรตีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. (Yu et al., 2004, 2007) และจากการศึกษา ด้วยเทคนิค Maldi-Toff พบว่าโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรง เช่น Serin-metalloprotease, S-layer และ Flagellins มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณการแสดงออกตามปัจจัยอุณหภูมิ (Guerreiro et al., 2014; Rasmussen-Ivey et al., 2016)

จากสภาวะอากาศทางภาคใต้ในปัจจุบัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกะทันหันบ่อยครั้ง ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของปลานิลที่เกษตรกรเลี้ยงอย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะโลกร้อนส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศรุนแรงมากยิ่งขึ้น ซึ่งลักษณะอากาสรูปแบบหนึ่งที่ส่งผลเสียต่อปลานิลที่เกษตรกรเลี้ยงในพื้นที่ภาคใต้ คือ การที่เกิดฝนตกสลับการมีแดด ทำให่อุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน ซึ่งลักษณะเช่นนี้ ก่อให้เกิดการระบาดของโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง MAS และ โรค Columnaris

2.5 สารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรีย

สมุนไพร ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 หมายถึง พืชที่ใช้ ทำเป็นเครื่องยาสมุนไพรกำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์โดยเฉพาะ ในทางสุขภาพ อันหมายถึงทั้งการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค ความหมายของยาสมุนไพรในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ได้ระบุว่า ยาสมุนไพร หมายความว่า ยาที่ได้จากพฤกษาชาติสัตว์หรือแร่ธาตุ ซึ่งมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผลฯลฯ ซึ่งมิได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ แต่ในทางการค้า สมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ถูกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลง บดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่งแต่ในความรู้สึกของคนทั่วไปเมื่อกล่าวถึงสมุนไพร มักนึกถึงเฉพาะต้นไม้ที่นำมาใช้เป็นยาเท่านั้น

สมุนไพร ตามพระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ 2562 หมายความว่า ผลิตผลธรรมชาติที่ได้จากพืช สัตว์ จุลชีพ หรือแร่ ที่ใช้ ผสม ปรุง หรือแปรสภาพ เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร

“ผลิตภัณฑ์สมุนไพร” หมายความว่า

1. ยาจากสมุนไพร และให้หมายความรวมถึงยาแผนไทย ยาพัฒนาจากสมุนไพร ยาแผนโบราณที่ใช้กับมนุษย์ตามกฎหมายว่าด้วยยา หรือยาตามองค์ความรู้การแพทย์ทางเลือกตามที่รัฐมนตรีโดยคำแนะนำของคณะกรรมการประกาศกำหนด เพื่อการบำบัด รักษา และบรรเทา ความเจ็บป่วยของมนุษย์ หรือการป้องกันโรค

2. ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบสำคัญที่เป็นหรือแปรสภาพจากสมุนไพร ซึ่งพร้อมที่จะนำไปใช้แก่มนุษย์เพื่อให้เกิดผลต่อสุขภาพหรือการทำงานของร่างกายให้ดีขึ้น เสริมสร้างโครงสร้างหรือการทำงานของร่างกาย หรือลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค

3 วัตถุที่มุ่งหมายสำหรับใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร

การใช้สมุนไพรในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค เนื่องจากยาปฏิชีวนะสามารถรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะมีข้อเสียหลายประการ เช่น เชื้อแบคทีเรียดื้อยา มียาปฏิชีวนะตกค้างในสิ่งแวดล้อม สัตว์น้ำ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ปัจจุบันจึงมีการใช้สมุนไพรเป็นแนวทางการลดใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรหาง่าย ราคาถูก ปลอดภัย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายง่าย และไม่มีตกค้างในสิ่งแวดล้อม สัตว์น้ำหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ (Reverter et al., 2014) สมุนไพรหลายชนิด เช่น กระเทียม ฝาง ใบฝรั่ง มีรายงานทางวิชาการว่าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ (Wei et al., 2008, Gull et al., 2012, Gobi et al., 2016) สารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดในสมุนไพรมีดังต่อไปนี้

1) น้ำมันหอมระเหย (essential oil, EOs)

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่พืชผลิตขึ้นตามธรรมชาติ พบมากในพืชเขตร้อนโดยเฉพาะแถบใกล้เส้นศูนย์สูตร เช่น กระเพรา อบเชย ตะไคร้หอม กานพลู จันเทศและอบเชย น้ำมันหอมระเหยจัดเป็น secondary metabolite ที่พืชผลิตเพื่อใช้ล่อแมลงให้ช่วยผสมเกสรจากดอกหนึ่งไปอีกดอกหนึ่ง น้ำมันหอมระเหยสกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ต้นและใบที่มีสีเขียว เปลือกไม้ เนื้อไม้ ผล เมล็ด หรือเปลือกของเมล็ด ราก โดยใช้วิธีสกัด เช่น กลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ การบีบอัด การสกัดเย็น และใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้พบทั้งสารที่มีขั้ว และไม่มี

ขั้ว ส่วนใหญ่มีส่วนประกอบของ terpenes derivatives , aromatic และ aliphatic compounds น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตในแบคทีเรีย เนื่องจากคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ขององค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย ทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยทำให้ผนังเซลล์เกิดรอยรั่ว และแบคทีเรียสูญเสีย ATP ในสังเคราะห์สารสำคัญ (macromolecules) เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้น้ำมันหอมระเหยออกฤทธิ์ในแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีส่วนประกอบของ lipoteichoic acid (LTA) ซึ่งมีสมบัติเป็น lipophilic ทำให้น้ำมันหอมระเหยผ่านผนังเซลล์ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบที่มีองค์ประกอบเป็น LPS

กลุ่ม terpenoids เป็นสารประกอบอินทรีย์ในน้ำมันหอมระเหย พบได้หลายชนิด เช่น carvacrol, citral, thymol, carvone, limonene และ germacrene การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกลุ่ม terpenoids ขึ้นกับโครงสร้างของ phenolic compound, หมู่ฟังก์ชัน hydroxyl และ delocalised electrons ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการยับยั้ง เช่น carvacrol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี แต่หากเปลี่ยนโครงสร้างจากหมู่ hydroxyl เป็นหมู่ methyl จะทำให้สูญเสียสมบัติการเป็น hydrophobicity และลดความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียลง (Gutiérrez-del-Río et al., 2018)

มีรายงานการใช้น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการอบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas* spp. (Kačániová et al., 2017), กระเพรา (*Ocimum tenuiflorum*) และโหระพา (*Ocimum gratissimum*) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aeromonas* sp. (BandeiraJ et al., 2017) และขมิ้น (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อ *Proteus mirabilis*, *Bacillus pumilus* และ *Staphylococcus sciuri* ได้ (Devi et al., 2016)

2) กลุ่มสารประกอบฟีนอล

Phenolic compounds มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรแมติก (aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุลตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป มีสมบัติเป็น hydrophilic พบเป็นสารกลุ่มใหญ่เป็นอันดับ 2 ในพืช สารประกอบฟีนอลจัดเป็น secondary metabolism พบได้ในผล ใบ ลำต้น และดอก ของพืชหลายชนิด เช่น กานพลู ตะไคร้ ใบกระเพรา และใบชา มีรายงานพบว่าสารประกอบฟีนอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ โดยซึมผ่านผนังเซลล์ ทำให้เกิดรอยรั่ว รบกวนระบบการสร้างพลังงานภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด สารประกอบฟีนอลสามารถจำแนกตามจำนวนของวงแหวนแอโรแมติก และโครงสร้างพันธะเชื่อมต่อวงแหวน

3) กลุ่ม flavonoid

Flavonoid เป็นภาษาตินเรียกว่า flavus หมายถึง สีเหลืองมีโครงสร้างเป็นคาร์บอน 15 อะตอม และวงแหวนอะโรมาติก 2 วงขึ้นไป สารประกอบ flavonoid ได้แก่ anthocyandins

(malvidin และ delphinidin), flvavan-3-ols (catechins), flavones (apigenin และ luteolin), flavanones (naringenin และ eriodictyol), flovonols (quercetin และ kaempferol) และ isoflavonoid (genistein และ daidzein) มีรายงานการวิจัยของ He et al. (2014) พบว่าสาร kaempferol ในกลุ่ม flavonoid มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ซึ่งทำให้ผนังเซลล์เกิดรอยรั่ว

4) กลุ่ม organosulfur compounds

สาร organosulfur compounds เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีซัลเฟอร์ (sulfur, S) พบมากในกระเทียม (*Allium sativum*) และพวกวงศ์ผัดกาด (brassica) กระเทียมเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในเชื้อยับยั้งแบคทีเรีย กระเทียมมีองค์ประกอบของน้ำ (62–68%), คาร์โบไฮเตรด (26-30%), โปรตีน (1.5-2.1%), กรดอะมิโม (1-1.5%), organosulfur compounds (1.1-3.5%) และไฟเบอร์ (1.5%) สารในกระเทียมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ คือ L-Cys sulfoxide alliin ซึ่งเป็น volatile hydrophobic compound สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดี

2.6 ระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing, QS)

Quorum sensing system เป็นระบบการสื่อสารของเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยสารตัวกลาง ระบบนี้จะเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ มีปริมาณประชากรที่ความหนาแน่นสูงในโครงสร้างประชากรแบคทีเรียที่แบคทีเรียชนิดนั้นอาศัยอยู่ โดยการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงเริ่มต้นจากการศึกษาการเรื่องแสงของ *Vibrio fischeri* ในหมึกทะเล (Hastings and Nealson, 1977; Nealson and Hastings, 1979) ซึ่ง *V. fischeri* เปนแบคทีเรียแกรมลบพบไดในทะเลสามารถดำรงชีวิตแบบ symbiosis ในสัตวทะเลหลายชนิด เช่น หมึกทะเล (*Euprymna scolopes*) ซึ่งหมึกชนิดนี้มีคุณสมบัติพิเศษสามารถเรืองแสงในตัวเองได้ (Nyholm and McFall-Ngai, 2004) ซึ่งกระบวนการเรื่องแสงของหมึกเปนผลมาจากเชื้อแบคทีเรีย *V. fischer*i ที่อาศัยภายในตัวของหมึก โดยเชื้อ *V. fischeri* ในตัวของหมึกจะสรางสารที่เรียกวา autoinducer ออกมาเพื่อใชในการสื่อสารกับ *V. fischeri* เซลลอื่น ๆ เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนและหนาแนนมากขึ้น (ประมาณ 10^{11} cells/mL) ปริมาณของ autoinducer ที่เพิ่มมากขึ้นจะกระตุนให้ *V. fischeri* มีการแสดงออกของยีน luficerase และยีนอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่เกี่ยวของกับการสรางสารเรืองแสง (bioluminescence) ในหมึก โดยหมึกอาศัยประโยชนจากการเรืองแสงที่เกิดขึ้นในการล่าเหยื่อ ในขณะที่เชื้อ *V. fischeri* ที่อาศัยอยูอยางอิสระในทะเลไมสามารถสรางสารเรืองแสงได้เนื่องจากปริมาณของ autoinducer ที่สรางนั้นไมมากพอที่จะไปกระตุนเซลลให้เกิดการแสดงออกของยีนได โดย autoinducer ที่ผลิตขึ้นจะถูกทำลายอยางรวดเร็วเมื่อถูกสงออกภายนอกเซลล (Nealson and Hastings, 1979) ซึ่งระบบการสื่อสารนี้ตอมาเรียกวา ควอรัมเซนซิง (quorum sensing, QS) ซึ่งแบคทีเรียหลายชนิดใช้ระบบควอรัมเซนซิงในการกระตุ้น ควบคุม หรือเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนในกลุ่มแบคทีเรียชนิดนั้นที่อาศัยในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ตัวอย่างที่สำคัญของการสื่อสารของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมด้วยระบบควอรัมเซนซิง คือ การสร้างไบโอฟิล์ม

