

การดื้อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า ที่แยกได้จากปลานิล

Resistance to antibiotics and heavy metals of *Aeromonas hydrophila* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ศรายุทธ นามพุธา ปิยวัฒน์ สายพันธ์ุ*

Sarayoot Namputta, Piyawat Saipan*

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

*Corresponding author: psaipan@yahoo.com

Received: 22 September 2017; Revised: 17 October 2017; Accepted: 17 October 2017; Available online: 1 December 2017

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการดื้อยาปฏิชีวนะ 14 ชนิดและโลหะหนัก 5 ชนิด ของเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่าที่แยกได้จากปลานิล โดยเก็บตัวอย่างปลานิลทั้งหมด 290 ตัวอย่างจากตลาดในจังหวัดขอนแก่นแล้วนำไปแยกหาเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่าได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต (17.24%) จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion test และทดสอบการทนต่อโลหะหนัก ด้วยวิธี agar dilution test ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า ร้อยละ 100 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin แต่เชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline และ chloramphenicol นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสามารถดื้อยาปฏิชีวนะชนิด nalidixic acid (10%), trimethoprim (4%), erythromycin (2%) และ polymyxin B (2%) ส่วนผลการทดสอบการทนต่อโลหะหนักพบว่าเชื้อทนทานต่อโลหะหนักที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 – 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยเชื้อทนทานต่อปรอท สังกะสี และสารหนู ได้ร้อยละ 100, 6 และ 4 ตามลำดับ และพบว่าเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin จะดื้อต่อโลหะหนักชนิดปรอทรวมกันได้ การศึกษาการต้านทานโลหะหนักของแบคทีเรียและการดื้อยาปฏิชีวนะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อช่วยบำบัดโลหะหนักตกค้างในสิ่งแวดล้อมและใช้เป็นข้อมูลการเฝ้าระวังการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกันได้อีกทางด้วย

คำสำคัญ: ยาปฏิชีวนะ; โลหะหนัก; แอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า; ปลานิล; การดื้อ

©2017 Sakon Nakhon Rajabhat University reserved

Abstract

The objective of this study was to evaluate resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from Nile tilapia to 14 antibiotics and 5 heavy metals. Two hundred and ninety samples of Nile tilapia were purchased from local market in Khon Kaen province and isolated for *Aeromonas hydrophila*. It was found that the 50 isolates of this bacteria (17.24%), then the bacterial isolates were tested for antibiotic resistance by disk diffusion method to antibiotics while heavy metals were tested by agar dilution method. The result showed that all the isolate samples were completely resistant to vancomycin, novobiocin and bacitracin but susceptible to gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline and chloramphenicol. A low percentage of *Aeromonas hydrophila* isolates were resistant to nalidixic acid (10%), trimethoprim (4%), erythromycin (2%) and polymyxin B (2%). In the present study, resistance to heavy metals with ranged of concentrations of 50 – 1,600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was as follows: mercury, 100%; zinc, 6% and arsenic, 4% and the isolates which were mercury resistance also showed resistance to vancomycin, novobiocin and bacitracin. Information of heavy metal and antibiotics resistant can be used to selected bacteria strain for cleaning up heavy metals from contaminated environment and for planning of antibiotics resistant surveillance.

Keywords: Antibiotic; Heavy metal; *Aeromonas hydrophila*; Nile tilapia; Resistance

