

การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Escherichia coli* จากน้ำเสียของฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในเขตเมืองสกลนคร

Investigation of antibiotic resistance of *Escherichia coli* from aquaculture farming
wastewater in Muang District, Sakon Nakhon

นพรัตน์ พัทธณี¹* ทรงทรัพย์ อรุณกมล¹ และ วิลัย เจียมไชยศรี²

Nopparat Patchanee¹* Songsub Arunkamol¹ and Wilai Chiemchaisri²

¹สาขาวิชาการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000

²ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

¹Department of Fisheries Faculty of Agricultural Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University, Muang, Sakon Nakhon, 47000.

²Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok, 10900.

*Corresponding author, e-mail: nopparat.p@snru.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *Escherichia coli* : *E. coli* โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด เก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 6 ฟาร์ม ในเขตเมืองสกลนคร จำนวน 200 โคโลนี เก็บตัวอย่าง 5 จุด จุดละ 40 โคโลนี คือ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลา และแหล่งน้ำธรรมชาติ ผลการศึกษาพบว่า *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะร้อยละ 100.0, 92.5, 80.0, 82.5 และ 65.0 ตามลำดับ และมีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 2.5, 10.0, 27.5, 22.5 และ 27.5 ตามลำดับ สำหรับการดื้อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 2-6 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 97.5, 82.5, 52.5, 60.0 และ 37.5 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ยาปฏิชีวนะที่ *E. coli* ดื้อยามากที่สุดคือ Tetracycline 147 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 73.5 ตรงกันข้ามกับยาปฏิชีวนะ Amikacin ที่ *E. coli* ดื้อยาน้อยที่สุดคือ 26 โคโลนี หรือคิดเป็นร้อยละ 13.0 นอกจากนี้ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) ของน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.71 ± 0.15 มีค่าสูงที่สุด รองมาเป็น *E. coli* ที่แยกเชื้อจากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและปลา ตามลำดับ สรุปได้ว่า *E. coli* ที่แยกเชื้อจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาหลายชนิดมากกว่า *E. coli* ในน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำธรรมชาติ

คำสำคัญ: ดื้อยาปฏิชีวนะ เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ *Escherichia coli*

Abstract

The aim of this study was to investigate resistance of *Escherichia coli*: *E. coli* strains to 6 antibiotics. 200 colonies from 5 sites, 40 colonies each, were isolated from 6 aquaculture farms in Muang, Sakon Nakhon. The samples were frog/fish pond wastewater, frog/fish pond sludge including a natural water sources. The result showed that *E. coli* strains from frog pond wastewater, frog pond

sludge, fish pond wastewater, fish pond sludge and natural water sources resisted to antibiotics of 100.0, 92.5, 80.0, 82.5 and 65.0%, respectively, and resisted to a single antibiotic of 2.5, 10.0, 27.5, 22.5 and 27.5%, respectively. The multiple antibiotic resistance (2-6 MAR) were 97.5, 82.5, 52.5, 60.0 and 37.5%, respectively. Besides, 147 *E. coli* strains resisted highly to Tetracycline, (73.5%). It was contrary for Amikacin that only 26 *E. coli* strains (13.0 %) were resisted. The highest multiple antibiotic resistance index (MAR index) was the *E. coli* strains from frog pond wastewater (0.71 ± 0.15) and sludge from frog and fish pond, respectively. In conclusion, *E. coli* which isolate sludge from frog and fish pond, there were more various antibiotic resistance pattern than *E. coli* which isolate wastewater from frog pond, wastewater from fish pond and natural water resource.

Key word: Antibiotic resistance, Aquaculture, *Escherichia coli*

คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเขตเมืองสกลนครมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกบ และการเพาะเลี้ยงปลานิล เป็นต้น ทำให้ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อการรักษาการติดเชื้อที่เกิดจากความหลากหลายของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำมากขึ้น การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อให้ถึงความกังวลในเรื่องสุขภาพของการบริโภคสัตว์น้ำ (Panpan, et al. 2012) โดยมีรายงานอุบัติการณ์การดื้อยาของ *Escherichia coli* : *E. coli* ในแม่น้ำที่รับน้ำเสียชุมชนมีภาวะการดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น (Laroche, et al. 2010) ดังนั้นแหล่งน้ำธรรมชาติและแหล่งน้ำสาธารณะมักจะมีการปนเปื้อนของ *E. coli* ที่มาจากแหล่งน้ำเสียชุมชนมากขึ้น การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคและการใช้ยาปฏิชีวนะในการผลิตอาหารสัตว์ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* อันเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์เพิ่มมากขึ้น (Berge, 2003)

