จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การใช้ใบหูกวาง (*Terminalia catappa L.*) เพื่อรักษาโรคในปลากัด *(Betta splendens)* และ ปลาหางนกยูง *(Poecilia reticulata)*

โดย

อรัญญา พลพรพิสิฐ
จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์
นันทริกา ชันซื่อ
วีณา เคยพุดซา
ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์

ธันวาคม 2549

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การใช้ใบหูกวาง *(Terminalia catappa L.)* เพื่อรักษาโรคใน ปลากัด (*Betta splendens*) และ ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)

โดย

ผศ.สพ.ญ.ดร.อรัญญา พลพรพิสิฐ
รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์
รศ.สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันซื่อ
ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา
รศ.ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์
Professor Dr.Makoto Endo

31 ธันวาคม 2549

โครงการ การใช้ใบหูกวาง *(Terminalia catappa L.)* เพื่อรักษาโรคใน ปลากัด (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.อรัญญา พลพรพิสิฐ

ภาควิชา อายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ / โทรสาร 02-2529575, 02-2518887

e-mail Aranya.P@chula.ac.th, aranyap@hotmail.com

รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ

ภาควิชา อายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ / โทรสาร 02-2529575, 02-2518887

e-mail cnantari@chula.ac.th

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีณา เคยพุดซา

ภาควิชา อายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ / โทรสาร 02-2529575, 02-2518887

e-mail kweena@chula.ac.th

รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

ภาควิชา อายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ / โทรสาร 02-2529575, 02-2518887

รองศาสตราจารย์ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ / โทรสาร 02-2185394-5, 02-2550780

Professor Dr.Makoto Endo

Laboratory of Fish Management, Faculty of Marine Science,

Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

ปลาสวยงามนับเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเนื่องจากการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเป็นอาชีพหลักและอาชีพเสริมของเกษตรกรทุกระดับโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรรายย่อย นับเป็นอาชีพที่อยู่คู่กับเกษตรกรและการเกษตรกรรมอื่นๆมาช้านาน แต่การเลี้ยงปลาสวยงามในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาหางนกยูงมีปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงามที่เกิดจากความเสียหายที่ผิวหนัง เช่น มีบาดแผล มีปรสิตภายนอก รวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ผิวหนัง ปัญหาดังกล่าวทำให้ปลาสวยงามมีความสวยงาม มีราคาด้อยลงและเกิดการแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อแทรกซ้อนต่าง ๆ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรและวงจรการผลิตและจำหน่ายอย่างมาก แต่เกษตรกรไทยก็ได้มีการนำพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดมาทดลองใช้ในฟาร์ม โดยนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยง การป้องกันและการรักษาโรคปลาสวยงาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งใบหูกวางซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในหมู่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลากัดมานานนับสิบปี การนำใบหูกวางมาใช้ประโยชน์นับว่าเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยที่สมควรได้รับการส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพต่อไป งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทยนั้นยังมิได้มีการศึกษาถึงสรรพคุณที่ชัดเจนของสมุนไพรที่นำมาใช้จึงไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการได้อีกทั้งยังไม่ได้รับความสนใจในการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของสมุนไพรเหล่านี้เท่าเทียมกับการพัฒนาเพื่อนำไปรักษาโรคในคน สัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจมูลค่าสูง การศึกษาครั้งนี้แม้ไม่สร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นเงินตรา แต่ก็เป็นการส่งเสริมภูมิปัญญาชาวบ้านและศักยภาพทางความคิดของเกษตรกรไทยในเรื่องที่เกี่ยวกับการเลี้ยงและรักษาโรคปลาสวยงามเพื่อให้เป็นความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถอ้างอิงได้ และนำไปสู่การศึกษาพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ที่เกษตรกรนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงคณะกรรมการและผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่มีส่วนพิจารณาตัดสินและประเมินโครงการการใช้ใบหูกวางเพื่อรักษาโรคในปลากัดและปลาหางนกยูงและให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินโครงการวิจัย ขอขอบคุณหน่วยงานที่เกี่ยวข้องที่ได้ให้การสนับสนุนโครงการโดยช่วยให้การตรวจวิเคราะห์ เอื้อเฟื้อข้อมูลและสถานที่ในการดำเนินการ รวมถึงการสนับสนุนให้บุคลากรสามารถดำเนินงานดังกล่าวได้ ได้แก่ คณะสัตวแพทยศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรมป่าไม้ Laboratory of Fish Management, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan รวมถึงเกษตรกรทุกท่านที่ให้ข้อมูลประกอบการวิจัย

คุณประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยในครั้งนี้ขออุทิศให้กับปลาหางนกยูงและปลากัดทุกชีวิตที่ถูกนำมาเกี่ยวข้องในการศึกษาในครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การใช้ใบหูกวาง *(Terminalia catappa L.)* เพื่อรักษาโรคในปลากัด (*Betta splendens*) และ ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)

ชื่อผู้วิจัย อรัญญา พลพรพิสิฐ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2549

บทคัดย่อ

การใช้ใบหูกวาง *(Terminalia catappa L.)* เพื่อรักษาโรคปลากัด (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) เป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนแนวคิดและภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยที่สำคัญที่มีการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลากัดมาเป็นเวลานาน วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คือการศึกษาคุณสมบัติด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ ชนิดของสารออกฤทธิ์และความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผลและโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง

การสกัดใบหูกวางแห้งด้วยน้ำเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายใสสีน้ำตาลเหมือนสีชา กลิ่นชา รสฝาด มีปริมาณสารสกัดด้วยน้ำทั้งหมด 15.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลทั้งหมด 11.53 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีที่ตรวจพบในใบหูกวางสีเหลือง ได้แก่ กรดแทนนิค 14.5±3.2 เปอร์เซ็นต์ รูติน 20±1.6 มิลลิกรัม/100กรัม ไอโซ-เคอร์ซิตริน 12±1.6 มิลลิกรัม/100กรัม ทองแดง 0.40±0.12 มิลลิกรัม/100กรัม และสังกะสี 2.56±0.71 มิลลิกรัม/100กรัม ในขณะที่ใบสีแดงพบองค์ประกอบต่าง ๆ ในสัดส่วนที่มากกว่า ได้แก่ กรดแทนนิค 16.7±2.6 เปอร์เซ็นต์ รูติน 42.5±5.8 มิลลิกรัม/100กรัม ไอโซเคอร์ซิตริน 25±2.99 มิลลิกรัม/100กรัม ทองแดง 0.46±0.1 มิลลิกรัม/100กรัม และสังกะสี 2.37±0.34 มิลลิกรัม/100กรัม การสกัดใบหูกวางด้วยน้ำที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 3 วันจะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นรสเปรี้ยว และมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย 10^7 cfu/mL

น้ำสกัดใบหูกวางมีความเป็นพิษของต่อปลากัดและปลาหางนกยูงที่ระดับความเข้มข้น 6,760 พีพีเอ็ม และ 5,281 พีพีเอ็มตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นที่น้ำสกัดใบหูกวางสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดแอร์โรโมแนส สเตรปโตคอคคัส และโปรโตซัวชนิดเตตร้าไฮมีนาเท่ากับ 1,000, 4,000 และ 2,000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

น้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดสเตรปโตคอคคัสในปลากัด 88 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลาหางนกยูง 83.33 เปอร์เซ็นต์

ใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม สามารถนำมาใช้ในการสมานแผลปลากัดและปลาหางนกยูงที่มีบาดแผลที่ผิวหนังเพียงเล็กน้อยได้ และการใช้น้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 50 - 200 พีพีเอ็ม ช่วยทำให้ปลากัดและปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้า-ไฮมีนาในห้องปฏิบัติการมีอัตรารอดเพิ่มขึ้นแต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อที่มีในตัวปลาหางนกยูงทั้งหมด การใช้ใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 – 3,000 พีพีเอ็มร่วมกับเกลือแกงที่ความเข้มข้น 0.5 – 1 เปอร์เซ็นต์เพื่อรักษาแผลและลดการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่เกิดการระบาดขึ้นในฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงช่วยลดอัตราการตายได้มากกว่าการไม่ใช้หรือการใช้ใบหูกวางเพียงชนิดเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title The study of Indian Almond Leaves (*Terminalia catappa L.*) on Siamese fighting fish (*Betta splendens*) and guppy (*Poecilia reticulat*a) diseases treatment

Name of the investigator Aranya Ponpornpisit

Year December 2006

Abstracts

The study of Indian Almond leaves (*Terminalia catappa L.*) on Siamese fighting fish (*Betta splendens*) and guppy (*Poecilia reticulat*a) diseases treatment will provide the scientific background to support the Thai local wisdom in utilization of these leaves by Siamese fighting fish farmer for decade. Main objectives of this research are to elucidate physical, chemical and biological properties, active compound and toxicity of Indian Almond leaves extracted water on Siamese fighting fish (*Betta splendens*) and guppy (*Poecilia reticulat*a). Efficacy of Indian Almond leaves extracted water on bacterial infection in both fish was also determined. Lastly, the investigation on therapeutic effect of Indian Almond leaves extracted water on Siamese fighting fish and guppy skin wounds and *Tetrahymena* infection was conducted.

On the investigation of physical, chemical and biological properties of Indian Almond leaves extracted water, the three days extraction at 28 ºC gave the brown tea color, tea smell, bitter astringent taste. Water and ethanol extraction gave 15.15 and 11.53 percents of total concentration of the extractants, respectively. Tannic acid as a major ingredients, (14.5±3.2 %), rutin (20±1.6 mg/100g), isoquercitrin (12±1.6 mg/100g), copper (0.40±0.12 mg/100g) and zinc (2.56±0.71 mg/100g) have been detected from yellow color leaves. In red color leaves tannic acid 16.7±2.6 %, rutin 42.5±5.8 mg/100g, isoquercitrin 25±2.99 mg/100g, copper 0.46±0.1 mg/100g and zinc 2.37±0.34 mg/100g have been detected. Total bacterial count of the first day of extraction has not been found. The total bacterial count of the foliage extraction for more than three days was 10^7 cfu/mL. The brown color extracted water obtained has fermented sour taste and smell.

Median lethal concentration at 96 hours exposure (LC_{50}-96h) of Siamese fighting fish and guppy to Indian Almond leaves extracted water were 6,760 ppm and 5,281 ppm, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracted water for *Aeromona*s, *Streptococus,* and *Tetrahymena* were 1,000, 4,000 and 2,000 ppm, respectively.

Indian Almond leaves water extracted at concentrations 1,000 and 10 ppm were 88 and 83.33 % effective to streptococcosis therapy in Siamese fighting fish and guppy.

Indian Almond leaves extracted water at 1,000 ppm has improved Siamese fighting fish and guppy non-invasive skin wound. Although the survival rates of the fishes infected by *Tetrahymena* artificial infection could be increased by bathing with Indian Almond leaves extracted water at 50-200 ppm the *Tetrahymena* still live in the survive guppy fish. Indian Almond leaves extracted water at the concentration of 1,000 - 3,000 ppm and sodium chloride at the concentration of 0.5 - 1 % have synergistic effect thus reduce mortality rates of *Tetrahymena corlissi* infected guppy in natural infection.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่ 1 พื้นฐานความเป็นมาของการวิจัยการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลาสวยงาม 1

1.1 บทนำ 1

1.2 ปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงาม 5

1.3 การเลี้ยงปลากัด 6

1.4 การเลี้ยงปลาหางนกยูง 7

1.5 คุณภาพน้ำกับการเพาะเลี้ยงปลากัดและปลาหางนกยูง 9

1.6 โรคติดเชื้อที่พบในปลากัดและปลาหางนกยูง 10

1.6.1 โรคติดเชื้อแบคทีเรีย 10

1.6.2 โรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา 12

1.7 ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง 15

1.8 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่ผิวหนังปลา 17

1.9 การใช้ยาและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงปลา 18

1.10 สมุนไพรใบหูกวางกับการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม 20

เอกสารอ้างอิง 24

บทที่ 2 คุณสมบัติด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ชนิดสารออกฤทธิ์ และความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง 27

2.1 บทนำ 27

2.2 สารประกอบหลักในพืชที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรค 30

2.3 วิธีการศึกษา 34

2.3.1 สมุนไพร : ใบหูกวาง 34

2.3.2 สมุนไพร : น้ำสกัดใบหูกวาง 35

2.3.3 สัตว์ทดลอง : ปลากัด และปลาหางนกยูง 35

2.3.4 วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวาง 36

2.3.5 วิธีการหาปริมาณกรดแทนนิคในน้ำสกัดใบหูกวาง 37

2.3.6 วิธีการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของน้ำสกัดใบหูกวาง 37

2.3.7 วิธีการทดสอบค่า Minimal Inhibitory Concentration ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแบคทีเรีย 38

2.3.8 วิธีการทดสอบค่า Minimal Inhibitory Concentration ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อเตตร้าไฮมีนา 39