1. บทนำ

แอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า (*Aeromonas hydrophila*; *A. hydrophila*) เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบตรวจพบเชื้อได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งแหล่งน้ำและดิน โดยสามารถแยกเชื้อ *A. hydrophila* จากสัตว์น้ำจืดได้ในอัตราน้อยกว่าร้อยละ 10 – 70 [1, 2] และเป็นเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญชนิดหนึ่งในปัจจุบัน ดังนั้นเกษตรกรจึงป้องกันหรือรักษาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น oxytetracycline, tetracycline, oxolinic acid, nalidixic acid และ sulfadimethoxin-ormethoprim โดยมีคำแนะนำให้หยุดการใช้ยาอย่างน้อย 21 วันก่อนจับสัตว์น้ำจำหน่าย เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำตกค้างในสัตว์น้ำก่อนที่มนุษย์จะนำไปบริโภค การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม เช่น ใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้เป็นเวลานานเกินไป อาจส่งผลให้เกิดการดื้อยา ซึ่งมีรายงานการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *A. hydrophila* หลายรายงานแตกต่างกันออกไปตามสภาพของปัญหาในแต่ละท้องถิ่นตั้งแต่ไม่พบการดื้อยาจนถึงดื้อยาร้อยละ 100 ของเชื้อที่นำมาทดสอบ [3 – 8] ปัจจุบันประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ คือ oxytetracycline, sulfadimethoxin-trimethoprim, enrofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim และ neomycin เป็นต้น อย่างไรก็ตามอาจตรวจพบยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ตกค้างในสัตว์น้ำได้ จากการที่เกษตรกรลักลอบใช้ยาปฏิชีวนะนอกเหนือที่กำหนดหรือการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำจากของเสียที่มียาปฏิชีวนะตกค้างจากทั้งสัตว์เลี้ยงชนิดอื่น ๆ หรือยาปฏิชีวนะที่ใช้ในมนุษย์

การปนเปื้อนของโลหะหนักในสัตว์น้ำส่วนใหญ่เนื่องจากการสัมผัสดิน น้ำ และอาหารที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การปล่อยของเสียหรือกากอุตสาหกรรม การใช้สารเคมีหรือวัสดุอุปกรณ์ที่มีส่วนประกอบของโลหะหนัก แล้วปล่อยออกสู่ธรรมชาติโดยไม่ถูกวิธี เช่น สารหนู แคดเมียม โปรท ตะกั่ว แคดเมียม โครเมียม ทองแดง โปรท นิกเกิล และสังกะสี เป็นต้น ภาวะมลพิษทางน้ำและดินมีผลต่ออัตราการเจริญและเป็นสภาวะที่กีดกันจุลินทรีย์ในน้ำให้ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นโดยการปรับตัวด้านสรีรวิทยาและพันธุกรรมของแบคทีเรีย [9] เป็นสาเหตุให้แบคทีเรียบางชนิดต้องปรับตัวเพื่อให้ทนทานหรือการดื้อต่อโลหะหนักและ