E. coli เป็นดัชนีแสดงถึงการปนเปื้อนอุจจาระ หากตรวจพบ *E. coli* ดื้อยาจากน้ำเสียของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ก็มีโอกาสมที่มนุษย์จะสัมผัสกับเชื้อ *E. coli* ได้ อย่างไรก็ตาม *E. coli* ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่สามารถก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์แต่มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ (Ponsin, 2013) ในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงในการเพาะเลี้ยงกบและปลาจำนวนมากและมีการชะล้างน้ำเสียลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปริมาณมาก จากน้ำเสียชุมชน น้ำทิ้งโรงพยาบาล และโรงบำบัดน้ำเสีย โดยเฉพาะโรงบำบัดน้ำเสีย เป็นแหล่งที่มีปริมาณ *E. coli* จำนวนมาก และมีความสามารถดื้อยาได้หลายชนิดโดยเฉพาะเชื้อที่มาจากตะกอน เนื่องจากตะกอนจะถูกนำกลับไปบำบัดใหม่อีกครั้งทำให้ตะกอนอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียนานกว่าน้ำเสีย ถ้ามีการปล่อยน้ำที่มีการปนเปื้อนของ *E. coli* ดื้อยาลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะเป็นสาเหตุทำให้ *E. coli* สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้ (Patchanee, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะตามอำเภอใจมีผล

ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยยา 1 ชนิด Antibiotic resistance (AR) และทนต่อยาอย่างน้อย 2 ชนิด Multiple antibiotic resistance (MAR) (Servais and Passerat, 2009)

ดังนั้นการศึกษานี้เพื่อทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ในน้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีปล่อยน้ำเสียสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ น่าจะเป็นอีกสาเหตุเหมือนน้ำเสียและตะกอนจากโรงบำบัดน้ำเสียที่ทำให้ *E. coli* อาจถ่ายทอดยีนดื้อยาไปสู่เชื้อก่อโรคอื่นในสิ่งแวดล้อมได้ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางการควบคุมเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่ระบายจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับสัตว์น้ำให้เหมาะสมกับโรคที่เกิดขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะ ในเขตเมืองสกลนคร ประกอบด้วยฟาร์มเพาะเลี้ยงกบ 3 ฟาร์ม ฟาร์มเลี้ยงปลานิล 3 ฟาร์ม รวม 6 ฟาร์ม โดยเก็บตัวอย่าง 5 จุด คือ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ (Wastewater from frog pond : WFG) ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ (Sludge from frog pond : SFG) น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา (Wastewater from fish pond : WFH) ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลา (Sludge from fish pond : SFH) และแหล่งน้ำธรรมชาติ (Natural water sources : NWS) เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนเป็นระยะเวลา 3 เดือน เดือนละ 2 ครั้ง รวม 6 ครั้งต่อจุด จุดละ 40 โคโลนี รวม 200 โคโลนี ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-กันยายน พ.ศ. 2559

2. การแยกเชื้อ *Escherichia coli* : *E.coli*

การแยก *E. coli* จากตัวอย่าง ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหรือตะกอนด้วย Normal saline 0.85% ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl tryptose broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำผลบวกใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ EC Broth จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำผลบวก มาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB Agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่มีสี Metallic sheen นำไปทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี IMViC test (Andrews, 1997)

3. การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อ *E. coli* เลี้ยงในอาหาร Tryptone Soya Broth นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °c แล้วนำไปเทียบมาตรฐานความขุ่น McFarland 0.5 นำไปผสมยีสร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar ใช้ยาปฏิชีวนะ 6 กลุ่ม กลุ่มละ 1 ชนิด ได้แก่ กลุ่ม Beta-lactam คือ Cephalothin (KF) 30 µg กลุ่ม Aminoglycosides คือ Amikacin (AMK) 30 µg กลุ่ม Tetracycline คือ Tetracycline (TC) 30 µg กลุ่ม Chloramphenicol คือ Chloramphenicol (CP) 30 µg กลุ่ม Quinolones คือ Nalidixic acid (NA) 30 µg และ กลุ่ม Sulfonamides คือ Sulfamethoxazole /Trimethoprim (ST) 23.75 µg / 1.25 µg เนื่องจากเป็นตัวแทนจากยาปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มซึ่งจะมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °c เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการ

ดื้อยาปฏิชีวนะโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวง (clear zone) เทียบกับเกณฑ์มาตรฐานการตรวจสอบการดื้อยาปฏิชีวนะโดยมี *Escherichia coli* ATCC® 35218 สำหรับกลุ่ม Beta lactam และ *Escherichia coli* ATCC® 25922 สำหรับกลุ่มอื่นๆ เป็นมาตรฐานควบคุม โดยวิธี Disk diffusion (CLSI, 2011) แสดงใน (Table 1)

Table 1 Diameter of inhibition zone for *Escherichia coli*

Series	Antibiotics	Abb.	Diameter of inhibition zone (mm)			Dose (µg)
			Resistance	Intermediate	Sensitive	
Beta lactam	Cephalotrin	KF	≤14	15-17	≥18	30
Aminoglycoside	Amikacin	AMK	≤14	15-16	≥17	30
Tetracycline	Tetracycline	TC	≤11	12-14	≥15	30
Quinolone	Nalidixic acid	NA	≤13	14-18	≥19	30
Chloramphenicol	Chloramphenicol	CP	≤12	13-17	≥18	30
Sulfonamides	Sulfamethoxazole/	ST	≤10	11-15	≥16	23.75/
	Trimethoprim					1.25

Note : (CLSI, 2011)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 ตรวจวัดปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliform : TC) พีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform : FC) และ *E. coli* ในน้ำ โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN method) ใช้ระบบ 3 หลอด (APHA *et al.*, 2005)

1.2 การคำนวณหา ร้อยละการดื้อยา การเริ่มพัฒนาการดื้อยา และความไวต่อการต้านการดื้อยา สมการที่ (1), (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\% \text{ การดื้อยา} = \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \quad (1)$$

$$\% \text{ การเริ่มพัฒนาการดื้อยา} = \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่เริ่มพัฒนาการดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \quad (2)$$

$$\% \text{ ความไวต่อการต้านการดื้อยา} = \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ไวต่อการต้านการดื้อยา} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ทดสอบ}} \quad (3)$$

1.3 การคำนวณดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด Multiple antibiotic resistance Index (MAR index) สมการที่ (4)

$$\text{ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index)} = \frac{\text{จำนวนยาปฏิชีวนะที่ } E. coli \text{ ดื้อยา}}{\text{จำนวนยาปฏิชีวนะทั้งหมดที่ทดสอบ}} \quad (4)$$

1.4 การศึกษารูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ สมการที่ (5)

$$\% \text{ รูปแบบการดื้อยา} = \frac{\text{จำนวน } E. coli \text{ ที่ดื้อยาแต่ละรูปแบบ} \times 100}{\text{จำนวน } E. coli \text{ ทั้งหมดที่ดื้อยา}} \quad (5)$$

(% Pattern)

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 จากการวิเคราะห์ ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* ด้วยวิธี MPN method พบว่าน้ำเสียและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ มีค่าเฉลี่ยของปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* มากกว่า น้ำเสียและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลา รวมถึงแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ มีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด อยู่ในช่วง $4.3 \times 10^5 - 2.4 \times 10^7$ MPN/100 ml ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ มีค่าอยู่ในช่วง $2.0 \times 10^6 - 2.4 \times 10^8$ MPN/g น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลาและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลามีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.5 \times 10^4 - 9.3 \times 10^4$ MPN/100 ml และ $7.0 \times 10^4 - 4.6 \times 10^6$ MPN/g ตามลำดับ ในส่วนแหล่งน้ำธรรมชาติ มีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดอยู่ในช่วง $9.0 \times 10^3 - 2.4 \times 10^6$ MPN/100 ml ผลการตรวจสอบปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์มและปริมาณ *E. coli* เป็นไปทิศทางเดียวกับปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด แสดงใน (Table 2)