2.3.9 วิธีการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด 40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.10 วิธีการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง 40
2.4 ชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวาง 40
2.5 คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ 44
2.6 Minimal Inhibitory Concentration ของน้ำสกัดใบหูกวาง 46
2.7 ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง 47
2.8 สรุป 50
เอกสารอ้างอิง 51

บทที่ 3 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ในปลากัดและปลาหางนกยูง 54
3.1 บทนำ 54
3.2 วิธีการศึกษา 56
3.2.1 สมุนไพร : ใบหูกวาง 56
3.2.2 สมุนไพร : น้ำสกัดใบหูกวาง 56
3.2.3 สัตว์ทดลอง : ปลากัด และปลาหางนกยูง 57
3.2.4 แบคทีเรีย : สเตรปโตคอคคัส 57
3.2.5 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ในปลากัดและปลาหางนกยูง 59
3.3 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูง 59
3.4 สรุป 65
เอกสารอ้างอิง 66

บทที่ 4 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผลและโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา ที่ผิวหนังปลากัด และปลาหางนกยูง 69
4.1 บทนำ 69
4.2 การเกิดแผลที่ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง 71
4.3 การติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลาสวยงาม 73
4.4 วิธีการศึกษา 76
4.4.1 สัตว์ทดลอง : ปลากัด และปลาหางนกยูง 76
4.4.2 สมุนไพร : ใบหูกวาง 76
4.4.3 สมุนไพร : น้ำสกัดใบหูกวาง 77
4.4.4 ปรสิต : เตตร้าไฮมีนา 77
4.4.5 วิธีการทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังปลา 78
4.4.6 วิธีการทำให้ปลาติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา 78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.7 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการหายของแผลในปลากัดและปลาหางนกยูง 79
4.4.8 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูง 80
4.4.9 วิธีการใช้ใบหูกวางรักษาปลาหางนกยูงป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* ในฟาร์ม 81
4.4.10 วิธีการใช้ใบหูกวางร่วมกับเกลือแกงในการรักษาปลาหางนกยูงป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* ในฟาร์ม 82
4.5 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการหายของแผลในปลากัดและปลาหางนกยูง 83
4.6 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูงที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ 89
4.7 การใช้ใบหูกวางรักษาปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อ *T. corlissi* ในฟาร์ม 94
4.8 การใช้ใบหูกวางร่วมกับเกลือแกงในการรักษาปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อ *T. corlissi* ในฟาร์ม 95
4.9 สรุป 97
เอกสารอ้างอิง 98

บทที่ 5 บทสรุปและแนวทางการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลาสวยงาม 101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

ภาพที่ 1.1 ก. บ่อเลี้ยงปลากัดวัยอ่อน
ข. ขวดเลี้ยงปลากัดที่โตเต็มวัยในฟาร์มเลี้ยงปลากัดในจังหวัดนครปฐม
ภาพที่ 1.2 ก. ลักษณะบ่อซิเมนต์ที่ใช้เลี้ยงปลาหางนกยูงในฟาร์มที่จังหวัดนครปฐม
ข. บ่อซิเมนต์ที่ใช้เลี้ยงปลาหางนกยูงที่จังหวัดราชบุรี
ภาพที่ 1.3 ก. ปลาเทร้าท์ที่ติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสมีอาการตาโปนมีสีขุ่นขาว ท้องบวม ว่ายที่ผิวน้ำ
ข. ปลานิลแดงที่ติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มีแผลที่ผิวหนัง ครีบอก และครีบท้อง
ภาพที่ 1.4 ก. ปลาหางนกยูงที่มีรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาตรวจพบแถบสีขาวที่ผิวหนัง ข. ตาบวมโปน ค. ท้องบวม ง. อวัยวะภายในบวมและมีสีซีดขาว
ภาพที่ 1.5 เชื้อเตตร้าไฮมีนาที่พบบริเวณครีบหางปลาหางนกยูงป่วยตรวจโดยวิธีย้อมสด(direct smear) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก. กำลังขยาย 40 เท่า และ ข. กำลังขยาย 100 เท่า
ภาพที่ 1.6 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 400 เท่า (alcian blue stain)
ภาพที่ 1.7 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 400 เท่า (alcian blue stain)
ภาพที่ 1.8 โครงสร้างลำต้น กิ่ง และใบจากต้นหูกวาง (*Terminalia catappa*)
ภาพที่ 1.9 ใบหูกวางแห้งที่เกษตรกรใส่ลงในบ่อปูน และในตู้ปลาที่ใช้ในการเลี้ยงปลา
ภาพที่ 2.1 ลักษณะลำต้นและกิ่งของต้นหูกวาง
ภาพที่ 2.2 ก. ช่อดอกหูกวางและลักษณะใบ
ข. ผลหูกวาง (Thompson and Evans, 2006)
ภาพที่ 2.3 ต้นหูกวางในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาพที่ 2.4 ปลากัดและปลาหางนกยูงปกติที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวาง
ภาพที่ 2.5 ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด (*LC_{50} 96 hr)
ภาพที่ 2.6 ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง (*LC_{50} 96 hr)
ภาพที่ 3.1 ปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อแบคทีเรียแอร์โรโมนาส มีอาการตัวบวม ว่ายที่ผิวน้ำ
ภาพที่ 3.2 บ่อเลี้ยงไรแดงโดยใช้น้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงสุกร
ภาพที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงและการเลี้ยงสุกรในบริเวณฟาร์ม
ภาพที่ 4.1 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า (alcian blue stain)

ภาพที่ 4.2 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูง (H & E stain) และปลากัด (alcian blue stain) ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 400 เท่า epithelial cells (e) mucous cells (mo) basal cells (b) scales (sc) melanophores (me) collagen fibers (c)

ภาพที่ 4.3 ปลาหางนกยูงที่มีรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาตรวจพบแถบสีขาวที่ลำตัว ผิวหนัง(ก.) อาจพบอาการตาบวมโปน(ข.) ท้องบวม(ค.) อวัยวะภายในบวมและมีสีซีดขาว (ง.)

ภาพที่ 4.4 เชื้อเตตร้าไฮมีนาที่พบบริเวณครีบหางปลาหางนกยูงป่วยตรวจโดยวิธีย้อมสด(direct smear) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า (1) และกำลังขยาย 400 เท่า (2)

ภาพที่ 4.5 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดที่ไม่มีแผล (alcian blue stain) ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า (ก.) และกำลังขยาย 400 เท่า (ข.) พบการเรียงตัวปกติของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและชั้นเดอมิส

ภาพที่ 4.6 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงที่ไม่มีแผล ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า(alcian blue stain)(ก.)และกำลังขยาย 400 เท่า(H & E stain)(ข.) พบการเรียงตัวปกติของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและชั้นเดอมิส

ภาพที่ 4.7 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดในวันที่ถูกทำให้เกิดแผลตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า (ก.) และกำลังขยาย 100 เท่า (ข.) (alcian blue stain) พบการฉีกขาดของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและบางส่วนของเนื้อเยื่อชั้นเดอมิส

ภาพที่ 4.8 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงในวันที่ถูกทำให้เกิดแผลตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า (ก.) และกำลังขยาย100 เท่า (ข.) (H & E stain) พบการฉีกขาดของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและบางส่วนของเนื้อเยื่อชั้นเดอมิส

ภาพที่ 4.9 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดที่ถูกทำให้เกิดแผลในวันที่1 (ก.) และวันที่ 3 (ข.) ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 400 เท่า (alcian blue stain) พบการเจริญของเยื่อบุผิวชั้นอิพิเดอมิส (ศรชี้)

ภาพที่ 4.10 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดที่ถูกทำให้เกิดแผลในวันที่ 1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 40 เท่า(ก.)และกำลังขยาย 100 เท่า(ข.)(H & E stain) เริ่มมีการเจริญของเยื่อบุผิวทดแทนและยังพบการลอกหลุดของเยื่อบุผิวชั้นอิพิเดอมิสบางส่วน (ศรชี้)

ภาพที่ 4.11 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้เกิดแผลวันที่ 3 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 100 เท่า (ก.)และกำลังขยาย 400 เท่า(ข.) (alcian blue stain) พบการเจริญของเยื่อบุผิวทดแทนที่สมบูรณ์ (ศรชี้)

ภาพที่ 4.12 โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงที่รักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 100 เท่า (ก.) และกำลังขยาย 400 เท่า (ข.) (alcian blue stain) มีตะกอนสีดำและการเพิ่มจำนวนของเม็ดสีเมลานินในชั้นเดอมิสและอิพิเดอมิส (ศรชี้)

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบหูกวางสีเหลือง และสีแดงคำนวณจากน้ำหนักใบแห้ง

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารสกัดจากใบหูกวางที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ

ตารางที่ 2.3 ปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบหูกวางสีเหลืองและสีแดง

ตารางที่ 2.4 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านกายภาพ

ตารางที่ 2.5 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านเคมี

ตารางที่ 2.6 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านชีวภาพ

ตารางที่ 2.7 การทดสอบ Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อเตตร้าไฮมีนา

ตารางที่ 2.8 การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด (*LC_{50} 96 hr)

ตารางที่ 2.9 การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง (*LC_{50} 96 hr)

ตารางที่ 3.1 ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและคุณสมบัติของเชื้อ *S. dysgalactiae* ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.2 จำนวนปลาหางนกยูงที่รอดชีวิตหลังจากฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง (*) และรักษา(**) ด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 3.3 จำนวนปลากัดที่รอดชีวิต หลังจากฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง (*) และรักษา (**) ด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.1 อัตราตายของปลากัดที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลในระหว่างการรักษาเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 4.2 อัตราตายของของปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลในระหว่างการรักษาเป็นเวลา 5 วัน

ตารางที่ 4.3 อัตราการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาและอัตราการตายของปลากัดที่ถูกทำให้ติดเชื้อ ด้วยวิธี acid treated method

ตารางที่ 4.4 อัตราการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาและอัตราการตายของปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้ติดเชื้อ ด้วยวิธี acid treated method

ตารางที่ 4.5 อัตรารอดของปลากัดที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาด้วย acid treated methodและรักษา ด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.6 อัตรารอดของปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาด้วยacid treated methodและรักษา ด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.7 อัตรารอดของปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาจากฟาร์มเมื่อรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวาง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.8 อัตรารอดของปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาจากฟาร์มเมื่อรักษาด้วยเกลือ โซเดียมคลอไรด์ร่วมกับน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 7 วัน

บทที่ 1

พื้นฐานความเป็นมาของการวิจัยการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลาสวยงาม

Research Background of Ornamental Fish Culture Using Indian Almond Leaves

อรัญญา พลพรพิสิฐ Aranya Ponpornpisit

1.1 บทนำ

ปลากัด หรือ Siamese fighting fish (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง หรือ guppy (*Poecilia reticulata*) เป็นปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมมาตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน มีราคาไม่แพง สามารถเพาะพันธุ์ได้ง่าย มีความทนทาน ปรับตัวได้ดีกับทุกสภาพแวดล้อม จึงสามารถนำมาผลิตและจำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศอย่างสม่ำเสมอ ปลาสวยงามเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีการส่งออกอย่างต่อเนื่องในระดับสูงถึงแม้ในภาวะเศรษฐกิจถดถอยในปี 2545 ก็ยังมีมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามโดยรวมสูงถึง 264 ล้านบาท ซึ่งในช่วงปี 2546 – 2548 ประเทศไทยส่งออกปลาที่มีชีวิตและพันธุ์ปลารวมมูลค่า 755.5 – 839.2 ล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์ 2546, 2549 ; เครือวัลย์ สถิติรัต, 2547) ปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงามมักเกิดจากความเสียหายที่ผิวหนังที่ทำให้ปลามีความสวยงามและมีราคาด้อยลง เช่น มีบาดแผล มีปรสิตภายนอก รวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ผิวหนัง การเกิดบาดแผลที่ผิวหนังปลามักเกิดขึ้นได้บ่อย ๆ จากการใช้วัสดุผิวหยาบแห้งในการจับหรือขนย้ายปลา การต่อสู้กันเอง บาดแผลที่ผิวหนังเป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแทรกเข้าสู่ร่างกายปลา เมื่อไม่ได้รับการรักษาก็จะมีการติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมากและทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก ในกรณีที่การเกิดบาดแผลนั้นเกิดขึ้นในระหว่างการบรรจุปลาเพื่อจำหน่ายให้กับลูกค้ามักพบว่าปลาจะอ่อนแอและตายเมื่อสินค้าส่งถึงปลายทางในระยะเวลาไม่นาน ก่อให้เกิดความไม่เข้าใจกันในเรื่องคุณภาพของปลาระหว่างผู้ซื้อและผู้ขายปลา นับเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่อผู้ส่งออก ทำให้ถูกเข้าใจผิดว่าส่งปลาคุณภาพต่ำให้แก่ลูกค้า ดังนั้นการเพิ่มความทนทานที่ผิวหนังรวมถึงการรักษาแผลที่ผิวหนังปลาจะช่วยลดโอกาสการติดเชื้อที่บาดแผลและช่วยพัฒนาคุณภาพปลาสวยงามที่ส่งออกจากประเทศไทย

โรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาหรือที่รู้จักกันในกลุ่มผู้เลี้ยงปลาหางนกยูงของไทยว่า โรคตัวเปื่อยเป็นโรคติดเชื้อปรสิตที่สำคัญที่พบบ่อยในปลาหางนกยูงได้รับการขนานนามว่าเป็น “Guppy Killing Disease” เนื่องจากมีความก่อโรครุนแรง เชื้อจะชอนไชกัดกินเนื้อเยื่อปลาทำให้เกิดบาดแผลทั้งที่ผิวหนังและลุกลามเข้าสู่อวัยวะภายใน ปลาที่ติดเชื้อดังกล่าวโดยเฉพาะปลาหางนกยูงจะตายหมดบ่ออย่างรวดเร็ว (ฐิติพร หลาวประเสริฐ และคณะ, 2001; อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ, 2003 ; Lom and Dykova, 1992) เชื้อเตตร้าไฮมีนามีหลายสายพันธุ์ มีทั้งที่ดำรงชีพเป็นปรสิตบนตัวปลาและชนิดที่อยู่อิสระในแหล่งน้ำ ชนิดที่เป็นปรสิตก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูง ได้แก่ *Tetrahymena corlissi* (ฐิติพร หลาวประเสริฐ และคณะ, 2001; Lom and Dykova, 1992) ส่วนเชื้อที่อยู่เป็นอิสระในแหล่งน้ำและสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อได้ในปลาหางนกยูงและปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Tetrahymena pyriformis* ปลาที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี acid treated method (Ponpornpisit *et al*, 2000) มีหลายชนิด เช่น ปลาทอง (*Carassius auratus*) ปลาพลาตี้ (*Xiphophorus maculatus*) ปลานีออน (*Paracheirodon innesi*) ปลาเซอรี่บาร์บ (*Puntius titteya*) และ ปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare*) เป็นต้น แม้ว่ายังไม่เคยมีรายงานการพบเชื้อดังกล่าวในปลากัดแต่ก็มีแนวโน้มว่าหากน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลามีการปนเปื้อนเชื้อเตตร้าไฮมีนาก็อาจทำให้ปลาที่มีแผลหรืออ่อนแอติดเชื้อดังกล่าวได้ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาปลาที่ติดเชื้อดังกล่าวให้หายได้ เนื่องจากเชื้อจะเพิ่มจำนวน และลุกลามเข้าสู่ร่างกายปลาอย่างรวดเร็ว

โรคติดเชื้อแบคทีเรียมักพบเป็นโรคแทรกซ้อนที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก แบคทีเรียก่อโรคในปลาสวยงามที่พบได้บ่อย ได้แก่ แอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า (*Aeromonas hydrophilla*) เชื้อดังกล่าวก่อให้โรคที่เรียกว่า Motile aeromonas septicemia แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ในแหล่งน้ำจืด มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงและที่ก่อโรคไม่รุนแรง (Noga, 2000) เชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ในปลาน้ำจืดทุกชนิด ปลาสวยงามมักติดเชื้อดังกล่าวจากการที่ผู้เลี้ยงปลาใช้อุปกรณ์ในการเลี้ยงปลาปะปนกัน หรือมีการใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปลาที่มีบาดแผลที่ผิวหนังจะมีการติดเชื้อและลุกลามรวดเร็ว เชื้อสามารถเข้าสู่กระแสเลือดและก่อโรคได้ในอวัยวะภายใน ทำให้ปลาที่ติดเชื้อป่วยและตายอย่างรวดเร็ว อาจพบจุดเลือดออกร่วมกับการบวมขยายใหญ่ที่เหงือก ผิวหนัง ตับ ไต และถุงลม มักพบของเหลวคั่งในช่องท้องปลา เชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในน้ำเลี้ยงปลาที่มีอาหารปลาตกค้าง และมีอินทรียสารสูง ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียในระยะแรกและไม่รุนแรงสามารถรักษาได้ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะผสมอาหารให้กิน แต่ไม่สามารถรักษาได้ในปลาป่วยที่ไม่กินอาหารแล้ว การรักษาด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำเลี้ยงปลาจะก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อตามมา (Noga, 2000)

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลาเป็นโรคอุบัติใหม่ที่มีรายงานการแพร่ระบาดในปลาหลายชนิดทั้งในปลาน้ำจืด ปลาทะเลและปลาสวยงาม โรคติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสมีสาเหตุโน้มนำจากความเครียด อุณหภูมิน้ำไม่เหมาะสม ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ ไนไตรท์สูง และปริมาณการเลี้ยงที่หนาแน่น (Russo *et al*., 2006) ปลาที่เกิดโรคติดเชื้อจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสจะแสดงอาการซึม สีผิวหนังเข้มคล้ำ มีจุดเลือดออกที่ผิวหนัง เหงือก โดยเฉพาะที่โคนครีบอกและครีบท้อง ทำให้ว่ายน้ำผิดปกติ ตาขุ่นขาว ในรายที่แสดงอาการรุนแรงพบตาโปน และมีจุดเลือดออกที่ตา (Eldar *et al*., 1997, Russo *et al*., 2006)

หูกวาง (*Terminalia catappa L.)* เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยอยู่ในสกุล Combretaceae มีชื่อเรียกต่าง ๆ ดังนี้ ตัดมือ ดัดมือ โคน ตาปัง ตาแปห์ หลุมปัง Bengal almond, Indian almond, Olive bark tree, Singapore almond, Sea almond, Tropical almond, Umbrella tree มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia catappa L*. เป็นไม้ยืนต้น ผลัดใบ สูง 10 -35 เมตร กิ่งอ่อนมีขนสีน้ำตาลเหลืองหนาแน่น ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่กลับ หรือรูปไข่แกมวงรี ใบแก่ กว้าง 4-12.5 เซนติเมตร ยาว 8 - 22 เซนติเมตร โคนใบสอบ และปลายเว้าเข้าเล็กน้อยคล้ายรูปหัวใจ เส้นใบ 9 - 11 คู่ ก้านใบยาว 5-12 มิลลิเมตร มีขนสั้นหนานุ่ม ใบมีสรรพคุณแก้ผิวหนังผื่นคัน ขับเหงื่อ รักษาโรคเรื้อน รักษาทอนซิลอักเสบ ลดน้ำตาลให้เป็นปกติ (นันทนา บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539)

การใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลากัดเป็นที่นิยมกันมานานนับสิบปี จากการสอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากัดได้รับข้อมูลว่าใช้เพื่อทำให้ปลากัดมีผิวหนังแข็งแรงขึ้น เมื่อนำไปกัดแข่งขันจะทำให้ชนะคู่ต่อสู้และบาดเจ็บไม่มาก บาดแผลหายเร็ว นอกจากนี้เกษตรกรบางรายยังเชื่อว่าใบหูกวางมีสรรพคุณใช้ในการรักษาโรคและกระตุ้นให้ปลาผสมพันธุ์ วิธีการใช้จะนำใบหูกวางแห้งใส่ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงปลาโดยตรง อาจเป็นขวดแก้ว ตู้ปลา หรืออ่างปูน อัตราส่วนที่ใช้ไม่แน่นอนโดยจะสังเกตจากสีน้ำที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน โดยทั่วไปจะใส่ในอัตราส่วนประมาณ 1 ใบต่อน้ำ 20 ลิตร เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสวยงามใน ต. สามควายเผือก จ.นครปฐม และผู้เลี้ยงปลาในเขตหนองแขม จ. กรุงเทพมหานคร ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าปลากัดในบ่อที่มีการใช้ใบหูกวางจะมีสุขภาพแข็งแรงทนทานต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ดีกว่าปลาในบ่อที่ไม่ได้ใช้ใบหูกวางและสามารถใช้ได้โดยไม่มีผลข้างเคียงใด เกษตรกรจึงเชื่อว่าใบหูกวางมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคปลาสวยงามได้

ในปัจจุบันมีการนำใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางมาจำหน่ายเพื่อใช้ในปลากัดโดยจำหน่ายในราคาสูงผ่านทางเวบไซท์ต่างๆเช่น http://www.warriorbetta.com/Vitamin%20and%20Waterconditioning.htm, http://www.belowwater.com/products/wild-almond-leaf/ (Aqua-Exotic, 2003; Below water, 2001) ประเทศที่มีการจำหน่ายใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวาง ได้แก่ สิงคโปร์ เยอรมนี และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น การนำใบหูกวางมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามนับเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยที่มีมานานสมควรได้รับการส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพต่อไป อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานการวิจัยใดที่สามารถนำไปใช้ในการอ้างอิงภูมิปัญญาท้องถิ่นนี้ได้ ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำสกัดจากใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อปรสิตภายนอกและโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลาสวยงามจะเป็นหลักฐานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่จะพิสูจน์หรือสนับสนุนแนวคิดของเกษตรกรในการใช้ใบหูกวางรักษาโรคติดเชื้อในปลาสวยงาม การศึกษาครั้งนี้เป็นการริเริ่มนำภูมิปัญญาชาวบ้านในด้านการรักษาโรคปลาสวยงามมาพัฒนาต่อยอดให้เป็นความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถอ้างอิงได้ และอาจพัฒนาการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยเพื่อ

1. ศึกษาคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ ชนิดสารออกฤทธิ์ และความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง
2. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูง
3. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผลและโรคติดเชื้อเตตร้า-ไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูง

การวิจัยในครั้งนี้ ได้แบ่งเป็น 3 ส่วน ตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะนำเสนอแยกเป็นแต่ละส่วนพร้อมรายละเอียดวิธีการศึกษาและผลการศึกษาในบทที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ส่วนในบทที่ 5 เป็นการสรุปผลการศึกษาและแนวทางปฏิบัติในการใช้ใบหูกวางเพื่อรักษาโรคในปลากัดและปลาหางนกยูง

1.2 ปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงาม

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าปลาสวยงามเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีการส่งออกอย่างต่อเนื่อง ปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงามมักเกิดจากความเสียหายที่ผิวหนังที่ทำให้ปลามีความสวยงามและมีราคาด้อยลงเช่นมีบาดแผล มีปรสิตภายนอก การติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ผิวหนัง การเกิดบาดแผลที่ผิวหนังปลาพบได้บ่อยจากการใช้วัสดุผิวหยาบแห้งในการจับปลา การคัดปลา การขนส่ง การต่อสู้กันเอง เป็นต้น บาดแผลที่ผิวหนังเป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแทรกเข้าสู่ร่างกายปลา เมื่อไม่ได้รับการรักษาหรือได้รับการรักษาไม่เหมาะสมจะเกิดการติดเชื้อเพิ่มขึ้นและเกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก ในกรณีที่เกิดบาดแผลในระหว่างการบรรจุปลาเพื่อจัดจำหน่ายให้กับลูกค้า มักพบว่าปลาจะอ่อนแอและตายเมื่อสินค้าส่งถึงปลายทางในระยะเวลาไม่นาน ก่อให้เกิดความไม่เข้าใจกันในเรื่องคุณภาพของปลาระหว่างผู้ซื้อและผู้ขายปลา อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ (2006) ได้ศึกษาในปลาหางนกยูงที่จัดเตรียมเพื่อการส่งออกที่มีสุขภาพดี ตรวจไม่พบอาการหรือรอยโรคผิดปกติแต่ตรวจพบปรสิตภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในระดับต่ำ ปลาเหล่านี้ได้รับความเครียดโดยการเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูงเป็นเวลานาน 10 วัน ทำให้มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นสูงสุดถึงร้อยละ 70 สอดคล้องกับการศึกษาของ Limและคณะ (2003) ในปลาหางนกยูงเช่นเดียวกัน ที่ทำโดยการกักปลาเพื่อการส่งออกไว้ในถุงบรรจุเป็นเวลา 40 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่นานที่สุดที่ใช้ในการขนส่งปลาเพื่อการส่งออก พบอัตราการตายหลังจากเปิดถุงร้อยละ 24 และเพิ่มสูงถึงร้อยละ 75 ในเวลา 7 วัน ในขณะที่ปลาหางนกยูงในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในฟาร์มตามปกติไม่พบอัตราการตายทั้งนี้อัตราการตายที่พบสูง Lim และคณะ ได้สรุปว่าน่าจะเกิดจากความบอบช้ำจากการขนส่ง การมีของเสียสะสมในน้ำรวมถึงการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลที่เกิดจากภาวะเครียดของปลา การเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนดังกล่าวมีผลลดภูมิคุ้มกันของปลาทำให้การติดเชื้อปรสิตและแบคทีเรียเพิ่มขึ้น จากข้อเท็จจริงที่ได้จากการวิจัยทั้งสองจึงเป็นไปได้ว่าปลาที่มีคุณภาพดี มีสุขภาพแข็งแรงจากฟาร์มอาจเกิดอาการและความผิดปกติได้ในระหว่างการบรรจุและขนส่ง ซึ่งนับเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่อผู้ส่งออก ทำให้ถูกเข้าใจผิดว่าส่งปลาคุณภาพต่ำให้แก่ลูกค้า ดังนั้นการเพิ่มความทนทานที่ผิวหนังรวมถึงการรักษาแผลที่ผิวหนังปลาจะช่วยลดโอกาสการติดเชื้อที่บาดแผลและช่วยพัฒนาคุณภาพปลาสวยงามที่ส่งออกจากประเทศไทย