ยาปฏิชีวนะที่มีปริมาณสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้น ในขณะที่เดียวกันการทนทานต่อโลหะหนักอาจทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้เร็วขึ้น เนื่องจากกลไกการดื้อมีความคล้ายคลึงกัน กลไกการต้านทานยาปฏิชีวนะและโลหะหนักร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ คือ co-resistance, cross resistance และ co-regulation โดย co-resistance เกิดขึ้นได้เมื่อสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการดื้ออยู่ในตำแหน่งเดียวกัน เช่น ใน plasmid, transposon หรือ integron เช่น แบคทีเรียโคลิฟอร์มที่สามารถต้านทานโลหะหนักชนิดนิกเกิลและโครเมียมจะสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะชนิด gentamicin, polymyxin, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline, bacitracin และ streptomycin โดยใช้กลไกนี้ ส่วน cross-resistance เป็นกลไกที่เกิดขึ้นผ่านสารพันธุกรรมเดียวกันที่มีผลตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักคล้ายคลึงกันหรือมีเป้าหมายการออกฤทธิ์เดียวกัน เช่น การต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด ในเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยพบว่าสามารถขับโลหะหนักออกจากเซลล์ควบคู่กับยาปฏิชีวนะได้ด้วย และ co-regulation เป็นการทำงานร่วมกันระหว่างตัวควบคุมการแสดงออกของยีน ที่เกิดขึ้นในช่วงที่เชื้อแบคทีเรียทำการถอดรหัส และแปลรหัสพันธุกรรมเพื่อตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะหรือโลหะหนัก ทำให้ยีนทำงานประสานกัน เช่น การต้านทานต่อสังกะสี แคดเมียม โคบอล ร่วมกับยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenem ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* [8, 10 – 12] การทดสอบการต้านทานโลหะหนักโดยทางอ้อมเป็นการวัดจากความสัมพันธ์ของการต้านทานของแบคทีเรียและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของโลหะหนัก การศึกษาการต้านทานโลหะหนักในลักษณะนี้นิยมใช้ 3 วิธี คือ Agar dilution, Continuous culture และ Agar diffusion method [5, 6, 11] Nguyen และคณะ [13] ศึกษาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อซูโดโมแนสและแอโรโมแนสในปลาตุ๊กตาของประเทศไทย พบว่า เชื้อมีอัตราการดื้อยาชนิด ampicillin, trimethoprim, chloramphenicol และ nalidixic acid เฉลี่ยร้อยละ 61.92 – 96.60 จากนั้น Wei และคณะ [5] ศึกษาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของเชื้อแอโรโมแนสที่แยกได้จากปลาไนล์แดงในประเทศมาเลเซีย พบว่า เชื้อแอโรโมแนสสามารถทนต่อ oxolinic acid (9.30%), sulfonamide (10.70%), doxycycline (5.10%), tetracycline (6.10%), novobiocin (44%), chloramphenicol (17.55%), sulfamethoxazole (58.50%), erythromycin (12.20%), ampicillin (56.70%), spiramycin (24.90%), amoxicillin (36.80%) และ fosfomycin (25.15%) นอกจากนี้เชื้อแอโรโมแนสยังทนต่อโครเมียม (35.80%) สังกะสี (5.50%) ทองแดง (25%) และปรอท (30%) สอดคล้องกับ Amsaveni และคณะ [14] ที่ศึกษาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของเชื้อแอโรโมแนสที่แยกได้จากปลาไต้ปลา พบว่า เชื้อแอโรโมแนสที่แยกได้จากปลาไต้ปลาสามารถทนต่อเงิน (11%) และทองแดง (26%) ได้ด้วย การดื้อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กลไกร่วมกันก่อให้เกิดความกังวลในบางประเด็นด้านการส่งเสริมให้เชื่อมีความไวต่อการดื้อยาปฏิชีวนะมากยิ่งขึ้น ประกอบกับสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนักที่มีเพิ่มสูงขึ้นจากการขยายตัวของชุมชนและอุตสาหกรรม จากการทบทวนงานวิจัยพบว่าสถานการณ์การดื้อต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักเป็นสิ่งที่ควรเฝ้าระวังและทำการศึกษาอย่างจริงจังในแต่ละประเทศเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและทราบสถานการณ์ที่เกิดขึ้นเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษาต่อยอดในเชิงลึก อย่างไรก็ตามการศึกษาในลักษณะดังกล่าวข้างต้นยังไม่มียางานการศึกษามากนักในประเทศไทย จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาไนล์ที่ตายแล้วจากแหล่งจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นทั้งหมด 290 ตัวอย่าง เพื่อนำมาเพาะแยกหาเชื้อ *A. hydrophila*

การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

ใช้สำลีสัมผัสผ่านกระดาษเชื้อแล้วนำไปป้ายบริเวณ ผิวหนัง เหงือก ตา และสมอง หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar และ Macconky agar (Himedia, India) การเพาะแยกเชื้อ *A. hydrophila* โดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนี การย้อมแกรม

และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีอ้างอิง Quimn และคณะ [15] การศึกษานี้ใช้เชื้อมาตรฐานสายพันธุ์ *A. hydrophila* ATCC 35654 เพื่อควบคุมการทดลองและควบคุมคุณภาพของการศึกษา

การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. hydrophila* ทดสอบด้วยวิธี disk diffusion method โดยเลือกเชื้อ *A. hydrophila* ที่ต้องการทดสอบ 2 - 3 โคโลนีใส่ลงในนอร์มอลซาไลน์ (โซเดียมคลอไรด์ 0.85%) เพื่อปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ McFarland No. 0.50 (10^8 cfu mL⁻¹) จากนั้นใช้สำลีพันก้านป้ายเชื้อแล้วนำไปวาดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (Himedia, India) จึงวางแผ่นยาปฏิชีวนะทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ bacitracin 10 unit, chloramphenicol 30 µg, erythromycin 15 µg, gentamycin 10 µg, kanamycin 30 µg, nalidixic acid 30 µg, neomycin 30 µg, novobiocin 30 µg, polymyxin-B 300 µg, rifampicin 5 µg, streptomycin 10 µg, tetracycline 30 µg, trimethoprim 30 µg และ vancomycin 30 µg วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง วัดและแปลผลการดื้อยาปฏิชีวนะจากการอ่านค่าเส้นผ่าศูนย์กลางที่เชื้อยับยั้งยาปฏิชีวนะได้ (the diameter of the inhibition zones) เปรียบเทียบกับค่าที่กำหนดในคู่มือมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต (Himedia Laboratories, India)

การทดสอบความต้านทานต่อโลหะหนัก

การทดสอบการต้านทานของเชื้อต่อโลหะหนักตามวิธีของ Akinbowale และคณะ [6] โดยทดสอบกับโลหะหนักจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ แคดเมียมคลอไรด์ (CdCl₂) เลดไนเตรต [Pb(NO₃)₂] ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl₂) แมร์คิวรีคลอไรด์ (HgCl₂) และโซเดียมอาร์เซไนต์ (NaAsO₂) (Merck) ด้วยวิธีการ Agar dilution test ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1,600 และ 3,200 µg mL⁻¹ ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar แล้วเลือกเชื้อ *A. hydrophila* ที่ต้องการทดสอบ 2 - 3 โคโลนีใส่ลง 0.85% นอร์มอลซาไลน์เพื่อปรับค่า 0.50 McFarland (10^8 cfu mL⁻¹) หลังจากนั้นนำเชื้อที่นำไปเพาะแล้วหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาณ 2 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยเทียบกับค่าอ้างอิงในรายงานของ Akinbowale และคณะ [6] ซึ่งความเข้มข้นของโลหะหนักที่เชื้อเชื้อ *A. hydrophila* ดังนี้ สารหนู ปรอท ตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียม คือ มีค่ามากกว่าความเข้มข้น 400, 50, 1,600, 200 และ 100 µg mL⁻¹ ตามลำดับ การวิเคราะห์ข้อมูลอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักด้วยสถิติเชิงพรรณนา

3. ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

ตัวอย่างปลานิลทั้งหมด 290 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *A. hydrophila* ได้จำนวน 50 ไอโซเลต หรือคิดเป็นร้อยละ 17.24 สอดคล้องกับการศึกษาของ Abd-El-Malek [1] รายงานว่าแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. จากปลานิลที่จำหน่ายในประเทศอียิปต์ได้ร้อยละ 36 โดยในจำนวน 125 ตัวอย่างปลานิลที่ใช้เป็นตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อเป็นชนิด *A. hydrophila* จำนวน 22 เชื้อ (ร้อยละ 17.60) ข้อมูลการศึกษาในประเทศอินเดียโดย Praveen และคณะ [2] พบว่าตัวอย่างปลาจำนวน 382 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Aeromonas* spp. จำนวน 40 ไอโซเลต (10.47%) โดยแยกเป็นชนิด *A. hydrophila* ได้ร้อยละ 66.60 และมีรายงานการศึกษาการแยกเชื้อ *Aeromonas* spp. จากสัตว์น้ำจืดได้ในอัตราที่สูงตั้งแต่ร้อยละ 30 - 100 [2 - 6] ความแตกต่างของอุบัติการณ์การตรวจพบเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลหรือสัตว์น้ำจืดมีความแตกต่างกันตามความรุนแรงของเชื้อในแหล่งน้ำหรือสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์มและการใช้ยา เป็นต้น ผลการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลานิล พบว่า *A. hydrophila* ร้อยละ 100 ดื้อยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin แต่เชื้อชนิดนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline และ chloramphenicol นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะชนิด nalidixic acid (10%), trimethoprim (4%), erythromycin (2%) และ polymyxin B (2%) (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในประเทศไทยจากรายงานของ Lukkana และคณะ [16] ที่ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะของ *A. hydrophila* จำนวน 50 เชื้อที่แยกได้จากปลานิลในเขตภาค