Table 2 Amount of total coliform (TC) fecal coliform (FC) and *Escherichia coli* from various samples

Type	Sample source (Range, MPN/100 ml)				
	WFG	SFG ^{1/2}	WFH	SFH ^{1/2}	NWS
TC	$4.3 \times 10^5 - 2.4 \times 10^7$	$2.0 \times 10^6 - 2.4 \times 10^8$	$1.5 \times 10^4 - 9.3 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4 - 4.6 \times 10^6$	$9.0 \times 10^3 - 2.4 \times 10^6$
FC	$9.3 \times 10^4 - 2.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6 - 2.4 \times 10^8$	$1.5 \times 10^4 - 4.3 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4 - 4.6 \times 10^6$	$9.0 \times 10^3 - 2.4 \times 10^6$
<i>E. coli</i>	$4.3 \times 10^5 - 2.4 \times 10^7$	$4.0 \times 10^5 - 2.4 \times 10^8$	$3.0 \times 10^3 - 4.3 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3 - 4.6 \times 10^6$	$3.0 \times 10^3 - 7.5 \times 10^4$

Remark : ^{1/} SFG and SFH (MPN/g), ^{2/} *E. coli* (MPN *E. coli*/g), WFG = Wastewater from frog pond; SFG = Sludge from frog pond; WFH = Wastewater from fish pond; SFH = Sludge from fish pond; NWS= Natural water sources; TC= Total coliform; FC = Fecal coliform.

1.2 การทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะ ทำการแยกเชื้อ *E. coli* จากน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งหมด 200 โคโลนี โดยแบ่งเป็น น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบ น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำธรรมชาติ จุดละ 40 โคโลนี ทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด พบว่ามี *E. coli* ดื้อยาปฏิชีวนะร้อยละ 100.0, 92.5, 80.0, 82.5 และ 65.0 ตามลำดับ จากจำนวนเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 200 โคโลนี มีการดื้อยา Tetracycline มากที่สุด 147 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 73.5 รองลงมาเป็น Nalidixic acid มีการดื้อยา 95 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 47.5 ส่วนยาปฏิชีวนะที่ *E. coli* ดื้อยาน้อยที่สุดคือ Amikacin จากจำนวน

ทั้งหมด 200 โคโลนี มีการดื้อยา Amikacin 26 โคโลนี คิดเป็นร้อยละ 13.0 ผลการวิเคราะห์ ร้อยละการดื้อยา ร้อยละการพัฒนาการดื้อยา และร้อยละความไวต่อการดื้อยาโดยพิจารณาจากปฏิชีวนะแต่ละชนิดแสดงใน (Table 3)

1.3 การคำนวณดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) พบว่า *E. coli* ที่แยกเชื้อจากน้ำเสียของบ่อเลี้ยงกบ ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกบ น้ำเสียของบ่อเลี้ยงปลา ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงปลา และ แหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่า *E. coli* ที่ไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ คิดเป็นร้อยละ 0.0, 7.5, 20.0, 17.5 และ 35.0 ตามลำดับ มีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 1 ชนิด (AR) คิดเป็นร้อยละ 2.5, 10.0, 27.5, 22.5 และ 27.5 ตามลำดับ สำหรับการดื้อยาปฏิชีวนะตั้งแต่ 2-6 ชนิด (MAR) คิดเป็นร้อยละ 97.5, 82.5, 52.5, 60.0 และ 37.5 ตามลำดับ และพบว่า ดัชนีการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 2 ชนิด (MAR index) ของน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.71 ± 0.15 มีค่าสูงที่สุด รองมาเป็น *E. coli* ที่แยกเชื้อจากตะกอนจากบ่อเลี้ยงกบและตะกอนจากบ่อเลี้ยงปลา แสดงใน Table 4