การศึกษาถึงกลไกในการควบคุมการสร้างสารเรืองแสง พบว่าเกิดจากสารบางอย่างที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยหากนำสวนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (supernatant) จาก *V. fischeri* ที่เลี้ยงจนเซลล์เจริญอย่างหนาแน่นมาใช่เลี้ยงเชื้อ *V. fischeri* ที่เจริญอยู่อย่างไมหนาแนนจะสามารถทำให้เชื้อนั้นเกิดการเรืองแสงขึ้นมาได้ แม้ว่าจะมีปริมาณของเซลลที่เลี้ยงไมมากนักก็ตาม ภายหลังจึงได้มีการศึกษาและสามารถจำแนกได้วาสารที่แบคทีเรียผลิตและหลั่งออกมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสวนใสนั้น คือ 3-oxo-N-(tetrahydro-2-oxo-3-furanyl) hexanamide หรือ N-3-(oxohexanoyl) homoserine lactone (OHHL) (Schauder and Bassler, 2001) โดยปัจจุบันเรียกสารกลุ่มนี้ว่า autoinducer ดังนั้นความหมายของ autoinducer คือ สารส่งสัญญาณ (signaling molecule) ที่แบคทีเรียสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล เมื่อจำนวนประชากรแบคทีเรียในกลุมเพิ่มมากขึ้น สารส่งสัญญาณที่สร้างก็จะมีปริมาณมากขึ้นและจะแพรกลับเขาไปจับกับตัวรับที่อยูภายในเซลลแบคทีเรีย โดยจะกระตุนเซลลแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงรวมทั้งตัวเองให้ตอบสนองด้วยการแสดงออกของยีนตาง ๆ หลายชนิด ปจจุบันมีรายงานถึงสาร autoinducer หลายชนิดในแบคทีเรียแกรมลบ เรียกชื่อรวม ๆ วา Acyl homoserine lactones (AHL) โมเลกุลของสารพวก AHL จะถูกสร้างจากภายในเซลล โดยเอนไซม AHL synthase ที่ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน LuxI ซึ่งโปรตีน autoinducer ที่สร้างจะถูกสงออกมาภายนอกเซลล เมื่อมีการสะสมในปริมาณที่มากขึ้นจะแพรกลับเขาสูเซลลไปกระตุ้นเซลลตัวเองและเซลล์ใกล้เคียง โดยจะจับกับโปรตีนที่ผลิตจากยีน LuxR เป็นโปรตีนคอมเพล็กซระหวาง AHL และ LuxR ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเปน transcription factor ไปกระตุนการแสดงออกของยีนตาง ๆ รวมทั้ง LuxI ให้สราง AHL เพิ่มมากขึ้น

การรวมกลุ่มของประชากรแบคทีเรียที่มีความหลากหลายและหนาแน่นสูงนั้น แบคทีเรียจะอาศัยการสื่อสารผ่านสัญญาณของสารโมเลกุลผ่านระบบควอรัมเซนซิง ซึ่งเป็นกลไกของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดที่ใช้สื่อสารกันระหว่างเซลล์ (cell-to-cell) ผ่านสารส่งสัญญาณภายใต้สิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ในธรรมชาติกลุ่มของแบคทีเรียจะอาศัยอยู่รวมกันมากกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้น การสื่อสารระหว่างแบคทีเรียจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้แบคทีเรียเองดำรงชีวิตและอยู่รอดได้ โมเลกุลสารส่งสัญญาณในระบบควอรัมเซนซิง มีความแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคทีเรียแกรมลบผลิตสารที่เรียกว่า AHL (จากการทำงานของเอนไซม์ AHL synthase) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกผลิตสาร oilgopeptide ซึ่งทั้งสองเป็น autoinducer protein ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนเพื่อสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรีย เอนไซม์ AHL synthase ในแบคทีเรียแกรมลบถูกควบคุมการแสดงออกด้วยยีน LuxI ซึ่งการทำงานของ AHL จะถูกส่งผ่านผนังเซลล์ในสิ่งแวดล้อมและกลับเข้าสู่เซลล์จับกับ LuxR (receptor protein) เป็น complex ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน (มณฑล และ ญฎารัตน์, 2557)

ความสามารถของแบคทีเรียที่กอให้เกิดโรคนั้นมีรายงานว่ามีความสัมพันธกับความสามารถในการแสดงออกของปจจัยกอโรคที่ถูกควบคุมด้วยยีน อยางไรก็ตามพบวาปจจัยก่อโรคมักไมมีผลตอการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุและไม่มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตปัจจัยกอโรค/ไม่ผลิตปัจจัยก่อโรค ยังคงสามารถแบงตัวเพิ่มจำนวนและรวมกลุมกันภายในเจาบานได้อยางเปนปกติ เพียงแตไม่ทำให้เกิดโรคเท่านั้น การศึกษาที่ผานมาทำให้นักวิทยา

ศาสตรทราบวาปจจัยกอโรคหลายชนิดถูกควบคุมดวยระบบควอรัมเซนซิง ดังนั้น จึงมีแนวความคิดใหมในการพัฒนายาตานจุลชีพ โดยอาศัยแนวคิดในการยับยั้งไมใหเชื้อแบคทีเรียนั้นกอโรคไดในรางกายของเจาบาน ดวยการยับยั้งการทำงานของระบบควอรัมเซนซิง เปาหมายใหมนี้แตกตางไปจากยาตานจุลชีพแบบเดิมที่มุงฆาหรือยับยั้งการแบงตัวของแบคทีเรีย ซึ่งจะสงผลใหเชื้อแบคทีเรียพยายามปรับตัวและเกิดการดื้อตอยาตานจุลชีพ ในขณะที่แนวทางใหมโดยการยับยั้งระบบควอรัมเซนซิง จะไมทำใหเชื้อแบคทีเรียเกิดการพัฒนาและตอตานยา เพราะไมไดมีเปาหมายในการฆาเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ปจจุบันเริ่มมีการวิจัยเพื่อหาสารเคมีทั้งที่เปนสารสังเคราะหและสารจากธรรมชาติหลายชนิดเพื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งระบบควอรัมเซนซิง โดยเรียกสารดังกลาวรวม ๆ ว่า quorum quenching หรือ quorum sensing inhibitor (QSI) เปาหมายหลักสำหรับการยับยั้งระบบควอรัมเซนซิง คือการยังยั้งหรือทำลาย autoinducer และโปรตีนตัวรับของ autoinducer ซึ่งหากสัญญาณดังกลาวถูกทำลายหรือยับยั้ง แบคทีเรียก็จะไมสามารถสื่อสารและสงสัญญาณเพื่อไปกระตุนการทำงานของยีนที่ควบคุมปจจัยกอโรคได

2.7 เทคโนโลยี Biofloc และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เทคโนโลยี Biofloc ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการกำจัดของเสียอินทรีย์และเปลี่ยนเป็นสารอาหารเพื่อการหมุนเวียนของชีวมวลในระบบบำบัด รวมถึงการลดการเปลี่ยนถ่ายน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งผลประโยชน์ของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี floc ในการเพาะเลี้ยงสัตว์ นอกจากจะเป็นการลดการเปลี่ยนถ่ายน้ำแล้ว อนุภาค floc ที่เกิดขึ้นยังเป็นอาหารธรรมชาติที่อุดมด้วยคุณค่าทางโภชนาการต่อสัตว์น้ำ ซึ่งสอดคล้องกับสถานการณ์ในปัจจุบันที่ราคาอาหารสัตว์น้ำเพิ่มสูงขึ้นและเป็นต้นทุนหลักในการผลิตสัตว์น้ำ โดยการเลี้ยงปลานิลเชิงการค้าจะมีสัดส่วนของต้นทุนอาหารสูงถึง 70-75% ของต้นทุนทั้งหมด จึงทำให้ Biofloc มีศักยภาพเป็นวัตถุดิบอาหารชนิดใหม่รวมถึง โปรตีนและไขมันทดแทนปลาป่นและน้ำมันปลาได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะเห็นได้จากจำนวนงานวิจัยกว่า 200 เรื่องในฐานข้อมูล Sciencedirect นับจากปี 2010 ถึงปัจจุบัน ที่ทำการวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารอาหารทดแทนจาก floc ในการผลิตอาหารสัตว์และแสดงให้เห็นถึงอัตราการเจริญเติบโต สุขภาพและคุณภาพของเนื้อสัตว์ (Kuhn et al., 2009; Bauer et al., 2012) นอกจากคุณค่าทางโภชนาการแล้ว ส่วนประกอบหลายชนิดในอนุภาค floc ยังส่งเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น Shot chain fatty acid ที่มีศักยภาพเป็นสารควบคุมทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Schryver et al., 2008) สาร butyric acid ซึ่งสามารถควบคุม *V. cambellii* ในระบบการเลี้ยง อาร์ทีเมีย *Artemia franciscana* (Defoirdt et al., 2006) รวมถึงสาร poly-β- hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งเป็น polymer ที่เกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ โดย PHB มีคุณสมบัติเป็น prebiotic ในสัตว์ชั้นสูง และยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *A. franciscana* และ *Vibrio* spp. (Defoirdt et al., 2007)

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

ดำเนินการติดตามการเริ่มดำเนินการและการเบิกจ่ายของโครงการย่อยให้เริ่มดำเนินการและเบิกจ่ายตามกรอบระยะเวลาที่กำหนด รวมถึงติดตามการดำเนินกิจกรรมวิจัยของโครงการย่อยเพื่อสอบถามความก้าวหน้าและปัญหาในระหว่างการดำเนินการวิจัยของโครงการย่อยทุกโครงการในชุดโครงการ

ในช่วงท้ายของโครงการ ชุดโครงการวิจัยจะรวมรวมองค์ความรู้ของแต่ละโครงการย่อยสำหรับจัดการอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลและปลาน้ำจืดอื่น ๆ ที่ได้รับผลกระทบจากโรค MAS และเชื้อ *Aeromonas* spp. รวมถึงนักศึกษา เจ้าหน้าที่รัฐในหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้สนใจ