กลางของประเทศไทย พบว่า เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด streptomycin (92%), trimethoprim (88%), amoxicillin (86%), carbenicillin (84%), sulphamethoxazole (62%) ciprofloxacin (34%), enrofloxacin (32%), kanamycin (22%), minocycline (2%), oxytetracycline (34%) และ tetracycline (36%) แต่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด gentamicin, chloramphenicol และ cefoperazone ซึ่งมีบางส่วนที่สอดคล้องกับการศึกษารังนี้โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะชนิด gentamicin และ chloramphenicol ที่ยังมีความไวต่อการใช้กับเชื้อ *A. hydrophila* ต่อมา Petersen และ Dalgaard [17] ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงปลาของประเทศไทยในเขตจังหวัดสุพรรณบุรี พบว่า ร้อยละ 8 ของเชื้อ *A. hydrophila* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด chloramphenicol และโดยเฉลี่ยเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ศึกษาจำนวน 6 ชนิด ประมาณร้อยละ 20 ส่วนผลการศึกษาในต่างประเทศพบว่ามีความแตกต่างกันตามสภาพปัญหาในแต่ละประเทศ Laith และ Najiah [8] ทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะในปลาที่ประเทศมาเลเซีย พบว่า ร้อยละ 100 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ร้อยละ 90.90 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด colistin sulphat ร้อยละ 27.27 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด nitro furantoin แต่เชื้อมีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด tetracycline (100%) และ novobiocin (90.90%), florfenicol (90.90%) Saidi และคณะ [21] ศึกษาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักในเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จาก แหล่งน้ำเสีย อ่าว ชายฝั่งทะเล และจากปลาในประเทศอินเดีย พบว่า เชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำเสียและอ่าวสามารถทนต่อ nalidixic acid (70% และ 60%) และ tetracycline (60% และ 50%) ตามลำดับ โดยเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลาสามารถทนต่อ nalidixic acid ได้ร้อยละ 66.60 จากรายงานของ Vivekanandhan และคณะ [18] พบว่าร้อยละ 39 ของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกจากตัวอย่างปลาและกุ้งที่เก็บตัวอย่างจากตลาดในประเทศอินเดีย แล้วนำไปทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 15 ชนิด พบว่า มากกว่าร้อยละ 95 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด bacitracin, erythromycin, neomycin, novobiocin, polymyxin-B และ rifampin และมีเชื้ออีกเล็กน้อยที่สามารถต้านทานต่อ chloramphenicol (3.70%), gentamicin (7.50%), streptomycin (8.70%) และ nalidixic acid (16.90%) อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น คุณสมบัติของเชื้อ ความรุนแรงของขนาดปัญหาเชื้อที่สะสมในสิ่งแวดล้อม สภาพแวดล้อมการจัดการฟาร์มและการใช้ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อ *A. hydrophila* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ชนิดยาปฏิชีวนะ	จำนวนเชื้อที่ดื้อยา (n = 50)	ร้อยละของการดื้อยา
Vancomycin (15 µg)	50	100
Kanamycin (30 µg)	0	0
Erythromycin (15 µg)	1	2
Gentamicin (10 µg)	0	0
Neomycin (30 µg)	0	0
Trimethoprim (5 µg)	2	4
Polymyxin B (300 µg)	1	2
Novobiocin (30 µg)	50	100
Nalidixic acid (30 µg)	5	10
Streptomycin (10 µg)	0	0
Bacitracin (10 unit)	50	100
Tetracycline (30 µg)	0	0
Rifampin (5 µg)	15	30
Chloramphenicol (30 µg)	0	0