1.4 การศึกษารูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ รูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จากยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด มีผลดังนี้ ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจาก น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 8 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ KF- TC- CP-NA-ST มีจำนวน *E. coli* ที่ดื้อยาในรูปแบบนี้ ร้อยละ 40 และมีการรูปแบบการดื้อยา TC- CP-NA-ST ร้อยละ 37.5 แสดงใน Figure 1 (A) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจากตะกอนดินจากบ่อ เลี้ยงกบ มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 15 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC- CP-NA-ST คิดเป็นร้อยละ 27.5 และมีการรูปแบบการดื้อยา KF-TC- NA ร้อยละ 10.0 แสดงใน Figure 1 (B) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจาก น้ำเสียจากบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 12 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC-NA คิดเป็นร้อยละ 25.5 และมีการรูปแบบการดื้อยา AMK และ TC คิดเป็นร้อยละ 10.0 แสดงใน Figure 1 (C) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจากตะกอนในบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 18 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC คิดเป็นร้อยละ 15.0 และมีการรูปแบบการดื้อยา KF- TC คิดเป็นร้อยละ 12.5 แสดงใน Figure 1 (D) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะ 13 รูปแบบ พบว่า รูปแบบที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ TC คิดเป็นร้อยละ 17.0 และมีการรูปแบบการดื้อยา KF- TC คิดเป็นร้อยละ 10.0 แสดงใน Figure 1 (E)

Table 3 The percentage of antibiotic resistant *Escherichia coli* from various samples

Abb.	Percentage of sensitivity isolated of <i>E. coli</i> (% Resistance/% Intermediate/% Sensitivity)															
	% Resistance						% Intermediate					% Sensitivity				
	WFG	SFG	WFH	SFG	NWS	AVG	WFG	SFG	WFH	SFG	NWS	WFG	SFG	WFH	SFG	NWS
KF	42.5	47.5	20.0	40.0	35.0	37.0	57.5	50.0	60.0	57.5	62.5	0.0	2.5	20.0	2.5	2.5
AMK	12.5	15.0	20.0	12.5	5.0	13.0	7.5	25.0	17.5	15.0	7.5	80.0	60.0	62.5	72.5	87.5
TC	100.0	85.0	60.0	72.5	50.0	73.5	0.0	0.0	5.0	5.0	5.0	0.0	15.0	35.0	22.5	45.0
CP	90.0	50.0	7.5	12.5	17.5	35.5	2.5	0.0	0.0	15.0	5.0	7.5	50.0	92.5	72.5	77.5
NA	87.5	67.5	37.5	35.0	10.0	47.5	10.0	5.0	40.0	17.5	10.0	2.5	27.5	22.5	47.5	80.0
ST	95.0	67.5	15.0	30.0	10.0	43.5	0.0	0.0	12.5	10.0	2.5	5.0	32.5	72.5	60.0	87.5

Remark : WFG = Wastewater from frog pond; SFG = Sludge from frog pond; WFH = Wastewater from fish pond; SFH = Sludge from fish pond; NWS = Natural water sources;

AVG = Average; Ant= Antibiotic ; KF= Cephalothin; AMK = Amikacin; TC= Tetracycline; CP= Chloramphenicol; NA= Nalidixic acid; ST = Sulfamethoxazole / Trimethoprim.

Table 4 The percentage of *Escherichia coli* strains which resisted to antibiotics in various patterns

Number of antibiotic resistance in each pattern (total = 6 antibiotics)	The percentage resistance of isolates (%)				
	WFG	SFG	WFH	SFH	NWS
No resistant (sensitive)	0	7.5	20.0	17.5	35.0
1	2.5	10.0	27.5	22.5	27.5
2	2.5	5.0	35.0	27.5	20.0
3	7.5	25.0	10.0	15.0	12.5
4	40.0	37.5	5.0	10.0	2.5
5	47.5	7.5	2.5	5.0	2.5
6	0.0	7.5	0.0	2.5	0.0
MAR Index ^{1/}	0.71±0.15	0.55±0.26	0.27±0.20	0.34±0.26	0.21±0.21

Remark : ^{1/} Average± SD (n=40), MAR Index = Multiple antibiotic resistance Index; WFG = Wastewater from frog pond; SFG = Sludge from frog pond; WFH = Wastewater from fish pond; SFH = Sludge from fish pond; NWS= Natural water sources.