กลยุทธ์ของชุดโครงการวิจัย

เกษตรกรมีส่วนร่วมในการกำหนดปัญหาที่นำไปสู่โจทย์วิจัย มีส่วนร่วมในกระบวนการการศึกษาวิจัยและนำผลที่ได้รับจากการวิจัยไปปรับใช้ในกระบวนการผลิตปลานิลทั้งในแง่ของการรู้เท่าทันโรคและการควบคุมกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยชีววิธี รวมทั้งตัวกลางในการถ่ายทอดองค์ความรู้เชิงประจักษ์และสร้างเครือข่ายเกษตรกรอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเป็นการพัฒนาศักยภาพด้านการผลิตของเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ให้ตรงกับความต้องการของเกษตรกรและสามารถเพิ่มศักยภาพการแข่งขันในเกษตรอุตสาหกรรมของประเทศได้ โดยคณะทำงานในชุดโครงการวิจัยได้ดำเนินการวิจัยภายใต้การความร่วมมือของนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยต่าง ๆ ในภาคใต้ที่มีความเชี่ยวชาญด้านโรคสัตว์น้ำและการเลี้ยงปลานิล เพื่อเป็นการรับองค์ความรู้และสังเคราะห์กระบวนการการพัฒนาองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและโรคสัตว์น้ำ เพื่อมุ่งเน้นการพัฒนาเทคโนโลยีของประเทศไทย ลดการพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างชาติและส่งเสริมการสร้างทีมวิจัยที่มีความเข้มแข็งทางการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาของเกษตรกร

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

โครงการย่อยที่ 1 อุบัติการณ์โรคเชิงฤดูกาล การต่อต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas* spp. ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย

ในการศึกษาแบคทีเรียก่อโรค MAS ต่อต้านยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลานิลของพื้นที่การเลี้ยงปลานิลสำคัญของภาคใต้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 6 พื้นที่ 8 สถานี ในตั้งแต่ ต.ค. 2560-ก.ย. 2561 โดยพื้นที่เป้าหมายของการศึกษาการระบาดของโรค MAS ในการเลี้ยงปลานิล 2 ระยะ ได้แก่ (1) ระบบการเพาะเลี้ยงลูกพันธุ์ปลานิล โดยบริเวณผลิตลูกพันธุ์จะทำการศึกษา 3 พื้นที่ 4 สถานี ได้แก่ 1. อ. สิงหนคร จ. สงขลา 2. อ. เมือง จ. พัทลุง และ 3. อ. เมือง จ.นครศรีธรรมราช และ อ. ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช และ (2) ระบบการผลิตปลาเนื้อ จำนวน 3 พื้นที่ 4 สถานี ได้แก่ 1. อ. ควนขนุน จ. พัทลุง 2. อ. ทุ่งใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช 3. อ. ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช และ 4. อ. พุนพิน จ. สุราษฎร์ธานี โดยได้ข้อมูลการแพร่ระบาดหรือการแสดงอาการของโรคจากเกษตรกร ซึ่งอาการเบื้องต้นในการวินิจฉัยว่าเป็นโรค MAS คือ พบอาการตกเลือดบริเวณครีบ โคนหาง และ/หรือ ท้องบวม ซึ่งจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เก็บตามช่วงเวลา 4 ช่วงเวลาตามฤดูกาลของปี ได้แก่ ช่วงฤดูฝน (ต.ค.-ธ.ค.) ช่วงระหว่างการเปลี่ยนฤดูฝนเข้าสู่ฤดูร้อน (ม.ค.-มี.ค.) ช่วงฤดูร้อน (เม.ย.-มิ.ย.) และช่วงระหว่างการเปลี่ยนฤดูร้อนเข้าสู่ฤดูฝน (ก.ค.-ก.ย.) โดยพบว่าช่วงการเปลี่ยนฤดูมีการพบการแพร่ระบาดของโรค MAS และเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. มากที่สุด

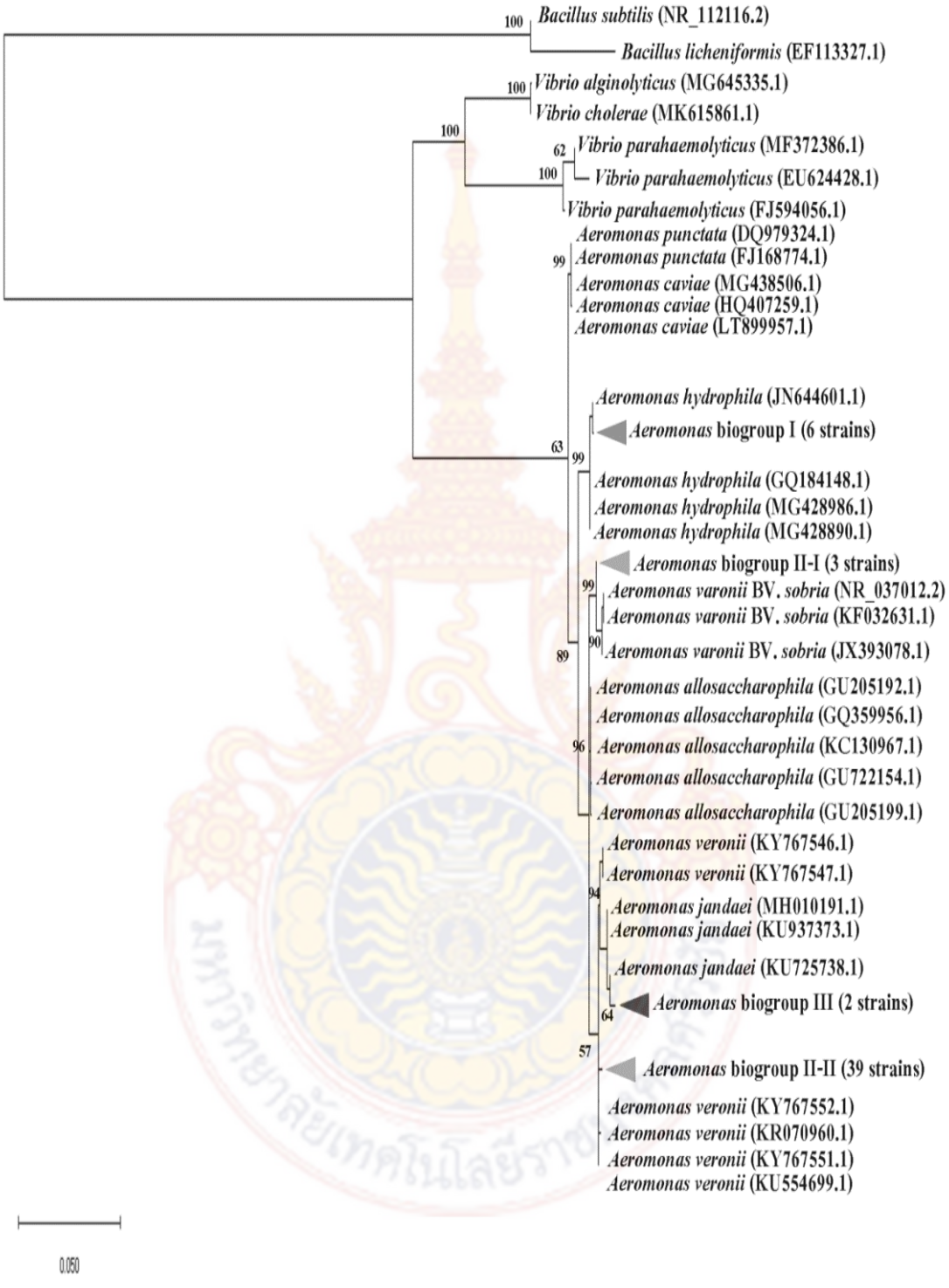
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่แยกได้จากปลานิลป่วยแสดงอาการโรค MAS จำนวน 242 ไอโซเลทข้างต้นมาศึกษาชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งหมดเป็นเชื้อในสกุล *Aeromonas* โดยสปีชีส์ของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วยส่วนใหญ่ คิดเป็น 40.91% เป็นเชื้อ *A. veronii*, 33.47% เป็นเชื้อ *A. veronii* biover. *sobria*, 17.77% เป็นเชื้อ *A. hydrophila*, 1.65% เป็น *A. jandaei* และอีก 6.20% เป็น *Aeromonas* spp. (ตารางที่ 1.1) ในขณะที่ข้อมูลการจำแนกชนิดเชื้อ *Aeromonas* spp. ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้การวิเคราะห์กับฐานข้อมูล API พบว่าเชื้อ MAR-*Aeromonas* spp. ที่ได้ประกอบด้วย เชื้อ *Aeromonas hydrophila/caviae/sobria* 1 และ *Aeromonas hydrophila/caviae/sobria*

นอกจากนี้จากการศึกษาการต่อต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Aeromonas* spp. จำนวน 242 ไอโซเลทที่แยกได้ ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline จำนวน 5 ชนิด ประกอบด้วย ยา Oxytetracycline, Tigecycline, Doxycycline, Tetracycline และ Minocycline ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ตัวอย่างเป็นเชื้อที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline จำนวนทั้งสิ้น 95 ไอโซเลท (คิดเป็นประมาณ 39% ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้) โดยส่วนใหญ่จะต่อต้านยาปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว ได้แก่ oxytetracycline และ tetracycline แต่มีเชื้อ *Aeromonas* spp. จำนวน 29 ไอโซเลทที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด (multi-antibiotic resistance) ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 จำนวน ชนิด และการต้านทานยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วยแสดงอาการ MAS ในพื้นที่ภาคใต้

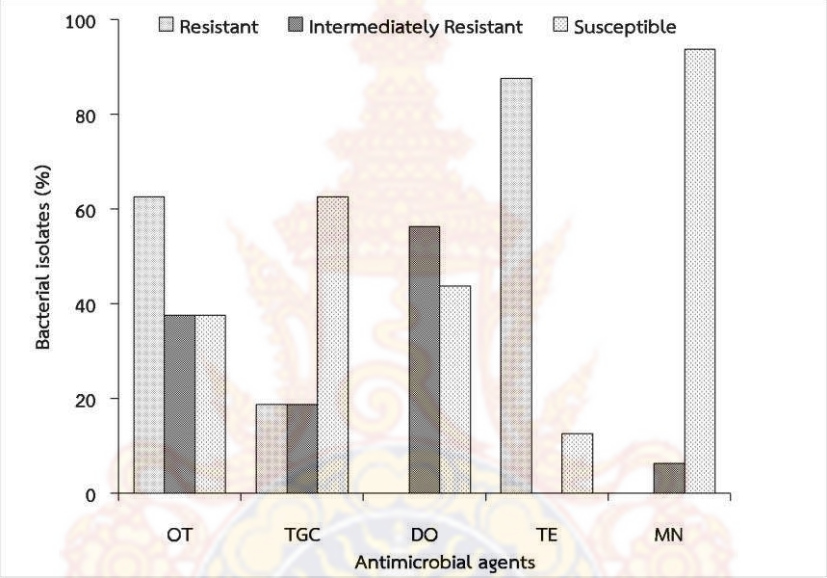
Species of collected *Aeromonas* isolates	**No. of isolation *Aeromonas* spp.**	**No. of antibiotic Resistance *Aeromonas* spp.**	**No. of multi-antibiotic Resistance *Aeromonas* spp.**
A. veronii	99 (40.91%)	43 (43.43%)	15 (34.88%)
A. veronii biovar *sobria*	81 (33.47%)	31 (38.27%)	8 (25.81%)
A. hydrophila	43 (17.77%)	17 (39.53%)	6 (35.29%)
A. jandaei	4 (1.65%)	-	-
Aeromonas sp.	15 (6.20%)	4 (26.66%)	-
Total	**242 (100%)**	**95 (39.25%)**	**29 (30.53%)**