ผลการศึกษาการทนต่อโลหะหนักของเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลาไนล์ พบว่า เชื้อสามารถทนต่อโลหะหนักได้ในช่วงความเข้มข้นที่ต่างกันโดยมีค่า MICs อยู่ในช่วงระหว่าง 50 – 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และพบว่ามีความต้านทานได้แก่ปรอท > สังกะสี > สารหนู > ตะกั่ว = แคดเมียม โดยเชื้อสามารถดื้อต่อสารหนู สังกะสีและปรอท ร้อยละ 4, 6 และ 100 ตามลำดับ แต่เชื้อทั้งหมดไม่สามารถทนทานต่อตะกั่วและแคดเมียม (ตารางที่ 2) จากผลการศึกษาของ Akinbowale และคณะ [6] พบว่า เชื้อ *A. hydrophila* สามารถทนต่อแคดเมียม (9.10%) ตะกั่ว (100%) และ สังกะสี (81.80%) ได้ ส่วน Matyar และคณะ [10] ทดสอบการทนต่อโลหะหนักของเชื้อ *A. hydrophila* พบว่า ร้อยละ 35 ทนทานต่อแคดเมียมและสังกะสี และร้อยละ 1.70 สามารถทนต่อตะกั่วได้ ต่อมา Wei และคณะ [5] รายงานว่าเชื้อที่แยกได้จากปลาไนล์แดงที่เป็นโรคในประเทศมาเลเซียสามารถทนทานต่อโลหะหนักชนิดสังกะสี (5.50%) และปรอท (30%) Akinbowale และคณะ [6] ศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะและการต้านทานโลหะหนักของเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาเรนโบว์เทราต์ พบว่า เชื้อต้านทานต่อโลหะหนักได้ 7 ชนิดโดยมีช่วงค่า MICs ตั้งแต่น้อยกว่า 6.25 ถึง 3,200 ไมโครกรัม/มิลลิตร โดยเชื้อสามารถทนทานต่อโลหะหนักชนิดแคดเมียม > คอปเปอร์ > ตะกั่ว > แมงกานีส > โคโรเนียม Saidi และคณะ [19] รายงานว่าเชื้อ *A. hydrophila* ทนทานต่อโลหะหนักจากมากไปน้อย ดังนี้ ปรอท > สารหนู > โคโรเนียม > แคดเมียม > เหล็ก > ตะกั่ว > นิกเกิล > สังกะสี > แมงกานีส ส่วนผลการศึกษาพบว่าเชื้อทนทานต่อโลหะหนัก คือ ปรอท > สังกะสี > สารหนู > ตะกั่ว = แคดเมียม ซึ่งความแตกต่างของผลการศึกษาขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนักและปัจจัยพื้นฐานการปนเปื้อนของโลหะหนักในแต่ละแหล่งการเก็บตัวอย่างที่เชื้อได้รับไว้ในตัวเชื้อแล้ว ความสัมพันธ์ระหว่างการทนทานต่อโลหะหนักและการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *A. hydrophila* จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เชื้อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักแตกต่างกัน แต่เชื้อทั้งหมดสามารถต้านทานต่อปรอทร่วมกับยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อบางส่วนที่สามารถทนต่อสารหนูหรือสังกะสีได้จะสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด trimethoprim, polymyxin B และ rifampicin ได้ด้วย ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลการทนต่อโลหะหนักและการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกันของเชื้อ *A. hydrophila*

ตารางที่ 2 การทนทานต่อโลหะหนักของเชื้อ *A. hydrophila*

ชนิดของโลหะหนัก	ความเข้มข้นของโลหะหนัก ($\mu\text{g mL}^{-1}$) และจำนวนไอโซเลต (n=50)								จำนวนไอโซเลตที่ทนทานต่อโลหะหนัก	
	25	50	100	200	400	800	1,600	3,200	จำนวน	ร้อยละ
สารหนู			12	36	*	2			2	4
ปรอท		*	2	44	2	2			50	100
ตะกั่ว							50*		0	0
สังกะสี				47*	3				3	6
แคดเมียม		22	28*						0	0

* คือค่าอ้างอิงปริมาณต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration, MICs)

ตารางที่ 3 ชนิดยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ดื้อร่วมกันของเชื้อ *A. hydrophila*