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้พบว่าตะกอนดินทั้งจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลาจะมีปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* สูงกว่าตัวอย่างที่เก็บมาจากน้ำเสียบ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงปลา และ แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Roland *et al.* (1991) และ Schmidt *et al.* (2000) พบว่า แบคทีเรียจากตะกอนดินจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีปริมาณมากกว่าในน้ำเสียและแม่น้ำ ซึ่งมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งของประเทศไทย ไม่ระบุค่ามาตรฐานของปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด ปริมาณฟีคัลโคลิฟอร์ม และ ปริมาณ *E. coli* แต่ค่าที่ตรวจพบมีค่าสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานข้อกำหนด EPA Victoria (2003) กำหนดปริมาณ *E. coli* ที่ยอมรับได้ในการปล่อยน้ำเสียทิ้งลงสู่แหล่งน้ำน้อยกว่า 10,000 *E.coli*/100ml

จากการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิด พบว่า การดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* อยู่ในเกณฑ์น้อยถึง ปานกลาง มีเพียง Tetracycline เท่านั้น มี *E. coli* ดื้อยาอยู่ในเกณฑ์ที่มาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Reinthaler *et al.* (2003), Patchanee (2011) พบว่า เชื้อ *E. coli* ที่แยกจากน้ำเสียมีการดื้อยา Tetracycline สูงสุด เนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้มานานทั้งในมนุษย์และสัตว์ ทำให้พบเชื้อ *E. coli* และแบคทีเรียที่ดื้อ ยา Tetracycline มากในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียเหล่านี้ได้สัมผัสกับยาปฏิชีวนะนั้นๆ แล้วต่อมาได้พัฒนาตัวเองเพื่อความอยู่รอด (Al-Bahry *et al.*, 2009) รวมถึงมีกลไกการดื้อยาที่ส่งผลไม่ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน เช่น การขับยา ออก ลดการซึมผ่านของยาเข้าเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา จึงทำให้มีการดื้อยา Tetracycline สูงสุด และพบว่า มีการดื้อยา Amikacin น้อยที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patchanee (2011)

กล่าวว่าการทดสอบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* ใน 16 ชนิด โดยมียาเพียงชนิดเดียวที่ไม่พบการดื้อยา คือ Amikacin เนื่องจาก Amikacin อยู่ในกลุ่ม Aminoglycoside เป็นยาที่มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ออกฤทธิ์ที่ 30S บนไรโบโซมเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน แบคทีเรียจึงถูกฆ่า โดยขณะนี้ Amikacin เป็นยาที่ออกฤทธิ์กว้างสุดในยาในกลุ่มนี้ จากการศึกษาของ Roland *et al.* (1991) พบว่า แบคทีเรียจากตะกอนดินจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีรูปแบบของการดื้อยาหลายชนิดมากกว่าในน้ำเสียหรือแม่น้ำ เนื่องจากตะกอนดินจะอยู่ในบ่อนานกว่าน้ำ ทำให้แบคทีเรียได้รับการกระตุ้นจากยาปฏิชีวนะหลายรอบของการเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่งผลทำให้ได้รับการเหนี่ยวนำในการดื้อยาได้มากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ เชื้อ *E. coli* จากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลา มีรูปแบบการดื้อยาหลายชนิดมากกว่าเชื้อ *E. coli* ในน้ำเสียจากบ่อเลี้ยงกบ บ่อเลี้ยงปลาและแหล่งน้ำธรรมชาติ จากการวิจัยครั้งนี้ยังพบว่า *E. coli* ที่ดื้อยา Tetracycline จะมีแนวโน้มการดื้อยา Nalidixic acid ร่วมด้วยเพราะยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้จะมีกลไกการดื้อยาคู่กันโดยมีผลไม่ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Ponsin, 2013) ทำให้มีแนวโน้มของการดื้อยาที่คล้ายกัน และ จากตัวอย่างทั้งหมด มีเพียงเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกบและตะกอนดินในเลี้ยงปลาเท่านั้นที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ ทั้ง 6 ชนิด ในส่วนรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะของ *E. coli* จะเห็นได้ว่า ในแต่ละประเภทจะมีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะตัวอย่างที่เก็บจากตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกบและบ่อเลี้ยงปลาจะมีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลายมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากน้ำเสีย เนื่องจากตะกอนดินมีการทับถมเป็นเวลานาน ทำให้แบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับแบคทีเรียที่มาภกับน้ำใหม่ ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนดื้อยา สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Patchanee (2011) ตัวอย่างที่เก็บจากตะกอนดินจะมีรูปแบบการดื้อยาที่หลากหลายมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากน้ำเสีย ตะกอนดินและน้ำเสียจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงเป็นแหล่งที่สามารถช่วยในการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* และแพร่กระจายของยีนดื้อยาปฏิชีวนะ (Zhang *et al.*, 2013) ดังนั้น เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะหากมีการสัมผัสกับมนุษย์อาจก่อให้เกิดผลกระทบและความเสี่ยงต่อสุขภาพได้ งานวิจัยนี้ได้สำรวจในช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงในการเพาะเลี้ยงกบและเลี้ยงปลาจำนวนมาก มีการชะล้างน้ำเสียชุมชนลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปริมาณมาก จึงควรศึกษาต่อเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับฤดูกาลอื่นๆ ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางการควบคุมเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่ระบายนจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการใช้ยาปฏิชีวนะให้เหมาะสมกับโรคที่เกิดขึ้น