เมื่อศึกษาข้อมูลเชิงวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. จำนวน 50 ไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียใน class gammaproteobacteria จากฐานข้อมูล GenBank และมี outgroup คือ *B. subtilis* (NR_112116.2) และ *B. subtilis* (EF113327.1) ด้วยโปรแกรม MEGA X software ด้วยวิธี maximum likelihood ความเชื่อมั่น bootstrap analysis เท่ากับ 1,000 พบว่า เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาจัดอยู่ใน 3 clade หลักในจีนัส *Aeromonas* โดย *A. hydrophila* (จำนวน 6 ไอโซเลท) จัดอยู่ใน Bio-Gr. I ซึ่งอยู่ใน clade ที่ 1 ในขณะที่ *A. veronii* biovar *sobria* (จำนวน 3 ไอโซเลท) และ *A. veronii* biovar *veronii* หรือ *A. veronii* (จำนวน 39 ไอโซเลท) จัดอยู่ใน Bio-Gr. II-I และ Bio-Gr. II-II ใน clade ที่ 2 และ *A. jandaei* (จำนวน 2 ไอโซเลท) จัดอยู่ใน Bio-Gr. III ใน clade ที่ 3 (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *Aeromonas* spp. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เมื่อพิจารณาการต้านทานยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วยแสดงอาการ MAS ในพื้นที่ภาคใต้ ต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline จำนวน 5 ชนิด ประกอบด้วย ยา Oxytetracycline, Tigecycline, Doxycycline, Tetracycline และ Minocycline ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าการต้านทานยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรียเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือยา Tetracycline, Oxytetracycline และ Tigecycline ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 87.5%, 62.5% และ 18.75% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะไม่พบการต้านทานยา Doxycycline และ Minocycline ในเชื้อ *Aeromonas* spp. ดังภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.2 สัดส่วนการต้านทานยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด ได้แก่ Oxytetracycline; OT, Tigecycline; TGC, Doxycline; DO, Tetracycline; TE และ Minocycline; MN ของเชื้อ *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วย (n=242)

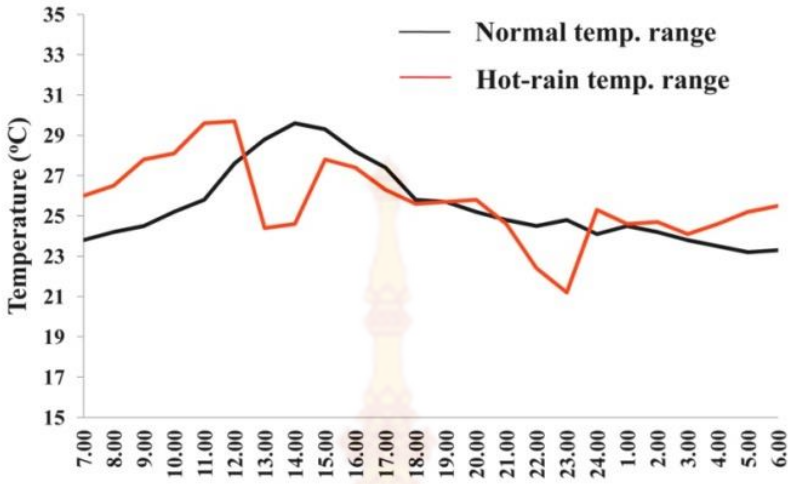
เมื่อนำข้อมูลการต้านทานยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Aeromonas* spp. จำนวน 242 ไอโซเลท (n=242) วิเคราะห์ตามเกณฑ์ของ CLSI documents M100-S23 ซึ่งแสดงการรายงานผลเป็น 3 กลุ่ม คือ Resistant (R), Intermediately resistant (I) และ Susceptible (S) พบว่าแบคทีเรียตอบสนองต่อยา Tetracycline ในลักษณะ R และ I คิดเป็น 87.50% และ 12.50% ตามลำดับ ยา Oxytetracycline ในลักษณะ R และ S คิดเป็น 62.50% และ 37.50% ตามลำดับ ตอบสนองต่อยา Tigecycline ในลักษณะ R, I และ S คิดเป็น 18.75%, 18.75% และ 62.50% ตามลำดับ โดยไม่พบการต่อต้าน หรือ R ในยา Doxycycline และ Minocycline ซึ่งแบคทีเรียตอบสนองต่อยา Doxycycline ในลักษณะ I และ S คิดเป็น 56.25% และ 43.75% ตามลำดับ ในขณะที่ตอบสนองต่อยา Minocycline ในลักษณะ I และ S คิดเป็น 93.75% และ 6.25% อย่างไรก็ตามความแตกต่างของการต้านทานยาปฏิชีวนะที่พบในเชื้อก่อโรค *Aeromonas* spp. ในปลาน้ำจืดที่เลี้ยงในที่ต่างกัน อาจ

เกิดได้จากหลายสาเหตุ หลายปัจจัย ได้แก่ สภาพภูมิอากาศของแต่ละพื้นที่ การใช้ยาของเกษตรกร และวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละที่ ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้แบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะได้ต่างกัน

การศึกษารูปแบบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas* spp. ที่แยกได้จากปลานิลป่วยแสดงอาการ MAS ในพื้นที่ภาคใต้ เพื่อศึกษาการมีอยู่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านยาปฏิชีวนะ Tetracycline โดยศึกษายีนที่ควบคุมกระบวนการในการลดพิษยาปฏิชีวนะ หรือทำให้เชื้อแบคทีเรียต้านทานต่อยาได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกำจัดยาออกจากเซลล์ (*tet*A, *tet*B, *tet*C, *tet*D, *tet*E, *tet*G) ยีนควบคุมการผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไรโบโซมจากปฏิกิริยาของยาปฏิชีวนะ (*tet*M) และยีนที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนรูปของยาปฏิชีวนะ (*tet*X) โดยผลของการศึกษาการมียีนเหล่านี้ในแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ที่สุ่มมาศึกษาทั้งหมด 109 ไอโซเลท เช่นเดียวกับการศึกษาการมีอยู่ของยีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromomas* spp. จำนวน 5 ยีน ได้แก่ *Lipase*, *Elastase*, *Enolase*, *Aerolysin*, *Enterotoxin* พบว่าไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนความรุนแรงกับยีนต่อต้านยาปฏิชีวนะและการต่อต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Aeromomas* spp. ที่ทดสอบได้

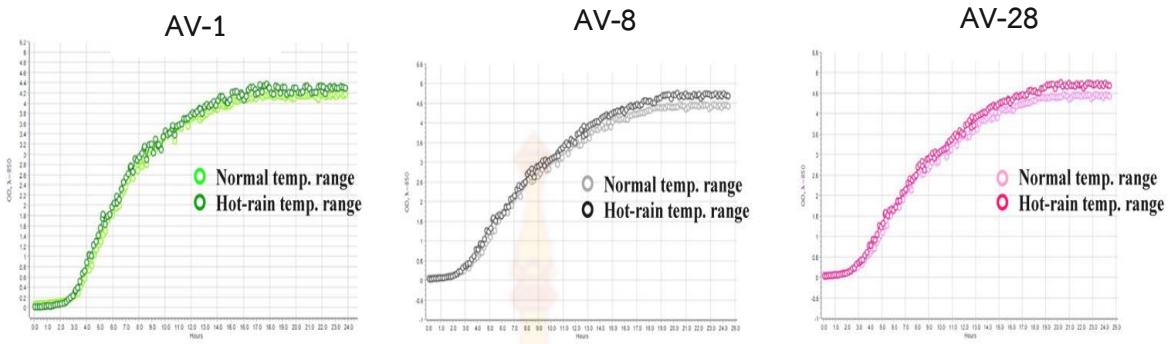
โครงการย่อยที่ 2 เรื่อง ผลจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศอย่างฉับพลันต่อระบบภูมิคุ้มกันและการยอมรับเชื้อ *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ผลจากการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของอากาศและน้ำด้วยเครื่องเครื่องบันทึกข้อมูลอุณหภูมิอัตโนมัติ (Testo) รุ่น 175-T2 ในบ่อสาธิตการเลี้ยงปลานิลของสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มทร. ศรีวิชัย อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช สามารถจัดรูปแบบอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันเป็นอุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน ดังภาพที่ 2.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิน้ำในบอเลี้ยงที่เก็บข้อมูล ในช่วงอุณหภูมิปกติจะอยู่ในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส ในขณะที่จะมีช่วงอุณหภูมิอีกรูปแบบหนึ่งที่พบการผันแปร คือ ช่วงอุณหภูมิผันแปรระหว่างเปลี่ยนฤดูจากฤดูร้อนสู่ฤดูฝน โดยมีอุณหภูมิน้ำระหว่าง 22-30 องศาเซลเซียส