1.3 การเลี้ยงปลากัด

ปลากัด (*Betta splendens*) เป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย เป็นที่นิยมเลี้ยงมานาน ในอดีตนั้น การเลี้ยงปลากัดไทย ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเพื่อใช้ในกีฬาการแข่งกัดปลา แต่ปัจจุบันนิยมเลี้ยงเพื่อเป็นปลาสวยงามเนื่องจากมีการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีรูปร่างดี ครีบหางยาว แผ่กว้าง มีลวดลายและสีสันสวยงามเพิ่มขึ้น การเลี้ยงปลากัดสามารถเลี้ยงได้ในพื้นที่จำกัด ใช้น้ำในปริมาณน้อย สามารถเลี้ยงเป็นอาชีพหลักหรืออาชีพเสริม หรือเลี้ยงเป็นงานอดิเรกก็ได้ ปลากัดพันธุ์ดั้งเดิมในธรรมชาติเป็นปลากัดป่า หรือปลากัดทุ่ง มีลักษณะลำตัวค่อนข้างเล็ก บอบบาง สีน้ำตาลขุ่นหรือสีเทาแกมเขียว ปลาเพศผู้มีครีบ และหางยาวกว่าปลาเพศเมียเพียงเล็กน้อย และจากการปรับปรุงพันธุ์เป็นระยะเวลานาน จึงได้ปลาที่มีรูปร่างดี ลำตัวหนา และใหญ่ สีสันหลากหลาย มีทั้งสีเขียว สีม่วง สีแดง สีน้ำเงิน เป็นต้น มีครีบแผ่กว้างใหญ่สวยงามกว่าพันธุ์ดั้งเดิม จึงได้มีการจำแนกปลากัดออกเป็นหลายสายพันธุ์ เช่น ปลากัดหม้อ ปลากัดทุ่ง ปลากัดจีน และปลากัดเขมร ปลากัดหม้อและปลากัดทุ่งนิยมเลี้ยงเพื่อการกัดแข่งขัน หรือต่อสู้กัน ปลากัดทั้งสองชนิดมีพฤติกรรมคล้ายคลึงกันมีความหวงถิ่น ก้าวร้าว โดยส่วนใหญ่จะพบปลากัดทุ่งได้ตามทุ่งนา มีลำตัวป้อม สั้น สีเข้ม ส่วนปลากัดหม้อเกิดจากการเพาะพันธุ์ ลำตัวใหญ่กว่า นิยมเพาะพันธุ์ให้มีสีม่วง สีแดง สีน้ำตาล และสีน้ำเงิน (ศุภชัย นิลวานิช, 2544; ธนากร ฤทธิ์ไธสง, 2545) ส่วนปลากัดจีนและปลากัดเขมร เป็นปลาที่มีครีบหางแผ่กว้างสีสันสวยงาม ไม่ก้าวร้าว นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ปลากัดแต่ละชนิดยังแยกสายพันธุ์ตามสีและลวดลาย เช่น สีเดียว สีผสม ลายผีเสื้อ ลายหินอ่อน ครีบสั้น ครีบยาว หางวงพระจันทร์ เป็นต้น

ก. **ข.**

ภาพที่ 1.1 **ก. บ่อเลี้ยงปลากัดวัยอ่อน**
ข. ขวดเลี้ยงปลากัดที่โตเต็มวัยในฟาร์มเลี้ยงปลากัดในจังหวัดนครปฐม

ปลากัดเป็นปลาออกลูกเป็นไข่ชนิดก่อหวอด ปลาที่จะนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์ ควรมีอายุตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไป มีความสมบูรณ์พันธุ์เต็มที่ บริเวณท้องมีลักษณะอูมเป่ง สุขภาพแข็งแรง แม่ปลา 1 ตัวให้ไข่ประมาณ 500 – 1,000 ฟอง ส่วนปลาที่จะนำมาใช้เป็นพ่อพันธุ์ ควรมีอายุ 4 เดือนขึ้นไป มีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง (ศุภชัย นิลวานิช, 2544) มีพฤติกรรมการสร้างหวอด โดยการพ่นฟองอากาศที่มีน้ำเมือกปลาผสมเกิดเป็นฟองอากาศเล็ก ๆ ลอยเป็นแพที่ผิวน้ำ เมื่อนำพ่อแม่พันธุ์มาเลี้ยงรวมกันในภาชนะที่ใช้สำหรับการเพาะพันธุ์ปลา ปลาเพศผู้จะก่อหวอด จากนั้นแม่ปลาจึงจะทำการวางไข่ เมื่อแม่ปลาวางไข่แล้วอาจกินไข่ปลาของตนเอง ผู้เลี้ยงจึงควรแยกแม่ปลาออก ปล่อยให้พ่อปลาดูแลไข่ปลา ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2 วันจึงจะฟักเป็นลูกปลาวัยอ่อน เมื่อครบ 7 วันจึงจะนำลูกปลาไปทำการเลี้ยงและอนุบาลต่อไปเป็นเวลา 30 วัน เมื่อโตเต็มที่จะมีการคัดปลาเพศผู้แยกเลี้ยงในขวดแก้วขวดละ 1 ตัว (ศุภชัย นิลวานิช,2544) จังหวัดที่มีการเลี้ยงปลากัดอย่างแพร่หลาย คือ จังหวัดนครปฐม ลักษณะของฟาร์มที่เลี้ยงปลากัดเพื่อการค้านั้น ส่วนใหญ่ใช้พื้นที่น้อยเป็นฟาร์มขนาดเล็ก มีการเลี้ยงปลาวัยอ่อนในบ่อปูน และเลี้ยงปลาที่โตเต็มวัยในขวดแก้วปากแคบ หรือขวดสี่เหลี่ยมทรงกระบอก ให้อาหารมีชีวิตตลอดการเลี้ยง เช่น ลูกน้ำ ไรแดง เป็นต้น โดยทั่วไปมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 1 ครั้ง โดยไม่มีการขัดล้างทำความสะอาดขวดหรือบ่อปลา จากการสำรวจฟาร์มปลากัดหลายแห่งในเขตจังหวัดนครปฐม พบว่ามีการนำใบหูกวางมาแช่น้ำ และนำน้ำไปใช้ในการเลี้ยงปลา บางแห่งมีการนำใบหูกวางใส่ลงในขวดเลี้ยงปลาโดยตรงทำให้น้ำที่อยู่ในขวดแก้วมีสีน้ำตาลอ่อน ผู้เลี้ยงปลาสังเกตว่าปลากัดที่เลี้ยงในน้ำสีน้ำตาลดังกล่าว มีสุขภาพสมบูรณ์ และแข็งแรงมากกว่าปลากัดที่เลี้ยงในน้ำธรรมดา

1.4 การเลี้ยงปลาหางนกยูง

ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) มีแหล่งกำเนิดในลำธารน้ำจืด และน้ำกร่อยในประเทศบราซิล กัวน่า เวเนซุเอล่า หมู่เกาะบาบาโดส และทรินิแดด ต่อมาได้มีการแพร่กระจายทั่วไปทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อนรวมทั้งในประเทศไทย (วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และคณะ, 2545) ปัจจุบันปลาหางนกยูงเป็นปลาสวยงามที่นิยมเลี้ยงทั่วทุกประเทศในโลก เนื่องจากสามารถเลี้ยง และเพาะพันธุ์ได้ง่าย มีสีสัน และลวดลายสวยงาม สามารถคัดสี และสายพันธุ์เพื่อผสมให้เกิดปลาหางนกยูงที่มีลวดลาย และสีสันแปลกตาตามต้องการ ปลาหางนกยูงที่นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงามในประเทศไทย อาจจำแนกได้เป็น สายพันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์แฟนซี โดยสายพันธุ์แฟนซีจะมีชื่อ

เรียกที่แตกต่างตามสีสัน ลวดลาย และรูปทรงของลำตัวและหาง เช่น สายพันธ์โมเสค สายพันธุ์กร๊าซ สายพันธุ์ทักซิโด้ สายพันธุ์สวอร์ดเทล เป็นต้น (ชลพินท์ กวินทรา, 2545) แต่เนื่องจากปลาหางนกยูงเพศเมียมีสีสัน และลวดลายไม่ชัดเจน จึงไม่สามารถแยกลักษณะตามสายพันธุ์ที่กล่าวมาได้ คงสามารถแยกได้เฉพาะปลาหางนกยูงเพศผู้เท่านั้น

ก. ข.

ภาพที่ 1.2 **ก. ลักษณะบ่อซิเมนต์ที่ใช้เลี้ยงปลาหางนกยูงในฟาร์มที่จังหวัดนครปฐมและ ข. บ่อซิเมนต์ที่ใช้เลี้ยงปลาหางนกยูงที่จังหวัดราชบุรี**

ปลาหางนกยูง เป็นปลาที่ออกลูกเป็นตัว ปลาเพศผู้และเพศเมียโตเต็มที่ และพร้อมที่จะเป็นพ่อแม่พันธุ์เมื่อมีอายุได้ 90 วัน พ่อพันธุ์ควรมีขนาดใหญ่ ลำตัวยาว สีสวยตรงตามสายพันธุ์ แม่พันธุ์ไม่มีสี มีขนาดใหญ่กว่าพ่อพันธุ์ หางกลมสวยได้สัดส่วน ทั้งพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ปลาต้องมีสุขภาพแข็งแรง(ศุภชัย นิลวานิช, 2544) เมื่อจะทำการเพาะพันธุ์ปลาหางนกยูง ผู้เลี้ยงจะนำพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ปลามาเลี้ยงรวมกันในบ่อปูนที่ความหนาแน่นประมาณ 50 ตัวต่อตารางเมตร อัตราส่วนปลาเพศผู้ 1 ตัวต่อปลาเพศเมีย 3 - 5 ตัว แม่ปลาหางนกยูงในบ่อจะทยอยให้ลูกปลาทุกวัน แม่ปลา 1 ตัว ให้ลูกปลาเฉลี่ย 50-100 ตัว ผู้เลี้ยงจะแยกลูกปลาที่เกิดขึ้นทุกวันออกจากบ่อเพาะพันธุ์เพื่อนำไปเลี้ยงในบ่ออนุบาลเป็นเวลาประมาณ 1 เดือนจึงจะทำการคัดขนาดและแยกเพศปลา ผู้เลี้ยงทำการเลี้ยงจนปลาโตเต็มที่มีสีสันสวยงามจึงจะนำไปขายต่อไป ประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงและส่งออกไปขายยังประเทศต่าง ๆ มีหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เยอรมัน ศรีลังกา มาเลเซีย จีน และไทย เป็นต้น การเลี้ยงปลาหางนกยูงในประเทศไทยนั้นมีการเลี้ยงกันทั่วทุกภาค จังหวัดที่มีชื่อเสียงในเรื่องการเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงเพื่อการค้าซึ่งเป็นที่ตั้งของฟาร์มขนาดเล็กและฟาร์มขนาดใหญ่จำนวนมากนั้น ได้แก่ จังหวัดนครปฐม และจังหวัดราชบุรี ลักษณะของฟาร์มที่เพาะเลี้ยง

ปลาหางนกยูงเพื่อการค้านั้นอาจเป็นฟาร์มขนาดเล็กมีจำนวนบ่อเลี้ยงปลาตั้งแต่ 40 ถึง 1,000 บ่อขึ้นไป อาจเป็นการเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ธรรมดา เลี้ยงในบ่อดิน หรือเลี้ยงในตู้กระจก มีพ่อแม่พันธุ์เพื่อใช้ในการเพาะพันธุ์ปลา มีการเลี้ยงปลาที่อายุต่าง ๆ ลักษณะบ่อเลี้ยงปลาหางนกยูงที่พบได้มากที่สุดเป็นบ่อปูนซีเมนต์รูปสี่เหลี่ยม พื้นที่ประมาณ 4 ตารางเมตร ความสูงเฉลี่ย 40 เซนติเมตร โดยทั่วไปผู้เลี้ยงจะทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 – 80 เปอร์เซ็นต์ และขัดล้างบ่อปลาทุกวันหรือวันเว้นวัน อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลาหางนกยูงมีหลายชนิด เช่น อาหารเม็ดสำเร็จรูป ไข่ตุ๋น ไรแดง เป็นต้น