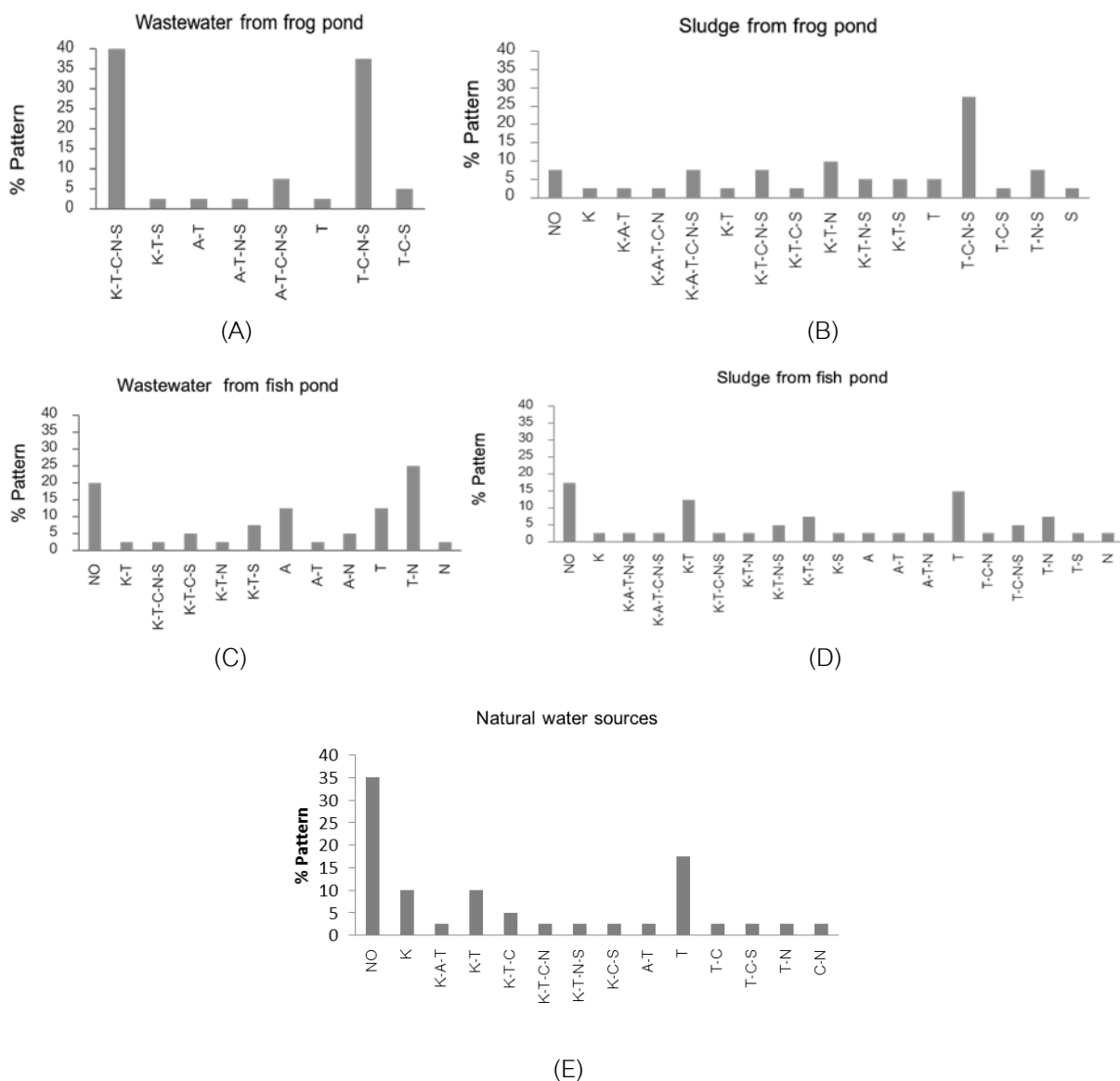


Figure 1 Pattern of Antibiotic resistant : (A) = Wastewater from frog pond; (B) = Sludge from frog pond; (C) = Wastewater from fish pond; (D) = Sludge from fish pond; (E) = Natural water sources. NO = No antibiotics resistance K= Cephalothin(KF) ; A = Amikacin (AMK) ; T= Tetracycline (TC) ; C= Chloramphenicol (CP) ; N= Nalidixic acid (NA) ; S = Sulfamethoxazole /Trimethoprim (ST)

คำขอบคุณ

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนครที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Al-Bahry, S.N., I.Y. Mahmoud, K.I.A. Al-Belushi, A.E. Elshafie, A. Al-Harthy, and C.K. Bakheit. 2009. Coastal sewage discharge and its impact on fish with reference to antibiotic resistant enteric bacteria and enteric pathogens as bio-indicators of pollution. *Chemosphere*. 77(11): 1534 – 1539.
- Andrews, W. 1997. *Manuals of food quality control*. FAO, Food and Nutrition paper. 14/4 (Rev.1): 13 - 23.
- APHA, AWWA and WEF. 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Berge, A.C.B., E.R. Atwill and W.M. Sischo. 2003. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. *Preventive Veterinary Medicine*. 61: 91–102.
- CLSI. 2011. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement*. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. USA. 168p.
- EPA Victoria. 2003. *Guideline for Environmental Management use of Reclaimed Water*. Publication 464.2, Southbank, Victoria, Australia. 101p.