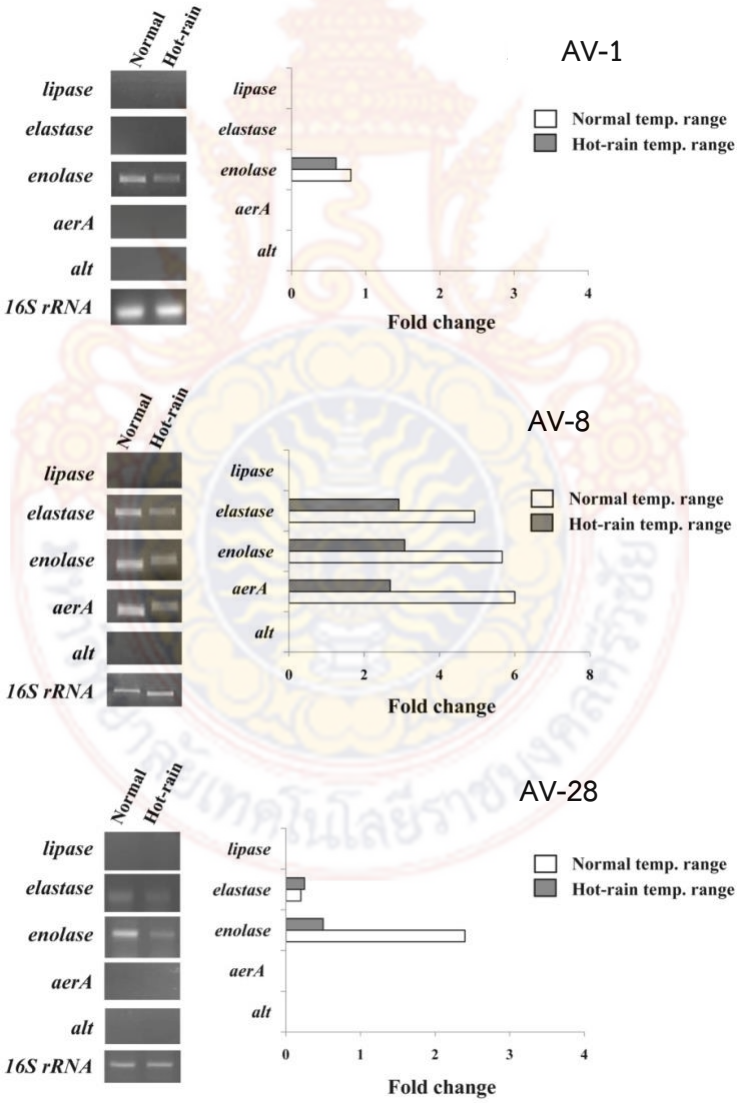


ภาพที่ 2.1 รูปแบบอุณหภูมิในรอบวันของบ่อเลี้ยงปลานิล

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างฉับพลันต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล และการเจริญเติบโตรวมถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงใน*เชื้อ A. veronii* (ยีน Lipase, Elastase, Enolase, Aerolysin, Enterotoxin)โดยพบว่า ค่าพารามิเตอร์เลือดและการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลภายใต้สภาวะเครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างฉับพลัน พบว่า อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลอย่างชัดเจน โดยค่าพารามิเตอร์เลือด ได้แก่ hematocrit, ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาวมีความแตกต่างกันในปลานิลที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่างกัน สอดคล้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล ได้แก่ ยีน lysozyme, IL-1β และ heat-shock protein 70 (HSP70) คือ อุณหภูมิแบบผันแปรส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันที่ลดลง (down regulation) ในขณะที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. veronii* น้อยมาก (ภาพที่ 2.2) แต่กลับส่งผลต่อการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเชื้อ *A. veronii* (ภาพที่ 2.3)

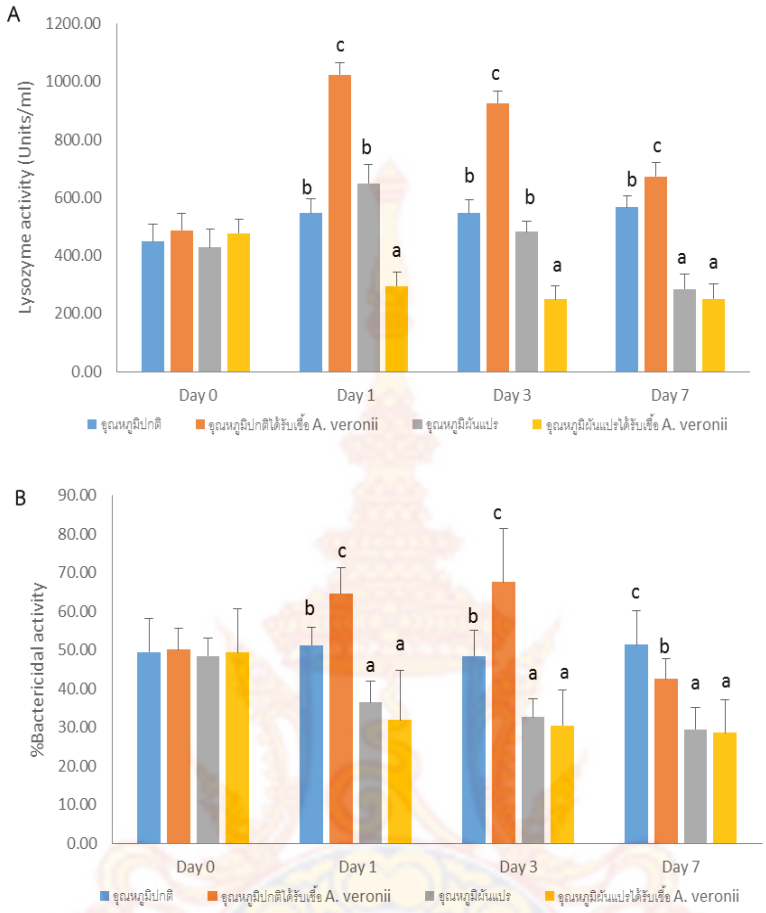


ภาพที่ 2.2 กราฟการเจริญเติบโต (growth curve) ของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่างกัน คือ อุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิผันแปรในช่วงร้อนและมีฝน

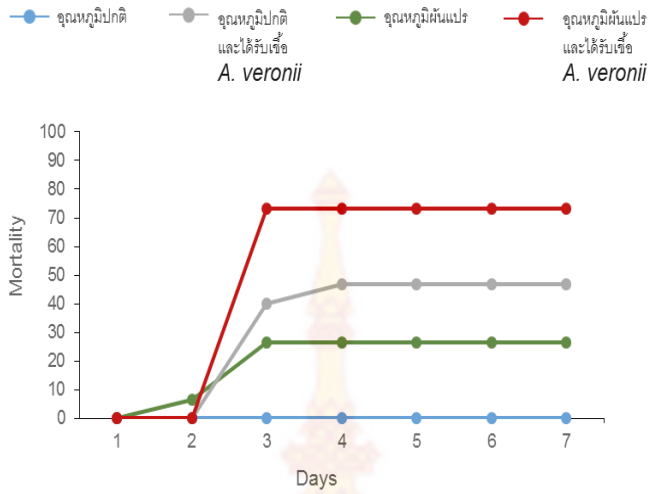


ภาพที่ 2.3 การแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงภายใต้รูปแบบอุณหภูมิต่างกัน คือ อุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิผันแปรในช่วงร้อนและมีฝน

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วต่อภูมิคุ้มกันและการยอมรับเชื้อ *A. veronii* ในปลานิล โดยทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วต่อภูมิคุ้มกันและการยอมรับเชื้อ *A. veronii* ในปลานิลขนาดน้ำหนัก 30±5 g โดยแบ่งปลานิลเป็น 4 ชุดการทดลอง เลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิในรอบวันต่าง ๆ กัน 2 รูปแบบ คือ อุณหภูมิปกติ และช่วงอุณหภูมิผันแปร ซ้ำต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน (ชุดที่ 1 และ 2 และชุดที่ 3 และ 4 เลี้ยงที่รูปแบบอุณหภูมิเดียวกัน คือ อุณหภูมิปกติเหมือนเดิมตลอดการศึกษา) เมื่อครบ 3 วันก่อน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษา humoral immune parameter ได้แก่ bactericidal activity และ lysozyme activity และเก็บเนื้อเยื่อไตส่วนหน้า (head kidney) สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ lysozyme, IL-1β และ HSP70 (เช่นเดียวกับในการศึกษาก่อนหน้า แต่แตกต่างที่การเลี้ยงปลานิลภายใต้อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นเพื่อให้สอดคล้องกับความเป็นจริงในการเลี้ยง) รวมถึงศึกษาการยอมรับเชื้อก่อโรค *A. veronii* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ปลานิลที่เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว (treatment ที่ 3 และ 4) มี lysozyme activity และ bactericidal activity สูงกว่าในชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงภายใต้สภาพอุณหภูมิปกติ (treatment ที่ 1 และ 2) อย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 0, 1 และ 7 ($P<0.05$) ในขณะที่ค่า lysozyme activity ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันในวันที่ 3 ($P>0.05$) (ภาพที่ 2.4) โดยพบว่าอุณหภูมิผันแปรอย่างฉับพลันส่งผลต่อความไวหรือการยอมรับเชื้อ *A. veronii* ของปลานิล (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.4 Humoral innate immune parameters ในปลานิลที่เวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน หลังจากเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน **(A)** Bactericidal activity และ **(B)** Lysozyme activity (Data represent mean±SD. Different letters stand for statistically significant differences (*P<0.05*) between groups)



ภาพที่ 2.5 อัตราการตายของปลานิลที่เลี้ยงภายใต้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิรูปแบบต่างกัน ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน แล้วกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. veronii*

โครงการย่อยที่ 3 เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรในรูปแบบอนุภาคนาโน เพื่อควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี disc diffusion method ของสารสกัดสมุนไพรจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ฝาง (*Caesalpinia sappan*), กระเทียม (*Allium sativum*), โปยก๊ก (*Illicium verum*), ข่า (*Alpinia galanga*), ดีปลีเชือก (*Piper longum*) และเทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare*) (เขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ Cs, As, Iv, Ag, Pl และ Fvตามลำดับ) โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ น้ำมันและ 95% ethanol ในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* sp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ (ต่อต้านยา oxytetracycline และ tetracycline) พบว่าสมุนไพรแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ไม่เท่ากัน โดยส่วนใหญ่สารสกัดที่ได้จากการใช้ ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะได้ (ตารางที่ 3.1)

นอกจากนี้ได้ศึกษาเชิงลึกเพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC) และ ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะได้ โดยเลือกศึกษาสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้เกิด inhibition zone กับ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะเท่านั้น โดยศึกษาด้วยวิธี broth micro-dilution ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่ทดสอบมีค่า MIC ในช่วง 0.469-7.50 mg/ml และ MBC ในช่วง 0.938-15.00 mg/ml โดยสารสกัดจากฝางให้ค่า MIC และ MBC ต่ำสุด ในขณะที่สารสกัด

ของกระเทียมและข่าที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลใกล้เคียงกัน และมากกว่าสารสกัดฝาง แต่สารสกัดโปยกั๊กมีค่า MIC และ MBC สูงกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ๆ สัมพันธ์กับค่า inhibition zone (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.1 Inhibition zone ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas* spp. สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ

Herbal plant/ Antibiotic	Extraction solvent	Name of herbal extract	Inhibition zone diameter (mm)
Caesalpinia sappan (Cs)	95% Ethanol (E95)	Cs-E95	18.65±0.60
	Water (W)	Cs-W	14.63±0.28
	Soybean oil (O)	Cs-O	ND
Allium sativum (As)	95% Ethanol (E95)	As-E95	16.75±0.50
	Water (W)	As-W	ND
	Soybean oil (O)	As-O	ND
Illicium verum (Iv)	95% Ethanol (E95)	Iv-E95	7.17±0.13
	Water (W)	Iv-W	7.83±0.33
	Soybean oil (O)	Iv-O	ND
Alpinia galanga (Ag)	95% Ethanol (E95)	Ag-E95	10.98±0.28
	Water (W)	Ag-W	ND
	Soybean oil (O)	Ag-O	ND
Piper longum (Pl)	95% Ethanol (E95)	Pl-E95	ND
	Water (W)	Pl-W	ND
	Soybean oil (O)	Pl-O	ND
Foeniculum vulgare (Fv)	95% Ethanol (E95)	Fv-E95	ND
	Water (W)	Fv-W	ND
	Soybean oil (O)	Fv-O	ND
Tetracycline (TE, 30 μg)			10.23±0.15