1.5 **คุณภาพน้ำกับการเพาะเลี้ยงปลากัดและปลาหางนกยูง**

น้ำที่ใช้เลี้ยงปลากัดในฟาร์มเลี้ยงปลากัดเนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อยจึงนิยมใช้น้ำประปา และน้ำบาดาล ส่วนน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงมีแทบทุกชนิด ทั้งน้ำประปา น้ำบาดาล น้ำจากลำคลอง หนอง บึง น้ำจากคลองชลประทาน เป็นต้น (วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และคณะ, 2545) คุณภาพของน้ำที่ใช้มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ คุณภาพน้ำขึ้นอยู่กับแหล่งน้ำที่แต่ละฟาร์มใช้ในการเลี้ยง รวมถึงรูปแบบการเลี้ยงและการจัดการฟาร์ม ปลาสวยงามมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเป็นอย่างมาก ถ้าการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเกินไป ปลาไม่สามารถปรับตัวได้ทัน อาจทำให้เกิดความผิดปกติ เช่น ปลาตายจำนวนมาก เหงือกอักเสบ ปลาอ่อนแอ และติดเชื้อโรคแทรกซ้อนได้ ดังนั้นน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลาควรมีคุณภาพสม่ำเสมอ มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28 – 30 องศาเซลเซียส ความแตกต่างของอุณหภูมิในช่วงวันสูงไม่ควรสูงเกิน 2 องศาเซลเซียส มีความเป็นกรดด่าง 7–8 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่น้อยกว่า 5 พีพีเอ็ม (มิลลิกรัมต่อลิตร) ฟาร์มเลี้ยงปลาสวยงามนิยมให้อากาศผ่านหัวทรายลงในน้ำเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงในน้ำ นอกจากนี้ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมยังขึ้นกับชนิดของปลา เนื่องจากปลาหางนกยูงและปลากัดเป็นปลาที่มีความทนทานต่อปริมาณออกซิเจนต่ำในน้ำได้ ดังนั้นในการเลี้ยงปลาหางนกยูงจึงมีการใช้หัวทรายให้อากาศจำนวนน้อย ปลาหางนกยูงทนทานต่อปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่น้อยกว่า 3 พีพีเอ็ม ในขณะที่ปลากัดสามารถอยู่ได้อย่างปกติในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำน้อยกว่า 3 พีพีเอ็ม อย่างไรก็ตาม น้ำที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามควรมีปริมาณออกซิเจนสูง มีความกระด้างซึ่งวัดเป็นปริมาณเกลือคาร์บอเนตทั้งหมดน้อยกว่า 200 พีพีเอ็ม ปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์ไม่ควรสูงเกินกว่า 0.3 พีพีเอ็ม ไม่ควรมีการตกค้างของคลอรีนและไม่ควรมีโลหะหนักใด ๆ ปนเปื้อนในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา

1.6 โรคติดเชื้อที่พบในปลากัดและปลาหางนกยูง

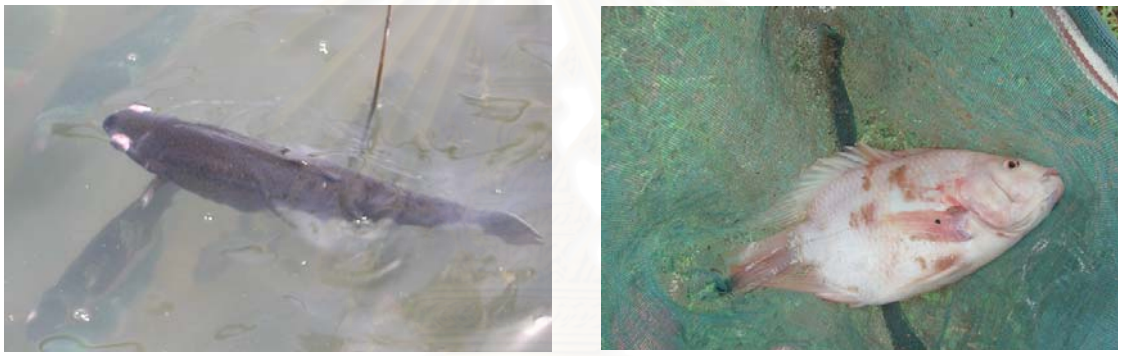
โรคติดเชื้อที่พบในปลาน้ำจืดสวยงามมีหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ปรสิต และเชื้อรา เชื้อที่ก่อโรครุนแรง ที่พบเป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามที่ตรวจพบได้บ่อย ได้แก่ ปรสิตชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะปรสิตที่ผิวหนัง การติดเชื้อแบคทีเรียมักพบเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนที่เกิดภายหลังการติดเชื้อปรสิตหรือในภาวะที่ปลาอ่อนแอ ได้รับความเครียดจากการเลี้ยงดู หรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง ปรสิตที่ก่อโรคในปลาสวยงามอาจพบที่ผิวหนังหรือภายในร่างกายปลา อาจเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนเช่นเดียวกับการติดเชื้อแบคทีเรียหรืออาจเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนก็ได้ ปรสิตที่พบบ่อยได้แก่ ปรสิตเซลล์เดียวที่เรียกว่าโปรโตซัว (protozoa) ซึ่งอาจดำรงชีพแบบอิสระอยู่ในแหล่งน้ำ (free living protozoa) หรือเป็นปรสิตที่ต้องอาศัยบนตัวปลา (parasitic protozoa) การดำรงชีพของโปรโตซัวต้องอาศัยองค์ประกอบร่วมของสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเค็ม ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ ความอ่อนแอของปลาซึ่งจะโน้มนำให้โปรโตซัวเข้าสู่ร่างกายปลาได้ง่ายและเพิ่มจำนวนมากขึ้นทั้งในน้ำและบนตัวปลา

โปรโตซัวที่พบที่ผิวหนังปลาหางนกยูงมีหลายชนิด เช่น เห็บระฆัง (*Trichodina*) อิ๊ค (*Ichthyopthirius*) เตเตร้าไฮมีนา (*Tetrahymena*) เป็นต้น สำหรับแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้งชนิดที่เป็นสาเหตุโน้มนำและติดเชื้อแทรกซ้อนในภายหลังมีหลายชนิด เช่น แอร์โรโมนาส (*Aeromonas*) ซูโดโมนาส (*Pseudomonas*) เสตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) เป็นต้น (Michel and Alderman, 1991)

1.6.1 โรคติดเชื้อแบคทีเรีย

โรคติดเชื้อแบคทีเรียมักพบเป็นโรคแทรกซ้อนที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก แบคทีเรียก่อโรคในปลาสวยงามที่พบได้บ่อย เช่น สเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) แอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า (*Aeromonas hydrophilla*) เชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่าก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า motile aeromonas septicemia เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้พบได้ในแหล่งน้ำจืด มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง และที่ก่อโรคไม่รุนแรง (Noga, 2000) แอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ในปลาน้ำจืดทุกชนิด ปลาสวยงามมักติดเชื้อดังกล่าวจากการที่ผู้เลี้ยงปลาใช้อุปกรณ์การเลี้ยงปลาปะปนกัน

หรือมีการใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปลาที่มีบาดแผลที่ผิวหนังจะติดเชื้อและลุกลามรวดเร็ว เชื้อสามารถเข้าสู่กระแสเลือดและก่อโรคได้ในอวัยวะภายใน ทำให้ปลาที่ติดเชื้อป่วยและตายโดยพบจุดเลือดออกร่วมกับการบวมขยายใหญ่ที่เหงือก ผิวหนัง ตับ ไต และถุงลม มักพบของเหลวคั่งในช่องท้องปลา เชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในน้ำเลี้ยงปลาที่มีอินทรียสารสูง มีเศษอาหารปลา และของเสียตกค้าง ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียในระยะแรกและไม่รุนแรงสามารถรักษาได้ด้วยการให้กินอาหารผสมยาปฏิชีวนะ แต่ปลาที่ติดเชื้อรุนแรงไม่สามารถรักษาได้เนื่องจากปลาป่วยไม่กินอาหารรวมทั้งการลุกลามของเชื้อเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ของตัวปลา หากทำการรักษาด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะผสมในน้ำเลี้ยงปลาจะก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อตามมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการปล่อยน้ำทิ้งจากบ่อปลาออกสู่สิ่งแวดล้อม (Noga, 2000)



ก. ข.

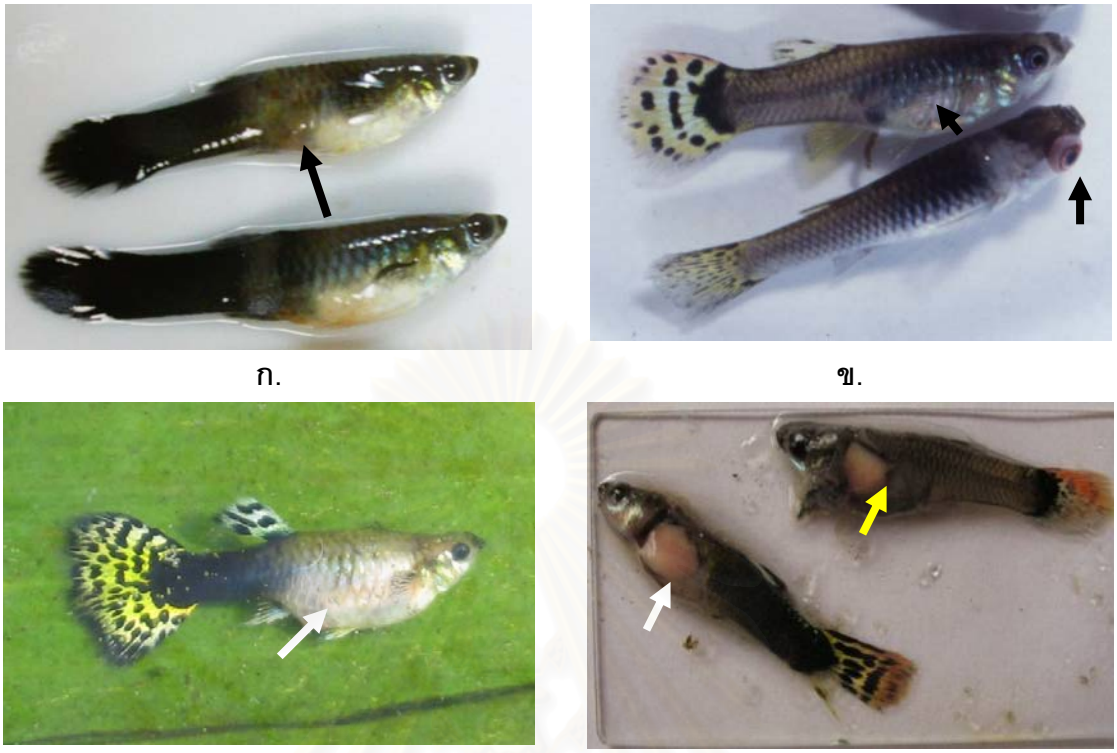
ภาพที่ 1.3 **ก. ปลาเทร้าท์ที่ติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสมีอาการตาโปนมีสีขุ่นขาว ท้องบวม ว่ายที่ผิวน้ำ**
ข. ปลานิลแดงที่ติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มีแผลที่ผิวหนัง ครีบอก และครีบท้อง

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลาเป็นโรคอุบัติใหม่ที่มีรายงานการแพร่ระบาดในปลาหลายชนิด เช่น ปลานิล (tilapia , *Oreochromis niloticus* L.) ปลากระบอก (mullet, *Liza klunzingeri* (Evans *et al*., 2002) ในอดีตนั้น การติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส จัดเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้น้อยมากในปลา (Schâperclaus, 1986) ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสทำให้เกิดโรคในปลาน้ำจืด ปลาทะเล ปลาเลี้ยงเพื่อการบริโภค และปลาสวยงามหลายชนิด การติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสมีสาเหตุโน้มนำจากความเครียด อุณหภูมิน้ำไม่เหมาะสม ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ ไนไตรท์สูง เลี้ยงหนาแน่น (Russo *et al*., 2006) รวมทั้งการเลี้ยงปลาร่วมกับปลาที่เป็นพาหะหรือเป็นโรค (McNulty *et al*., 2003) ปลาที่เกิดโรคติดเชื้อจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส จะแสดงอาการซึม

ผิวหนังสีเข้มคล้ำ มีจุดเลือดออกที่ผิวหนัง เหงือก โดยเฉพาะที่โคนครีบอกและครีบท้อง ทำให้ว่ายน้ำผิดปกติ ตาขุ่นขาว ในรายที่แสดงอาการรุนแรงพบตาโปน และมีจุดเลือดออกที่ตา (Eldar *et al*., 1997, Russo *et al*., 2006)