- Laroche, E., F. Petit, M. Fournier, B. Pawlak. 2010. Transport of Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology*. 392(1): 12-21.
- Panpan, G., D. Mao, Y. Luo, L. Wang, B. Xu and L. Xu. 2012. Occurrence of Sulfonamide and Tetracycline-resistant bacteria and resistant genes in aquaculture environment. *Water Research*. 46(7): 2355-2364.
- Patchanee, N. 2011. *Removals of Coliforms and Antibiotic Resistant E.coli in Activated Sludge Process for Treatment of Domestic Wastewater*. Master degree thesis, Kasetsart University, Bangkok. 111 p. [in Thai]
- Ponsin, T. 2013. *Comparison Patterns between Antibiotic Resistant E.coli in Sequencing Batch Reactor (SBR) and Sequencing Batch Membrane Bioreactor (SB-MBR)*. Master degree thesis, Kasetsart University, Bangkok. 127 p. [in Thai]
- Reinthal, F.F., J. Posch, G. Feierl, G. W. ust, D. Haas, G. Ruckebauer, F. Mascher, E. Marth. 2003. Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge. *Water Research*. 37: 1685–1690.

- Roland, M.M., A. De Paola, S. R. Zywno, M.L. Motes Jr. and A. M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*. 99: 203–211.
- Schmidt, A.S., M.S. Bruun, I. Dalsgaard, K. Pedersen, and J.L. Larsen. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol*. 66: 4908 – 4915.
- Servais, P. and P. Julien. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Sci. Total. Environ*. 408: 365-372.
- Zhang, R.Q., G.G. Ying, H.C. Su, L.J. Zhou, Y.S. Liu. 2013. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China. *Journal Environ Sci Health B*. 48(11): 999-1013.