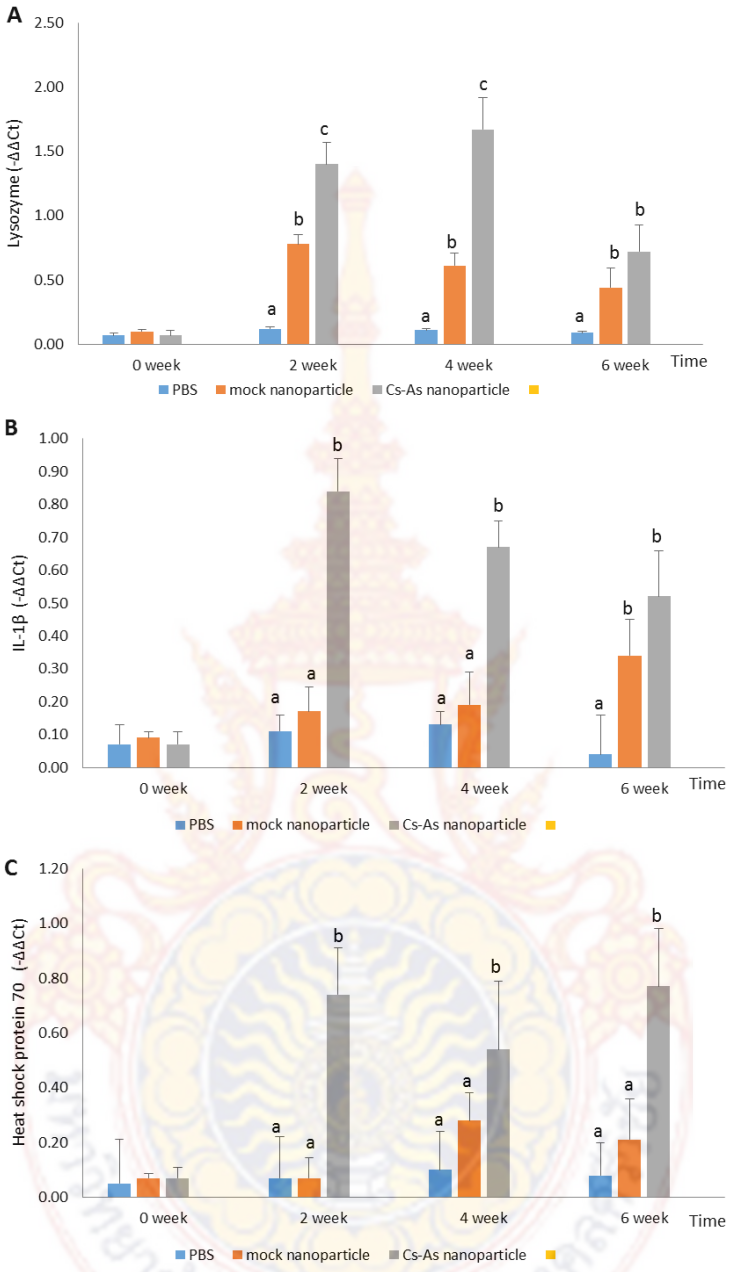
หมายเหตุ ND คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตารางที่ 3.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC)

Name of the potent herbal extract/Antibiotic	MIC	MBC
Cs-E95	0.469 mg/mL	1.875 mg/mL
Cs-W	0.469 mg/mL	0.938 mg/mL
As-E95	1.875 mg/mL	7.50 mg/mL
Iv-E95	7.50 mg/mL	15.00 mg/mL
Iv-W	7.50 mg/mL	15.00 mg/mL
Ag-E95	1.875 mg/mL	7.50 mg/mL

หลังจากนั้นสร้างสูตรผลิตภัณฑ์สมุนไพรผสมเพื่อนำมาพัฒนาเป็นอนุภาค nanoparticle ซึ่งใช้ สารสกัดเอทานอลของฝางและกระเทียมในอัตราส่วน 1:1 มาพัฒนาต่อเป็น crude extracted bio-nanoparticle ด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ/การก่อเกิดเจล (modified emulsification/gelation, O/W) ที่สัดส่วน crude extracted/chitosan/alginate 0.05:0.05:1 w/w

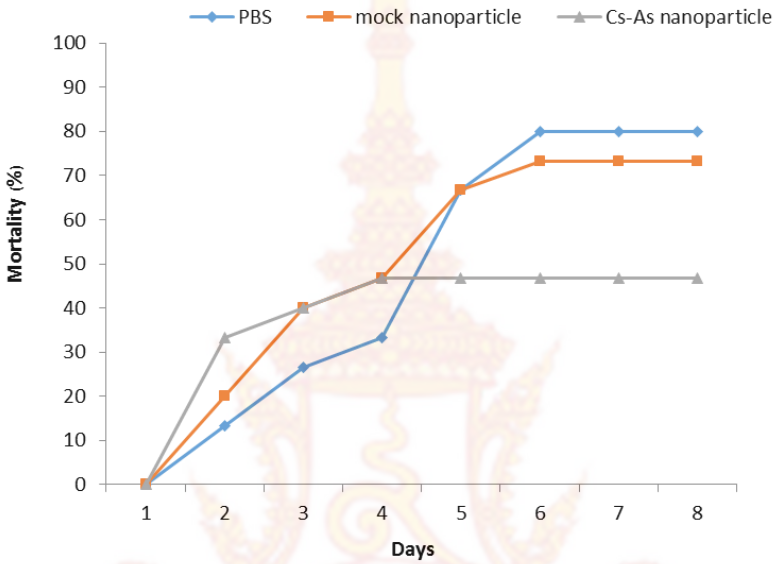
เมื่อทำการศึกษาการตอบสนองของปลานิลต่ออาหารผสม crude extracted bio-nanoparticle ทำโดยการติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล ได้แก่ lysozyme IL-1β และ HSP70 เมื่อปลานิลได้รับ crude extracted bio-nanoparticle เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ (ภาพที่ 3.1) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า crude extracted bio-nanoparticle กระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มก้นอย่างชัดเจน โดยมีการแสดงออกสูงกว่าชุดควบคุม negative control (PBS) และ mock nanoparticle ($P<0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ที่ได้รับ



ภาพที่ 3.1 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ หลังได้รับอาหารผสม crude extracted bio-nanoparticle **(A)** Lysozyme **(B)** IL-1β และ **(C)** Heat shock protein 70 (HSP70) (Data represent mean±SD. Different letters stand for statistically significant differences (*P<0.05*) between groups)

นอกจากการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันในปลานิลแล้ว ยังได้ศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *A. veronii* ซึ่งเป็นเชื้อหลักในการก่อโรค MAS โดยทำการศึกษาอัตราการตายของปลานิลเมื่อได้รับเชื้อ *A. veronii* ภายหลังจากเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสม crude extracted bio-nanoparticle

เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับ crude extracted bio-nanoparticle มีอัตราการตายที่น้อยกว่าปลาที่ได้รับ mock nanoparticle และPBS (ภาพที่ 3.2) อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ crude extracted bio-nanoparticle ผสมอาหารให้ปลานิลกิน พบว่าไม่ส่งผลเสียต่อปลานิลเนื่องจากไม่พบพยาธิสภาพในส่วนตับของปลานิลที่กิน crude extracted bio-nanoparticle เปรียบเทียบกับปลานิลที่กินอาหารปกติ



ภาพที่ 3.2 อัตราการตายของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม crude extracted bio-nanoparticle เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. veronii* สายพันธุ์ต่อต้านยาปฏิชีวนะ

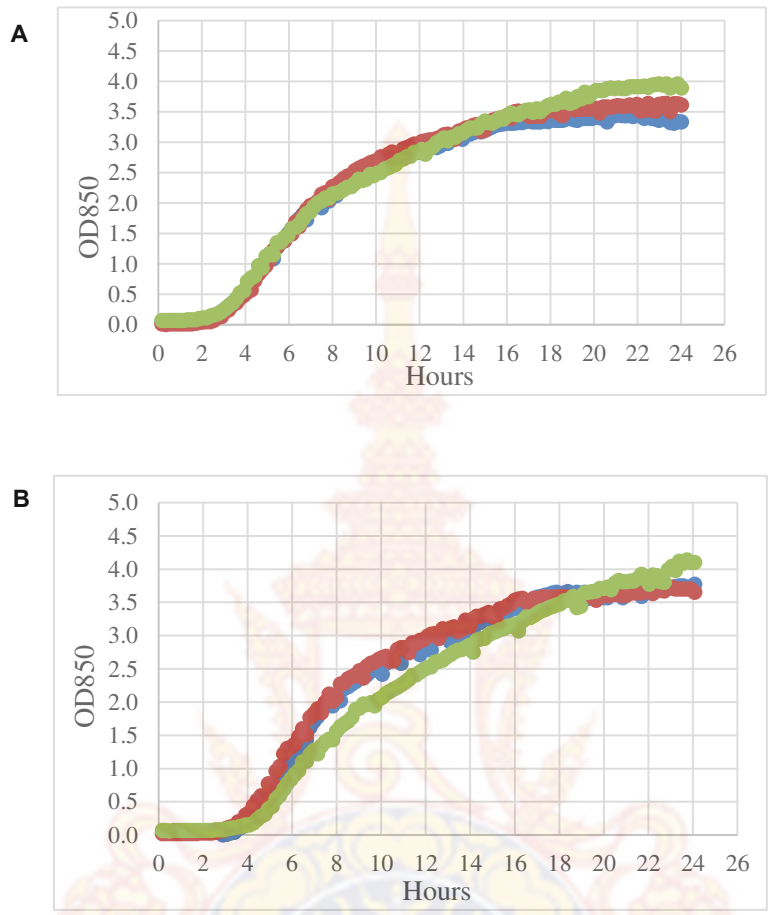
โครงการย่อยที่ 4 เรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์โปรตีนจากน้ำหมัก Biofloc ต่อระบบควอรัมเซนซิง (Quorum sensing) และการแสดงออกของยีนความรุนแรงของเชื้อ *Aeromonas veronii* ที่แยกได้จากปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ในการศึกษาวิจัยนี้ ผลิต Biofloc ด้วยระบบการให้อากาศที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 รูปแบบ ได้แก่ แป้ง 100%, แป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% และ กากน้ำตาล 100% เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8, 12 และ 15 วัน ทำการเก็บแยกส่วนน้ำเลี้ยงหรือน้ำหมัก Biofloc มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry พบว่า โปรตีนในน้ำหมักที่ผลิตด้วยแป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 100% เป็นแหล่งคาร์บอน และ น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้กากน้ำตาล 100% เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่หมักหรือสร้าง Biofloc