1.6.2 โรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา

การศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของเชื้อเตตร้าไฮมีนา (*Tetrahymena*) และการติดเชื้อชนิดนี้ในปลาสวยงามนั้น ได้มีรายงานมาตั้งแต่ คศ.1905 (Elliott, 1973, Corliss, 1953) แต่การศึกษาในเรื่องการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวยังไม่มีรายงานใดที่กล่าวอ้างถึงโดยสมบูรณ์ ในระยะที่ผ่านมาการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลาสวยงามทั้งที่เลี้ยงในฟาร์ม ปลาที่นำเข้าหรือปลาที่ส่งออกได้ถูกพบและมีการศึกษามากขึ้นทั้งในประเทศไทย และประเทศต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในปลาหางนกยูง (ฐิติพร หลาวประเสริฐ และคณะ, 2001; Lawhavinit, 2002; อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ, 2003; Leibowitz *et al*., 2005) โรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา หรือที่รู้จักกันในกลุ่มผู้เลี้ยงปลาหางนกยูงของไทยว่า โรคตัวเปื่อย เป็นโรคติดเชื้อโปรโตซัวที่สำคัญที่พบบ่อยในปลาหางนกยูง ได้รับการขนานนามว่า “Guppy Killing Disease” (Lom and Dykova, 1992) เนื่องจากมีความก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูง เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะชอนไชกัดกินเนื้อเยื่อปลาทำให้เกิดบาดแผลที่ผิวหนังและอาจลุกลามเข้าสู่อวัยวะภายใน ปลาที่ติดเชื้อดังกล่าว โดยเฉพาะปลาหางนกยูงจะตายหมดบ่ออย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ฐิติพร หลาวประเสริฐ และคณะ, 2001; Ponpornpisit *et al*., 2000) การตรวจปลาหางนกยูงจากตลาดซันเดย์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานครอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2545 ร่วมกับการสังเกตอาการพบว่าปลาหางนกยูงส่วนใหญ่ที่มีปรสิตภายนอกมักจะว่ายน้ำแฉลบไปมา อาจมีบางตัวที่อยู่นิ่งและแยกตัวจากปลาอื่นในฝูง ปลาที่ป่วยมากมักมีครีบเปื่อยและมีเมือกมาก ตรวจพบปรสิตที่ผิวหนัง 5 ชนิด ได้แก่ ปลิงใส (Monogenean) เห็บระฆัง (*Trichodina*) เตตร้าไฮมีนา (*Tetrahymena*) อิคทีออพไทเรียส (*Ichthyophthirius*) และเอพิโอโซมา (*Apiosoma*) โดยมีปรสิตเพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่พบบ่อยและอาจเป็นชนิดที่ทำให้ปลาหางนกยูงที่ถูกซื้อไปจากตลาดแห่งนี้ตายเป็นจำนวนมากได้แก่ ปลิงใส เห็บระฆังและเตตร้าไฮมีนา (อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ, 2003)



ก. ข.

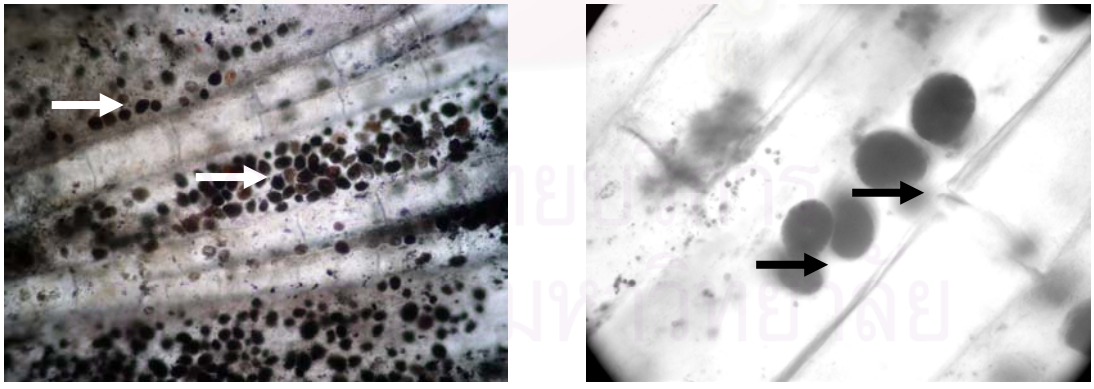
ค. ง.

ภาพที่ 1.4 **ก. ปลาหางนกยูงที่มีรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาตรวจพบแถบสีขาวที่ผิวหนัง ข. ตาบวมโปน ค. ท้องบวม ง. อวัยวะภายในบวมและมีสีซีดขาว**

เชื้อเตตร้าไฮมีนามีหลายสายพันธุ์ มีทั้งที่ดำรงชีพเป็นปรสิตบนตัวปลา และชนิดที่อยู่อิสระในแหล่งน้ำ ชนิดที่เป็นปรสิตก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูง ได้แก่ *Tetrahymena corlissi* (ฐิติพร หลาวประเสริฐ และคณะ, 2001; Lom and Dykova, 1992) ส่วนเชื้อที่อยู่อิสระในแหล่งน้ำและสามารถเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อได้ในปลาหางนกยูงและปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Tetrahymena pyriformis* (Ponpornpisit *et al*., 2000) ปลาที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี acid treated method (Ponpornpisit *et al*., 2000) มีหลายชนิด เช่น ปลาทอง (Gold fish ; *Carassius auratus*) ปลาพลาตี้ (Platy fish; *Xiphophorus maculatus*) ปลานีออน (Neontetra fish; *Paracheirodon innesi*) ปลาเชอรี่บาร์บ (Cherry barb fish; *Puntius titteya*) และ ปลาเทวดา (Angel fish; *Pterophyllum scalare*) เป็นต้น (Ponpornpisit *et al*., 2000) แม้ว่ายังไม่เคยมีรายงานการพบเชื้อดังกล่าวในปลากัดแต่ก็มีแนวโน้มว่าหากน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลามีการปนเปื้อนเชื้อเตตร้าไฮมีนาก็อาจทำให้ปลาที่มีแผลหรืออ่อนแอติดเชื้อดังกล่าวได้ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาปลาที่ติดเชื้อดังกล่าวให้หายได้เนื่องจากเชื้อจะลุกลามเข้าสู่ร่างกายปลาอย่างรวดเร็ว โดยปลาที่มีการติดเชื้อ

เตตร้าไฮมีนาจะมีสีผิวหนังซีดจาง ตามลำตัวมีเกล็ดตั้งพอง ครีบกร่อน โดยเฉพาะครีบหาง (อรัญญา พลพรพิสิฐ และคณะ, 2003) รอยโรคที่เด่นชัดที่เกิดจากการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน คือ แถบสีขาวซีดที่ผิวหนัง อาจพบอาการตาบวมโปน ท้องบวม อวัยวะภายใน เช่น ตับ ลำไส้ มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีซีดขาวซึ่งเกิดจากการที่มีเชื้อเตตร้าไฮมีนาแทรกอยู่เป็นจำนวนมากในบริเวณดังกล่าว

เชื้อเตตร้าไฮมีนาสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ เมื่ออยู่ในธรรมชาติจะดำรงชีพโดยการกินสารอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะขยายพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ (binary fission) แต่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมขาดแคลนธาตุอาหาร เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยขบวนการคอนจูเกชั่น (conjugation) จากนั้นเซลล์รุ่นต่อไปที่เกิดขึ้นจะเจริญโดยการแบ่งตัวแบบไมโตซีสไปอีกหลายครั้งแต่ก็ยังไม่เจริญพันธุ์โดยสมบูรณ์จึงยังไม่สามารถทำการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจนกว่าจะมีการแบ่งเซลล์ต่อไปอีกระยะหนึ่ง ซึ่งมีระยะเวลาแตกต่างไปตามพันธุ์ และเมื่ออยู่ในภาวะเจริญพันธุ์โดยสมบูรณ์ก็จะคงสภาพดังกล่าวไปอีกช่วงเวลาหนึ่ง และถ้าไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยขบวนการคอนจูเกชั่นเกิดขึ้น เซลล์นั้นก็จะหมดสภาพที่จะสืบพันธุ์ได้อีก เซลล์จะเคลื่อนที่ช้าลงและตายในที่สุด ลักษณะของเซลล์ที่ไม่สามารถสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศได้และใกล้จะหมดอายุขัย คือ ไมโครนิวเคลียส (mioronucleus) จะหดหายไปและเซลล์จะลีบเล็กลง



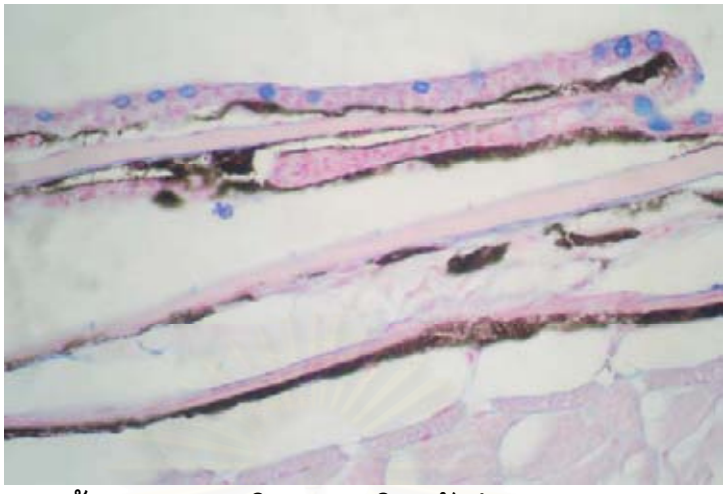
ก. ข.

ภาพที่ 1.5 **เชื้อเตตร้าไฮมีนาที่พบบริเวณครีบหางปลาหางนกยูงป่วยตรวจโดยวิธีย้อมสด** (direct smear) **ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ก. กำลังขยาย 40 เท่า และ ข. กำลังขยาย 100 เท่า**

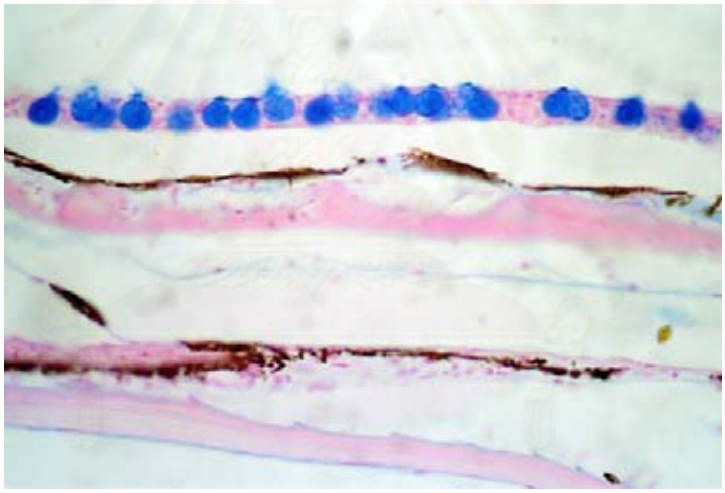
ช่วงเวลาการแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของธาตุอาหารและสายพันธุ์ของเชื้อเตตร้าไฮมีนา เช่น การแบ่งตัวของ *T. pyriformis* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด ด่าง 7-7.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดโปรติโอสเปปโตน (proteose peptone) 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระยะเวลาการแบ่งตัวเฉลี่ย 4 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแบ่งตัวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ด้วยเช่นกัน โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 18 - 36 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าเชื้อเตตร้าไฮมีนาบางสายพันธุ์จะทนอยู่ได้นานหลายสัปดาห์ที่ 4 องศาเซลเซียสก็ตาม ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับการแบ่งตัวอยู่ระหว่าง 7.25-7.3 แต่ก็ยังมีตัวแปรอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการแบ่งเซลล์ เช่น ลักษณะและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ถ้าใช้โปรติโอสเปปโตน เข้มข้น 0.1-2.5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะแบ่งตัวได้รวดเร็ว แต่ถ้าเข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการแบ่งเซลล์จะลดลงอย่างมาก และถ้าเข้มข้นถึง 10 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นพิษต่อเซลล์ ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นต่ำ เซลล์จะใช้เวลาในการแบ่งตัวนานขึ้น ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าที่เตรียมเก็บไว้เป็นเวลานาน จะมีความดันออสโมติคที่ไม่เหมาะสม มีสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้การแบ่งเซลล์ผิดปกติไป (Elliott, 1973)