หมายเลขของตัวอย่างเชื้อ	ชนิดยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ดื้อร่วมกัน*
3,4,5,7,8 9,10,13,14,15,16,19,20,23,26,27,31,	Hg, va ,nv ,b
1	Hg, e, va ,nv, b
11,12,17,21,22,25,28,29,30,41,49	Hg, va, nv, b, rd
24,36	Hg, va, nv, na, b
2,18	Hg, Zn, va, nv, b
46	Hg, Zn, va, ti, nv, b, ri
6	Hg, As, va ,ti, pb, nv, b, ri
44	Hg, As, va, nv, b, ri

*Hg =ปรอท, As = สารหนู, Zn = สังกะสี, va = Vancomycin , ti = Trimethoprim, pb = Polymyxin B, nv = Novobiocin, b = Bacitracin และ ri = Rifampicin

Miranda และ Castillo [20] รายงานว่าพบเชื้อ *A. hydrophila* ที่ทนต่อปรอทจะแสดงลักษณะดื้อยาปฏิชีวนะชนิด chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazol ในขณะที่ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อที่ทนทานต่อปรอทจะดื้อยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin จากรายงานของ Matyar และคณะ [21] พบว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทนต่อโลหะหนักจะสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิด streptomycin, ampicillin และ trimethoprim-sulphamethoxazole อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างรายวิจัยอื่น ๆ แบบโดยตรงทำได้ยากเนื่องจากมีความแตกต่างกันของการทดลองโดยเฉพาะความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและโลหะหนักที่ใช้ในการทดลอง แต่มีผลสรุปที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือเชื้อแบคทีเรียสามารถดื้อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักร่วมกันได้ บางรายงานจึงแนะนำให้หาแบคทีเรียที่ทนทานต่อโลหะหนักไปบำบัดแหล่งน้ำที่มีโลหะหนักสะสมตกค้างเพื่อเป็นการช่วยบำบัดน้ำเสียอีกวิธีหนึ่งได้ ในขณะที่ด้านอีกด้านหนึ่งมีความกังวลเกี่ยวกับการที่เชื้อแบคทีเรียใช้กลไกการดื้อร่วมกันกับโลหะหนักอาจจะส่งผลให้เชื้อมีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นจนขนาดยาที่แนะนำให้ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคไม่ได้ผล ทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณสูงขึ้นจนนำไปสู่การที่เชื้อพัฒนาตนเองให้มีความทนทานเพิ่มตามขึ้นไปด้วย รวมทั้งการเกิดการดื้อข้ามสายพันธุ์หรือการดื้อยาปฏิชีวนะข้ามมายังมนุษย์

4. สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าเชื้อ *A. hydrophila* ที่คัดแยกได้จากปลานิลในจังหวัดขอนแก่น ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin ร้อยละ 100 จึงไม่เหมาะนำมาใช้ในการป้องกันหรือรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในปลานิล ส่วนยาปฏิชีวนะชนิดที่ความไวหรือใช้ได้ผล คือ gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tetracycline และ chloramphenicol ส่วนผลการทดสอบการทนต่อโลหะหนัก พบว่า เชื้อทนทานต่อปรอท สังกะสี และสารหนู และพบว่าเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะชนิด vancomycin, novobiocin และ bacitracin จะดื้อต่อโลหะหนักชนิดปรอทร่วมกันได้ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลานิลในประเทศไทยสามารถตรวจพบการดื้อยาปฏิชีวนะร่วมกับการทนทานโลหะหนักได้

5. ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการดื้อต่อโลหะหนักและยาปฏิชีวนะพบได้ในเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงควรศึกษาวิจัยและเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง โดยพิจารณาศึกษาในลักษณะเชิงพื้นที่ที่มีอุตสาหกรรมที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม เพื่อสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ทนทานต่อโลหะหนักนำไปใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งหรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมนั้นได้อย่าง

สอดคล้องกับสถานการณ์เชิงพื้นที่ และควรเป็นการศึกษาวิจัยที่ลึกซึ้งถึงระดับพันธุกรรมของการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในเชิงเปรียบเทียบอัตราการดื้อยาของเชื้อระหว่างแหล่งตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักที่แตกต่างกัน รวมทั้งพิจารณาศึกษาเชื้อที่มีศักยภาพในการติดต่อสู่มนุษย์ได้

6. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนวิจัยจากกลุ่มวิจัยด้านสารพิษในปศุสัตว์และสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ และทุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

7. References

- [1] A.M. Abd-El-Malek, Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish, Vet. World. 10 (2017) 34 – 37.
- [2] P.K. Praveen, C. Debnath, S. Shekhar, N. Dalai, S. Gangul, Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review, Vet. World. 9 (2016) 6 – 11.
- [3] O.A. Odeyemi, A. Ahmad, Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources, Saudi J. Biol. Sci. 24 (2017) 65 – 70.
- [4] I.H. Igbinos, A. Beshiru, E.E. Odjadjare, C.N. Ateba, E.O. Igbinos, Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments, Micro. Pathogen. 107 (2017) 185 – 192.
- [5] L.S. Wei, M.T. Mustakim, N.I. Azalina, A.K. Zulhisyam, M.N. Anamt, W. Wee, N.M. Huang, Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas* spp. isolated from diseased red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*), Ann. Res. Rev. Biol. 6(4) (2015) 264 – 269.
- [6] O.L. Akinbowale, H. Peng, P. Grant, M.D. Barton, Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia, Inter. J. Food Microbiol. 76 (2002) 165 – 168.
- [7] A. Kimiran-Erdem, E.O. Arslan-Aydogdu, S. Gurun, O. Altun, Determination of multiple antibiotic and heavy metal resistance of the bacteria isolated from the kucekmece lagoon, Turkey, Pol. J. Environ. Stud. 24(3) (2015) 1077 – 1084.
- [8] A.R. Laith, M. Najiah, *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), J. Aquac. Res. Development. 5(2) (2013) 115 – 121.
- [9] V. McArthur, R. Tuckfield, Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects in industrial pollution, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 3722 – 3726.
- [10] F. Matyar, T. Akkan, Y. Ucak, B. Eraslan, *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea, Environ. Monit. Assess. 167 (2010) 309 – 320.
- [11] C.B. Austin, M.S. Wright, R. Stepanauskas, J.V. McArthur, Co-selection of antibiotic and metal resistance, Trends Microbiol. 14(4) (2006) 176 – 182.
- [12] K. Perron, O. Caille, C. Rossier, D. Christian, J.L. Dumas, T. Kohler, CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 8761– 8768.

- [13] H.N.K. Nguyen, T.T.H. Van, H.T. Nguyen, P.M. Smooker, J. Shimeta, P.J. Coloe, Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam, *Vet. Microbiol.* 171 (2014) 397 – 405.
- [14] R. Amsaveni, M. Sureshkumar, J. Reshma, J. Mary, U. Indra, G. Vivekanandhan, Screening of multi-drug and metal resistant *Aeromonas* species from diverse sources, *Am. J. Infect. Dis.* 11(2) (2015) 41 – 47.
- [15] P.J. Quimn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter, *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Vibrio* species. *Clinical Veterinary Microbiology*, first ed., Elsevier limited, Barcelona. 1990.
- [16] M. Lukkana, J. Wongtavatchai, R. Chuanchuen, Class 1 Integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*), *J. Vet. Med. Sci.* 74(4) (2011) 435 – 440.
- [17] A. Petersen, A.Dalsgaard, Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand, *Aquaculture*. 219 (2003) 71 – 82.
- [18] G. Vivekanandhan, K. Savithamani, A.A.M. Hatha, P. Lakshmanaperumalsamy, Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India, *Int. J. Food Microbiol.* 76 (2002) 165 – 168.
- [19] N. Saidi, R. Lagha, F.B. Abdallah, K.B. Rokbani, A. Bakhrouf, Slime producing, heavy metals and antibiotics resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Tunisia, *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(50) (2013) 5697 – 5708.
- [20] C.D. Miranda, G. Castillo, Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater, *Sci. Total Environ.* 224 (1998) 167 – 176.
- [21] F. Matyar, A. Kaya, S. Dincer, Antibacterial agents and heavy metal resistance in gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci. Total Environ.* 407 (2008) 279 – 285.