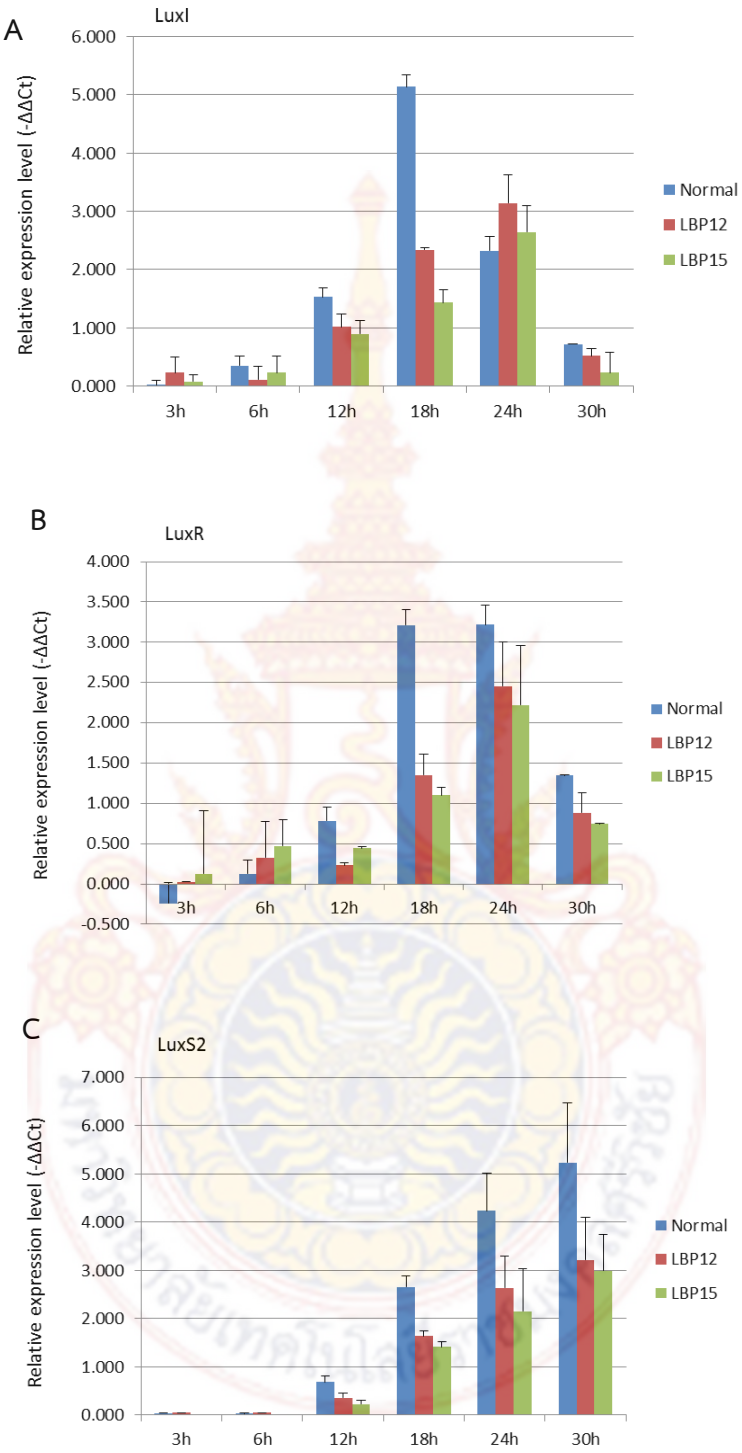
ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยง Biofloc

น้ำหมัก Biofloc	**Code**	**โปรตีน (µg/mL)**
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 100% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 8 วัน	BFC-8d	0.71 ± 0.16
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 100% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 12 วัน	BFC-12d	0.91 ± 0.23
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 100% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 15 วัน	BFC-15d	0.99 ± 0.17
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 8 วัน	BFCM-8d	4.31 ± 0.46
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 12 วัน	BFCM-12d	6.87 ± 0.35
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้แป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 15 วัน	BFCM-15d	9.89 ± 0.28
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้กากน้ำตาล 100% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 8 วัน	BFM-8d	0.45 ± 0.37
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้กากน้ำตาล 100% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 12 วัน	BFM-12d	0.54 ± 0.96
น้ำเลี้ยง Biofloc ที่ใช้กากน้ำตาล 100% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 15 วัน	BFM-15d	0.73 ± 0.34

ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยง Biofloc สามารถทำให้เข้มข้นขึ้นได้ด้วยการทำ lyophilization จึงนำส่วนน้ำเลี้ยง Biofloc ผลิตโดยใช้แป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 12 และ 15 วัน ที่ผ่านการทำ lyophilize (LBP) โดยผสมน้ำเลี้ยง Biofloc ให้มีความเข้มข้น 0%, 2.5% และ 5% ในอาหาร TSB แล้วเลี้ยงเชื้อ *A. veronii* และติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำเลี้ยง Biofloc ที่เวลา 12 และ 15 วัน ให้ผลเหมือนกันที่ความเข้มข้น 2.5% คือ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ให้กราฟการเจริญเติบโตเหมือนที่ 0% (ไม่มีน้ำเลี้ยง Biofloc) ในขณะที่ความเข้มข้น 5% มีความแตกต่างกันโดยน้ำเลี้ยงที่ 12 วันพบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่วงหลังได้เล็กน้อย แต่น้ำเลี้ยงที่ 15 วัน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *A. veronii* ในช่วงแรก (ภาพที่ 4.1) และยังส่งผลต่อการแสดงออกของยีนในระบบควอรัมเซนซิงด้วย (ภาพที่ 4.2)

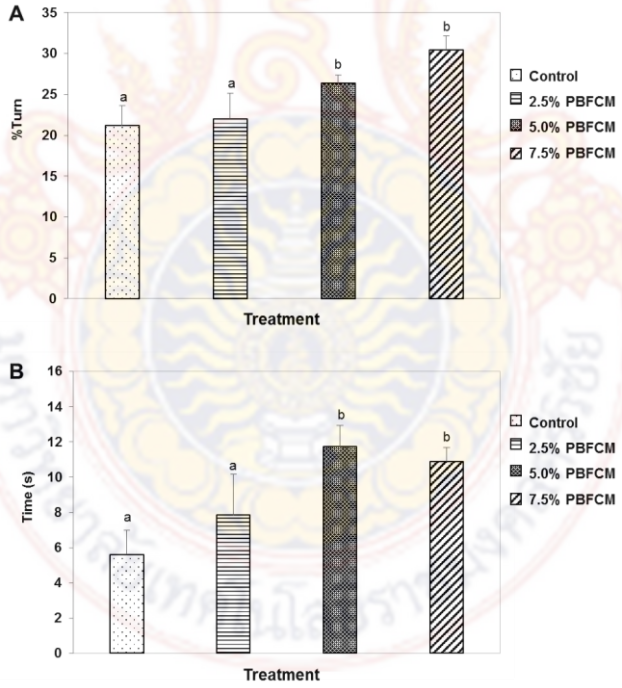


ภาพที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ผสมน้ำเลี้ยง Biofloc ที่ได้จากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น 50% แป้ง + 50% กากน้ำตาล ที่ผ่านการทำ lyophilize **(A)** น้ำเลี้ยง Biofloc 12 วัน และ **(B)** 15 วัน (อาหาร TSB ผสม 0% น้ำเลี้ยง Biofloc, อาหาร TSB ผสม 2.5% น้ำเลี้ยง biofloc และ อาหาร TSB ผสม 5.0% น้ำเลี้ยง Biofloc)

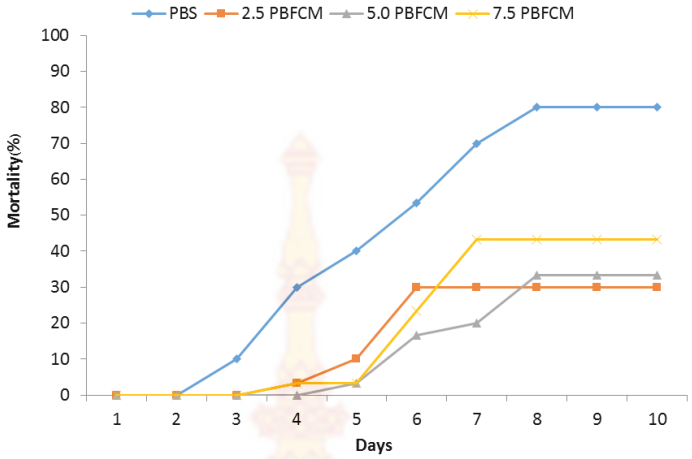


ภาพที่ 4.2 การแสดงออกของยีน quorum sensing ของเชื้อ *A. veronii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโปรตีนจากน้ำเลี้ยง Biofloc ที่เลี้ยงเป็นเวลา 12 และ 15 วัน ที่ความเข้มข้น 5% เปรียบเทียบกับอาหาร TSB **(A)** ยีน LuxI **(B)** ยีน LuxR และ **(C)** ยีน LuxS2

จากประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยง/น้ำหมัก Biofloc ที่แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. veronii* ที่น่าจะผ่านทางการรบกวนหรือยับยั้งระบบควอรัมเซนซิงของเชื้อแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้ยังไม่ค่อยชัดเจนมากนัก ในขณะที่มีการรายงานถึงคุณภาพโปรตีนใน Biofloc ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) และยังถูกใช้เป็นสารกระตุ้นหรือดึงดูดการกินในสัตว์น้ำหลายชนิด คล้ายคลึงกับผลิตภัณฑ์ยีสต์ หรือวัตถุดิบที่ผสมยีสต์ซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งโปรตีน และโพรไบโอติกที่มีศักยภาพในสัตว์รวมถึงสัตว์น้ำหลายชนิด ดังนั้น เพื่อเป็นการเสริมศักยภาพให้กับน้ำหมัก Biofloc และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอล (vinnase) ที่มียีสต์เป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้มีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc โดยได้จากการผสมน้ำเลี้ยง Biofloc ที่ได้จากการศึกษาข้างต้น (การเลี้ยง Biofloc อายุ 15 วัน โดยใช้แป้ง 50% และกากน้ำตาล 50% เป็นแหล่งคาร์บอน) กับของเหลือที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอล แล้วนำมาศึกษาประสิทธิภาพในด้านต่าง ๆ เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ เช่น การยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. veronii* การดึงดูดการกินอาหารในปลานิล และ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันรวมถึงการต้านทานต่อเชื้อ *A. veronii* ในปลานิล ซึ่งพบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc ที่ 7.5% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. veronii* และยังช่วยดึงดูดการกินในปลานิลเพิ่มขึ้นด้วย (ภาพที่ 4.3) และช่วยให้ปลานิลมีความต้านทานต่อเชื้อ *A. veronii* (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 การดึงดูดการกิน (attractability) ในรูปของ **(A)** %Turn และ **(B)** Time (s) ปลานิลที่ทดสอบกับอาหารทดสอบต่าง ๆ ที่มีกากถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc (PBFCM) ความเข้มข้นต่าง ๆ: กากถั่วเหลืองผสม 0% PBFCM (ชุดควบคุม) และกากถั่วเหลืองที่ผสม PBFCM ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5.0% และ 7.5% ค่าที่แสดงคือ mean±SD โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชุดอาหารที่ทดสอบ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.4 อัตราการตายของปลานิลที่กินอาหารผสมผลิตภัณฑ์น้ำหมัก Biofloc ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน แล้วฉีดกระตุ้นด้วยเชื้อ *A. veronii*