1.7 **ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง**

ผิวหนังของปลากัดและปลาหางนกยูงมี 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นอิพิเดอมิส (epidermis) และชั้นเดอมิส (dermis) ชั้นอิพิเดอมิสเป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุด ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) เซลล์เมือก (mucous cells) เซลล์ที่ฐาน (basal cells) และเซลล์รับความรู้สึก (sensory cells) และเซลล์ตั้งต้น (germinal cells) ในบางโอกาสอาจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และแม็คโครฟาจน์ (macrophages) เซลล์ที่เป็นโครงสร้างหลักของชั้นอิพิเดอมิส คือ เซลล์เยื่อบุ โดยที่เซลล์ที่อยู่ชั้นบนสุด (superficial cell) จะมีรูปร่างแบน (squamous cells) เซลล์ที่ฐานเป็นเซลล์ที่ยังมีการเจริญเติบโตตลอดเวลาโดยจะเจริญเป็นเซลล์เยื่อบุใหม่ทดแทนเซลล์เก่าที่ตายและหลุดลอกไป ผิวหนังปลาปกคลุมด้วยเมือกซึ่งประกอบด้วยเซลล์เมือกที่เจริญมาจากเซลล์ที่ฐานเช่นเดียวกับเซลล์เยื่อบุ โดยเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์เมือกจะค่อย ๆ เคลื่อนตัวขึ้นไปที่ผิวหนังชั้นนอกสุด เพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อปกคลุมผิวหนังและหลุดลอกออกในที่สุด



ภาพที่ 1.6 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 400 เท่า** (alcian blue stain)



ภาพที่ 1.7 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 400 เท่า** (alcian blue stain)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั้นเดอมิสเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นในที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวม (loose connective tissue) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบแน่น (dense connective tissue) มีเซลล์เม็ดสี (chromatophores) ชนิดต่างๆ ปลากัดมีเซลล์เม็ดสีหลายชนิด ได้แก่ เมลาโนฟอร์ (melanophores) ให้สีน้ำตาลหรือสีดำ อิริโทรฟอร์ (erythrophores) ให้สีส้มหรือสีแดง แซนโทรฟอร์ (xanthrophores) ให้สีเหลือง หรือสีส้ม ลิวโคฟอร์ (leucophores) ให้สีขาวและอิริโดฟอร์ (iridophores)ให้สีเงินแววววาว

(Chaplen *et al*, 2002) ขอบเขตชั้นนอกสุดของชั้นเดอมิสติดกับเซลล์ที่ฐาน ชั้นในสุดติดต่อกับหลอดเลือดฝอย เนื่องจากภายในชั้นเดอมิสมีเซลล์เม็ดสีกระจายอยู่ทั่วไปทำให้ปลากัดและปลาหางนกยูงมีสีสันสวยงามแตกต่างกัน ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวมจะมีเกล็ด (scales) และเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) เรียงตัวอยู่หลวม ๆ ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบแน่นจะมีเส้นใยคอลลาเจนที่เรียงตัวกันอย่างหนาแน่น แต่ไม่มีส่วนของเกล็ดปลาแทรกในชั้นนี้

1.8 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่ผิวหนังปลา

ผิวหนังเป็นอวัยวะชั้นนอกสุดของปลา เป็นบริเวณที่จะรับสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมทั้งหลาย การระคายเคืองเกิดขึ้นที่ผิวหนังได้ไม่ว่าจะเป็นสาเหตุจากด้านกายภาพ ชีวภาพ หรือสัมผัสสารเคมี อาการที่พบเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมที่ผิวหนัง ได้แก่ การถูไถผิวหนังลำตัวกับสิ่งต่าง ๆ ในตู้ปลา การสร้างเมือกเพิ่มขึ้น ปริมาณเมือกที่เพิ่มมากขึ้นในบ่อหรือตู้ปลาทำให้น้ำเป็นฟองขุ่นสามารถสังเกตเห็นชัดเจนขึ้น ในกรณีที่เซลล์ที่ผิวหนังเพิ่มจำนวนมากขึ้น (hyperplasia) หรือมีการลอกหลุดมากกว่าปกติ อาจทำให้สังเกตเห็นปื้นสีขาวที่บริเวณดังกล่าวได้ ปลาที่มีความผิดปกติอย่างเรื้อรังที่ผิวหนัง ถ้าหากไม่ได้รับการรักษาอาจมีอาการรุนแรงขึ้น เกิดเนื้อตายเฉพาะที่ มีการติดเชื้อแทรกซ้อนและตายเนื่องจากระบบควบคุมสมดุลน้ำผิดปกติ

การเกิดบาดแผลที่ผิวหนังปลาเป็นลักษณะเฉพาะที่พบได้บ่อย เกิดได้จากการถูกสัมผัสด้วยวัสดุมีคม วัสดุผิวแห้ง หรือผิวหยาบ เช่น ตาข่ายจับปลา หรือผ้าแห้ง หรือการสัมผัสกับสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน การติดเชื้อพยาธิภายนอกชนิดต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของผิวหนังที่เกิดบาดแผลชนิดครูด (scratching) เริ่มจากการลอกหลุดของผิวหนังชั้นนอก (epidermis layer slough off) เซลล์เยื่อบุยกตัว(epithelial exfoliation) มีเลือดออกจากหลอดเลือดฝอย (breeding) เลือดคั่ง (hyperemia and cogestion) มีบาดแผลลึกลงไปถึงชั้นเดอมิส (dermis layer destruction) พบลักษณะเนื้อตาย (necrotic figure) และเกล็ดลอกหลุด (scale slough off) อาจพบเป็นบริเวณกว้างในบริเวณที่เกิดบาดแผล เมื่อเวลาผ่านไป ร่างกายปลาจะสร้างเนื้อเยื่อทดแทน มีการสร้างเมือกมากขึ้นเพื่อลดการอักเสบทำให้เห็นเซลล์เมือก (mucous cell) เพิ่มจำนวน ถ้าเป็นบาดแผลขนาดเล็กอาจหายได้เองภายในเวลา 3 – 5 วัน แต่ กรณีที่เป็นบาดแผลบริเวณกว้างและลึก ถ้าหากไม่ได้รับการ

รักษาจะทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนและเกิดเนื้อตายตามมา หน้าที่ของผิวหนังในการควบคุมสมดุลน้ำในร่างกายปลาจะเสียไป และเกิดรอยโรคที่รุนแรงมากขึ้น

1.9 การใช้ยาและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงปลา

ยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวในปลามีหลายกลุ่ม ยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าเลคแทม เช่น แอมพิซิลิน อะม๊อกซี่ซิลิน ยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เช่น นีโอมัยซิน ยาปฏิชีวนะกลุ่มเตตร้าซัยคลิน เช่น อ๊อกซีเตตร้าซัยคลิน เตตร้าซัยคลิน ยาปฏิชีวนะกลุ่มมาโครไลด์ เช่น อิริโทรมัยซิน รวมถึงยาคลอแรมเฟนิคอลและยาในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ เช่น ยาซัลฟาชนิดต่าง ๆ ปัจจุบันการใช้ยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียมีการใช้ยาสังเคราะห์ในอนุพันธุ์ที่สูงขึ้น เช่น อ๊อกโซลินิคแอซิด นอร์ฟลอกซาซิน เป็นต้น

สำหรับยาและสารเคมีที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อโปรโตซัวที่ผิวหนัง ก็มีการใช้หลายชนิด ได้แก่ กลุ่มสีย้อมประเภทต่าง ๆ เช่น อะคริฟลาวิน (ยาเหลือง) เมททิลีนบลู กลุ่มออกซิไดซ์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด่างทับทิม รวมถึงสารเคมีที่ใช้กันโดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ฟอร์มาลิน และเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือสารเคมีในการกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอตเฟต ก็มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย

วิธีการใช้ยาในปลาสายงามนั้น สามารถใช้ได้หลายรูปแบบ เช่น การป้อนยาโดยตรง การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าช่องท้อง การผสมอาหารให้กิน หรือการใส่ยาลงในน้ำเลี้ยงปลา อาจเป็นการจุ่มปลาในยาที่เข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้น ๆ หรือการใส่ยาในระดับความเข้มข้นต่ำแช่ปลาตลอดจนกว่าจะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เป็นต้น (Stoskopf, 1993)

การควบคุมการใช้ยาในสัตว์น้ำนั้น มีมาตรการควบคุมที่เข้มงวดมากโดยเฉพาะการใช้ยาในสัตว์น้ำเพื่อการบริโภคที่ส่งออก ซึ่งประเทศผู้ซื้อปลายทางเป็นผู้กำหนดปริมาณและชนิดของยาที่ไม่อนุญาตให้มีการตกค้าง ส่วนการใช้ยาในสัตว์น้ำสวยงามโดยเฉพาะปลาหางนกยูงและปลากัดจัดว่ายังไม่มีความเข้มงวดในมาตรการที่ใช้ควบคุมกำกับดูแล ผู้เลี้ยงหรือเกษตรกรสามารถหาซื้อยาและสารเคมีที่มีจำหน่ายทั่วไปมาใช้ด้วยตนเองได้ ซึ่งยาและสารเคมีที่จำหน่ายทั่วไปก็มีหลาย

ประเภททั้งที่ได้รับการอนุญาตให้ผลิตได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย และชนิดที่ผลิตขึ้นเองโดยปราศจากการกำกับดูแล ดังนั้นคุณภาพและประสิทธิภาพของยาและสารเคมีที่นำมาใช้ในฟาร์มจึงมีความแตกต่างกันมาก ทำให้การรักษาอาจได้ผลหรือไม่ได้ผล รวมทั้งการใช้ยาที่ผิดวิธีก็อาจส่งผลต่อการรักษาได้ นอกจากนี้โรคที่พบในสัตว์น้ำมักมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ถึงแม้ยาและสารเคมีที่ใช้อาจมีคุณภาพดี แต่ปัจจัยที่มีร่วมกันหลายประการอาจทำให้ผลการรักษาไม่สัมฤทธิ์ผลก็ได้ ทำให้มีการใช้ยาและสารเคมีเพื่อควบคุมป้องกันโรคในปริมาณมากเกินความจำเป็น มีการใช้ยาและสารเคมีหลายชนิดอย่างไม่เหมาะสม เช่น มีการใช้ยาต้านแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมหลายประการ การใช้ยาชนิดเดียวต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน การใช้ยาหลายชนิดพร้อมกัน หรือการใช้ยาในอนุพันธ์ที่สูงขึ้นและเป็นชนิดที่มีการใช้ในมนุษย์ด้วย อาจส่งผลให้เกิดเชื้อดื้อยาและตกค้างในแหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมได้ปัญหาของการใช้ยาต้านโปรโตซัวในสัตว์น้ำก็เช่นเดียวกัน มีการใช้ยาในระดับต่ำ ๆ เพื่อควบคุมอัตราเพิ่มจำนวนของโปรโตซัวที่ดำรงชีวิตเป็นอิสระในแหล่งน้ำ เนื่องจากไม่สามารถทำการกำจัดให้โปรโตซัวหมดไปได้ ดังนั้นการใช้ยาในลักษณะดังกล่าวจึงอาจส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในแหล่งน้ำด้วย โดยทำให้การควบคุมสมดุลระบบนิเวศของแหล่งน้ำเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มที่ไม่มีระบบบำบัดน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมักเป็นฟาร์มรายย่อยทั่วไป การนำน้ำที่ใช้แล้วมาผ่านการบำบัดและหมุนเวียนมาใช้ใหม่ภายใต้การเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบปิด อาจช่วยลดปัญหาการปล่อยยาและสารเคมีจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำลงในสิ่งแวดล้อมได้ แต่ฟาร์มที่มีระบบการเลี้ยงในลักษณะดังกล่าวก็มีน้อยมาก การควบคุมดูแลสภาพแวดล้อมให้ได้รับผลกระทบจากการเลี้ยงสัตว์น้ำก็ทำได้ไม่ง่ายนักไม่ใช่เพียงแต่การใช้และการปล่อยน้ำจากฟาร์มสู่แหล่งน้ำเท่านั้น การตรวจสอบหรือการแสดงให้เห็นปัญหาอย่างชัดเจนยังไม่สามารถทำได้โดยส่วนใหญ่เป็นเพียงการตั้งข้อสังเกตและใช้ประสบการณ์ ความรู้ ในเรื่องสิ่งแวดล้อมมาอธิบายปัญหาและความน่าจะเป็นที่จะเกิดปัญหาดังกล่าว การที่จะศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อระบบนิเวศจำเป็นต้องอาศัยระยะเวลาในการศึกษาที่ต่อเนื่องยาวนาน ใช้งบประมาณสูง และถึงแม้มีการศึกษาในเรื่องดังกล่าว ก็ยังนำมาอธิบายเชื่อมโยงปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างชัดเจนไม่ได้ว่าเป็นปัญหาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือเป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติ หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมไปตามกาลเวลา ดังนั้นจึงยังไม่มีรายงานวิจัยใดที่ให้เหตุผลหรือวิเคราะห์ปัญหาอุปสรรค ผลกระทบของการใช้ยาและสารเคมีในสัตว์น้ำได้อย่างดีพอ

การใช้ยาในสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาสวยงามที่เลี้ยงในประเทศไทยนั้นมีวิธีการและรูปแบบการใช้หลายประการ ชนิดของยาที่ใช้กันมีหลายชนิด มีทั้งยาที่ทราบส่วนประกอบหลักและยา