การถ่ายทอดองค์ความรู้ และเทคโนโลยีจากงานวิจัยให้แก่เกษตรกร

ชุดโครงการวิจัยเรื่อง อุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค Motile Aeromonas Septicaemia (MAS) และการพัฒนานวัตกรรมเพื่อการควบคุมเชื้อ *Aeromonas* spp. ต่อต้านยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline ในการเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ทางภาคใต้ของไทย ตั้งเป้าหมายในนำองค์ความรู้ และผลการวิจัยที่ได้จากทั้ง 4 โครงการย่อย มาถ่ายทอดองค์ความรู้และเทคโนโลยีให้แก่เกษตรกร ซึ่งได้ดำเนินการในรูปแบบโครงบริการวิชาการแก่สังคม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ในชื่อโครงการ “โครงการการจัดการโรค Motile Aeromonas Septicemia ในปลา” ซึ่งมีเนื้อหาหลัก ได้แก่

1. เรื่องแบคทีเรียต่อต้านยาปฏิชีวนะ และแนวทางป้องกันในการเลี้ยงปลา
2. การเกิดโรค Motile Aeromonas Septicemia (MAS) ของแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ภายใต้สภาวะเครียดของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ
3. เรื่องการใช้สมุนไพรผสมเพื่อควบคุมโรค Motile Aeromonas Septicemia (MAS)
4. การใช้โปรตีนจากน้ำหมัก Biofloc ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

โครงการการจัดการโรค Motile Aeromonas Septicemia ในปลา ดำเนินการเป็นเวลา 3 วัน (วันที่ 2 8 และ 9 สิงหาคม 2563) ณ ชุมชนบ้านวังไทร โดยมีผู้สนใจเข้าร่วมอบรมฯ จำนวนทั้งสิ้น 47 คน

ผลการประเมินโครงการการจัดการโรค Motile Aeromonas Septicemia ในปลา ในด้านต่าง ๆ (จากการทำแบบประเมินของผู้เข้าร่วมโครงการฯ ร้อยละ 89) พบว่า ผู้เข้าร่วมโครงการฯ มีความพึงพอใจ คิดเป็นร้อยละ 96.92 ได้รับความรู้ความเข้าใจคิดเป็นร้อยละ 84.87 และพึงพอใจต่อการนำความรู้และประสบการณ์ไปใช้ประโยชน์ คิดเป็นร้อยละ 95.56

บทที่ 5 สรุปผลที่ได้ในชุดโครงการวิจัย

1. องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับอุบัติการณ์เชิงฤดูกาลของโรค MAS และ เชื้อ *Aeromonas* spp. ในปลานิลที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคใต้ของไทย
2. ข้อมูลสำหรับให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาน้ำจืดในไทยเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรค MAS ที่มีสาเหตุจาก เชื้อ *Aeromonas* spp. โดยเฉพาะเมื่อมีปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโลกที่ส่งผลให้มีการผันแปรของอุณหภูมิ
3. เพิ่มขีดความสามารถในการพึ่งพาตนเองและลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการป้องกันและจัดการโรค MAS ในการเลี้ยงปลานิล โดยมีข้อแนะนำให้เกษตรกรสามารถใช้สารสกัดสุมนไพร และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ น้ำเลี้ยงแบคทีเรีย Biofloc และยีสต์
4. ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ และตีพิมพ์ในรูปแบบของ Proceeding รวมถึงผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ได้แก่
   4.1 U-taynapun, K., Nganwisuthiphan, T. and Chirapongsatonkul, N. 2020. Species diversity and existence of virulence genes in clinical *Aeromonas* spp. causing motile *Aeromonas* septicemia (MAS) isolated from cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Agricultural Technology 16(3): 749–760. (วารสารในระบบฐานข้อมูล SCOPUS และ Scimago®)
   4.2 Chirapongsatonkul, N., Srichanun, M. and U-taynapun, K. 2019. The impact of a mixture of biofloc fermentation medium and vinasse on attractability, palatability, and antibacterial properties against multi-antibiotic resistant *Aeromonas veronii*. International Journal of Agricultural Technology 15(6): 845–858. (วารสารในระบบฐานข้อมูล SCOPUS และ Scimago®)
   4.3 Mueangkan, N., Chirapongsatonkul, N. and U-taynapun, K. 2019. Effect of ethanolic extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) on bactericidal activity against antibiotic-resistant *Aeromonas* spp. isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Proceedings of the 10th Rajamangala University of Technology International Academic Conference. pp. 211–219. 24 – 26 July 2019. Chiang Mai International Exhibition and Convention Center, Chiang Mai, Thailand.
   4.4 U-taynapun, K., Mueangkan, N. and Chirapongsatonkul, N. 2018. Efficacy of herbal extracts to control multi-antibiotics resistant (MAR) *Aeromonas veronii* isolated from motile *Aeromonas* septicemia (MAS)-exhibiting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of

Agricultural Technology 14(7): 2191–2206. (วารสารในระบบฐานข้อมูล SCOPUS และ Scimago®)

4.5 Chirapongsatonkul, N., Srichanun, M. and U-taynapun, K. 2018. Virulence factor gene profiles of *Aeromonas veronii* isolated from diseased Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Nakhon Si Thammarat province and its expression towards diurnal water temperature changes. International Journal of Agricultural Technology 14(7): 1115–1128. (วารสารในระบบฐานข้อมูล SCOPUS และ Scimago®)

5. องค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป ในด้านการพัฒนาศักยภาพและเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทย สิ่งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของทรัพยากรธรรมชาติและถึงความมั่นคงทางอาหารของประเทศไทย

กลุ่มเป้าหมาย 1. นักวิชาการในสาขาจุลชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

2. บุคคลากรในอุตสาหกรรมการผลิตยาและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2555. **รายงานสถานการณ์สินค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์.** ส่วนเศรษฐกิจการประมง, กรมประมง. หน้า 1–6.

วีรวรรณ ลุวีระ. 2549. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. **สงขลานครินทร์เวชสาร**. 5; 543–549.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.L. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215; 403–410.

Aravena-Román, M., Inglis, T.J.J., Henderson, B., Riley, T.V. and Chang, B.J. 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** 56; 1110–1112.

Baliarda, A., Faure, D. and Urdaci, M.C. 2002. Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. **J. Appl. Microbiol.** 92; 510–516.

Cameron, D.R., Howden, B.P. and Peleg, A.Y. 2011. The interface between antibiotic resistance and virulence in *Staphylococcus aureus* and its impact upon clinical outcomes. **Clin Res Infect Dis** 53; 576–582.

Cappuccino, J.G. and Shermn, N. 2008. Microbology: **A Laboraory Manual.** Pearson/Benjamin Cummings, New York 563p.

Chacón, M.R., Soler, L., Groisman, E.A.,Guarro, J. and Figueras, M.J. 2004. Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. **J. Clin. Microbiol.** 42**;** 1285–1287.

Chirapongsatonkul, N., Srichanun, M. and U-taynapun, K. 2018. Virulence factor gene profiles of *Aeromonas veronii* isolated from diseased Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Nakhon Si Thammarat province and its expression towards diurnal water temperature changes**. International Journal of Agricultural Technology** 14(7): 1115–1128.

Chenia, H.Y. 2016. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from South African freshwater fish. **Int. J. Food Microbiol.** 231; 26–32.

Dias, C., Mota, V., Martinez-Murcia, A. and Saavedra, M.J. 2012. Antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish. **J Aquac Res Dev** 3; 131. doi:10.4172/2155-9546.1000131.

Fiala, I. and Dyková, I. 2004. The phylogeny of marine and freshwater species of the genus *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxosporea: Bivalvulida) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Folia Parasitol.** 51; 211–214.

Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T. and Ohta, M. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** 69; 5336–5342.

Ghatak, S., Agarwal, R.K. and Bhilegaonkar, K.N. 2007. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Lett. Appl. Microbiol.** 44; 550–554.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.** 33; 1870–1874.

Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R. and Pinto, I.S., 2006. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Potugal. **Aquaculture** 252; 31–42.

Molnár, K., Marton, S., Eszterbauer, E., Székely, C. 2006. Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. infecting chub from the river Danube, Hungary, and description of *M. muellericus* sp. n. **Dis. Aquat. Organ** 73; 49–61.

Nawaz, M., Khan, S.A., Khan, A.A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K. and Steele, R. 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. **Food Microbiol.** 27; 327–331.

Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M. and Mulvey, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Mol. Cell Probes.** 15; 209–215.

Rzewuska, M., Czopowicz, M., Gawryś, M., Markowska-Daniel, I. and Bielecki, W. 2016. Relationships between antimicrobial resistance, distribution of virulence factor genes and the origin of *Trueperella pyogenes* isolated from domestic animals and European bison (*Bison bonasus*). **Microb. Pathog.** 96; 35–41.

Sen K. and Rodgers, M. 2004. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from U.S. drinking water utilities: A PCR identification. **J. Appl. Microbiol.** 97; 1077–1086.

Subasinghe, R.P. 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Prev. Vet. Med.** 67: 117–124.

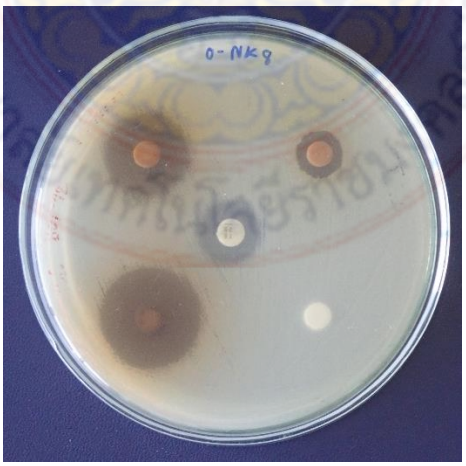
Qiang, J., He, J., Yang, H. *et al.* 2016. The changes in cortisol and expression of immune genes of GIFT tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) at different rearing densities under *Streptococcus iniae* infection. **Aquacult Int** 24; 1365–1378.

ภาคผนวก

ภาพประกอบโครงการ/กิจกรรมการอบรมเชิงปฏิบัติการ

“โครงการการจัดการโรค Motile Aeromonas Septicemia ในปลา”

ณ ชุมชนบ้านวังไทร อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช วันที่ 2 8 และ 9 สิงหาคม 2563


0-NK9