ที่ไม่มีฉลากยา ชนิดรูปแบบและวิธีการใช้กับชนิดของปลาสวยงามและวิธีการเลี้ยงปลา สำหรับในปลาหางนกยูงนั้น ในกรณีที่เลี้ยงเป็นฟาร์ม ยาและสารเคมีที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่ เกลือโซเดียมคลอไรด์ ด่างทับทิม ฟอร์มาลิน ออร์กาโนฟอตเฟต ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย อ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน และยาเหลือง ซึ่งยาเหลืองนั้นนิยมใช้ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันไม่แน่นอน โดยใช้ในระหว่างการขนส่งปลาทำให้น้ำที่เลี้ยงปลามีสีเหลืองจาง ส่วนยาและสารเคมีชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากเกลือและยาเหลือง นิยมใช้ในกรณีการป้องกันและการรักษาโรค การใช้ป้องกันโรคจะใช้โดยใส่ในปริมาณน้อยภายหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เช่น เกลือโซเดียมคลอไรด์ หรืออ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน การใช้ในการรักษาโรคจะใช้กรณีที่มีปลาตายเป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง เช่น การใช้ฟอร์มาลิน เพื่อรักษาปรสิตภายนอก เห็บปลา หรือใช้ด่างทับทิมเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำ การใช้ออร์กาโนฟอตเฟต ในการรักษาปลิงใส หนอนสมอหรือเห็บปลา อย่างไรก็ดี การเลือกใช้ยาและสารเคมีที่ถูกต้องตรงกับโรคที่พบในฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงยังพบได้น้อย เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาหางนกยูงยังคุ้นเคยกับการใช้ยาตามประสบการณ์และการสังเกตมากกว่าการตรวจให้แน่ชัดว่าปัญหาที่เกิดขึ้นเกิดจากสาเหตุใด ทำให้บางครั้งการรักษาไม่ได้ผล ใช้ยาไม่ตรงกับโรคที่พบ โดยเฉพาะเกษตรกรที่เริ่มเลี้ยงปลาไม่นานนัก สำหรับการใช้ยาและสารเคมีในปลากัด ยังมีการใช้ค่อนข้างน้อยเนื่องจากการเลี้ยงแยกรายตัวและการเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นประจำ ทำให้ปลามีโอกาสเกิดโรคและความผิดปกติน้อยกว่าปลาหางนกยูง แต่ก็มีการใช้ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต เร่งสี อยู่เป็นประจำ นอกจากนี้การใช้ใบพืชบางชนิด เช่น ใบหูกวาง ใบกล้วย ทางมะพร้าว ใส่ลงในบ่อเลี้ยงปลากัดหรือปลาหางนกยูงในช่วงใดช่วงหนึ่งของการเลี้ยงสามารถพบเห็นได้บ่อย โดยไม่มีคำอธิบายชัดเจนว่าการใช้ใบพืชเหล่านี้ช่วยให้เกิดประโยชน์อย่างไร เกษตรกรบางรายให้ข้อสังเกตว่าปลาหางนกยูงและปลากัดจะมีความแข็งแรงมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.10 สมุนไพรใบหูกวางกับการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม

หูกวาง (*Terminalia catappa L.)* เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยอยู่ในสกุล Combretaceae มีชื่อเรียกต่าง ๆ ดังนี้ ตัดมือ ดัดมือ โคน ตาปัง ตาแปห์ หลุมปัง Bengal almond, Indian almond, Olive bark tree, Singapore almond, Sea almond, Tropical almond, Umbrella tree มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia catappa L.* เป็นไม้ยืนต้น ผลัดใบ สูง 10 - 35 เมตร กิ่งอ่อนมีขนสีน้ำตาลเหลืองหนาแน่น ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่กลับหรือรูปไข่แกมวงรี ใบแก่

กว้าง 4 - 12.5 เซนติเมตร ยาว 8 - 22 เซนติเมตร โคนใบสอบ และปลายเว้าเข้าเล็กน้อยคล้ายรูปหัวใจ เส้นใบ 9 - 11 คู่ ก้านใบยาว 5-12 มิลลิเมตร มีขนสั้นหนานุ่ม ใบมีสรรพคุณแก้ผิวหนังผื่นคันขับเหงื่อ รักษาโรคเรื้อน รักษาทอนซิลอักเสบ ลดน้ำตาลให้เป็นปกติ (นันทนา บุณยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539)

ภาพที่ 1.8 **โครงสร้างลำต้น กิ่ง และใบจากต้นหูกวาง** (*Terminalia catappa L.*)

การใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลากัดเป็นที่นิยมกันมานานนับสิบปี จากการสอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากัดได้รับข้อมูลว่าใช้เพื่อทำให้ปลากัดมีผิวหนังแข็งแรงขึ้น เมื่อนำไปกัดแข่งขันจะทำให้ชนะคู่ต่อสู้ และบาดเจ็บไม่มาก บาดแผลหายเร็ว นอกจากนี้เกษตรกรบางรายยังเชื่อว่าใบหูกวางมีสรรพคุณใช้ในการรักษาโรค และกระตุ้นให้ปลาผสมพันธุ์ วิธีการใช้จะนำใบหูกวางแห้งใส่ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงปลาโดยตรง อาจเป็นขวดแก้ว ตู้ปลา หรืออ่างปูน อัตราส่วนที่ใช้ไม่แน่นอนโดยจะสังเกตจากสีน้ำที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน โดยทั่วไปจะใส่ในอัตราส่วนประมาณ 1 ใบต่อน้ำ 20 ลิตร บางรายใช้วิธีนำใบหูกวางปริมาณ 10- 20 ใบ แช่น้ำในบ่อที่ไม่มีปลาประมาณ 20 ลิตร เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงจะนำน้ำที่ได้มาเติมลงในขวดเลี้ยงปลากัด สังเกตว่าน้ำมีสีน้ำตาลเจือจาง และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละครั้งหรือวันเว้นวัน โดยเติมน้ำใบหูกวางใส่ลงไปด้วยทุกครั้ง เกษตรกรผู้เลี้ยงปลา

สวยงามใน ต.สามควายเผือก จ.นครปฐม และผู้เลี้ยงปลาในเขตหนองแขม จ.กรุงเทพมหานคร ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าปลากัดในบ่อที่มีการใช้ใบหูกวางจะมีสุขภาพแข็งแรงทนทานต่อการเกิดโรคต่างๆ ได้ดีกว่าปลาในบ่อที่ไม่ได้ใช้ใบหูกวาง และสามารถใช้ได้โดยไม่มีผลข้างเคียงใดๆ เกษตรกรจึงเชื่อว่าใบหูกวางมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคปลาสวยงามได้ อย่างไรก็ดี ยังไม่พบว่ามีเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาหางนกยูงนำใบหูกวางมาใช้ประโยชน์ในฟาร์มแต่อย่างใด แต่อาจพบการนำใบหูกวางมาใช้ในฟาร์มเลี้ยงปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลากา ปลาบอลลูน เมื่อสอบถามผู้เลี้ยงก็มิได้คำตอบชัดเจนว่าใช้แล้วดีหรือไม่อย่างไร มีความแตกต่างกันหรือไม่ระหว่างบ่อที่มีการใช้และบ่อที่ไม่ได้ใช้ใบหูกวาง ผู้เลี้ยงให้ความเห็นว่าใช้ใบหูกวางเพื่อให้น้ำเลี้ยงปลามีสีน้ำตาลอ่อนเพื่อช่วยในเรื่องการพรางตัวของปลาและน่าจะช่วยลดความเครียดของปลาได้

ภาพที่ 1.9 **ใบหูกวางแห้งที่เกษตรกรใส่ลงในบ่อปูน และในตู้ปลาที่ใช้ในการเลี้ยงปลา**

ปัจจุบันมีการนำใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางมาจำหน่ายเพื่อใช้ในการเลี้ยงปลากัด โดยจำหน่ายในราคาสูงผ่านทางเวบไซท์ต่างๆ เช่น http://www.warriorbetta.com/Vitamin%20and%20Waterconditioning.htm, http://www.belowwater.com/products/wild-almond-leaf/ (Aqua-Exotic, 2003; Below water, 2001) ประเทศที่มีการจำหน่าย ได้แก่ สิงคโปร์ เยอรมนี และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น การนำใบหูกวางมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามนับเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยที่มีมานาน สมควรได้รับการส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพต่อไป อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานการวิจัยใดที่สามารถนำไปใช้ในการอ้างอิงภูมิปัญญาท้องถิ่นนี้ได้ ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อปรสิตภายนอกและโรคติดเชื้อแบคทีเรียใน

ปลาสวยงามจะเป็นหลักฐานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่จะพิสูจน์หรือสนับสนุนแนวคิดของเกษตรกรในการใช้ใบหูกวางรักษาโรคติดเชื้อในปลาสวยงาม การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำภูมิปัญญาชาวบ้านในด้านการรักษาโรคปลาสวยงามมาพัฒนาต่อยอดให้เป็นความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถอ้างอิงได้และอาจพัฒนาการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์. 2549 การส่งออกสินค้าสำคัญของไทย ปี 2545-2549. [online]. Available at: http://www.ops2.moc.go.th/meeting/bb.xls

กรมส่งเสริมการส่งออก. กระทรวงพาณิชย์. 2546. ตลาดส่งออกปลามีชีวิตและพันธุ์ปลาของประเทศไทย. [online]. Available at:http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticIndex.jsp

เครือวัลย์ สถิติรัต. 2547. การส่งออกและการนำเข้าสินค้าประมงรายไตรมาสปี 2546. วารสารการประมง. 57 (1): 88-89.

ชลพินท์ กวินทรา. 2545 สายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูง. หจก. เพชรกะรัตสติวดิโอ. 80 หน้า

ฐิติพร หลาวประเสริฐ เฉลิมพล ไกรศรี และ สุปราณี ชินบุตร. 2544. การศึกษาโรคตัวเปื่อยในปลาหางนกยูง. วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ. กรมประมง 11(2): 5-6.

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2545. คู่มือการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกสายพันธุ์ปลากัด ฉบับสมบูรณ์. หจก.เพชรกะรัตสติวดิโอ. 200 หน้า.

นันทนา บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (5). สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. พิมพ์ครั้งที่ 1 : 257-260.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ กาญจนา จิรพันธ์พิพัฒน์ และ พิสิฐ ภูมิคง. 2545. ปลาออกลูกเป็นตัว. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ ฝ่ายเผยแพร่ กองส่งเสริมการประมง กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 246 หน้า.

ศุภชัย นิลวานิช 2544 ครบเครื่องธุรกิจปลาสวยงาม สำนักพิมพ์มติชน กรุงเทพ ฯ 147 หน้า.

อรัญญา พลพรพิสิฐ ศักดิ์ชัย โตภาณุรักษ์ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2003. การสำรวจปรสิตภายนอกที่พบในปลาหางนกยูงที่ตลาดซันเดย์. วารสารการประมง. ปีที่ 56(6)หน้า571-577.

อรัญญา พลพรพิสิฐ ศักดิ์ชัย โตภาณุรักษ์ มงคล เตชะกำพุ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2006. ปรสิตภายนอกที่พบในปลาหางนกยูงส่งออกและแนวทางการพัฒนาคุณภาพ. วารสารการประมง. 59 (2): 127-133.

Alderman, D. and Michel, C. 1992. Chemotherapy in aquaculture today. In: Michel C, Alderman DJ (eds). Chemotherapy in Aquaculture. From Theory to Reality. Office International des Epizootics, Paris. 3–24.

Aqua-Exotic. 2003. Our warriors fight to conquer. [online]. Available at: http://www.warrior betta.com/ Vitamin%20and%20Waterconditioning.htm

Below water. 2003. [online]. Available at: http://www.belowwater.com/products/wild-almond-leaf/

Chaplen, F. R., Rosalyn, H.U., Philip N. M. and Wojtek, K. 2002. Fish chromatophores as cytosensors in a microscale device: Detection of environmental toxins and bacterial pathogens. Pigment Cell Res. 15: 19-26. 2002

Corliss, J.O.1953. Comparative studies on Holotrichous ciliates in the Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena group. II Morphology, life cycles and systemic status of strainsin pure culture. Parasitol. 43:49 -87.

Corliss, J.O.1970. The comparative systemetics of species comprising the Hyminostome ciliate genus *Tetrahymena*. J. Protozool.17(2):198-209.

Eldar, A., Horovitcz, A. and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immuno. and Immunopath. 56:175-183.

Elliott, A.M. 1973. Morphology of *Tetrahymena*. In :Biology of *Tetrahymena*. A.M. Elliott (ed.). Pennsylvania. Dowden Hutchinson and Ross Inc. 5-19.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Glibert, P.M., Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M.A., Landsberg J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. and Al Zenki, S. 2002. Characterization of betahaemolytic Group B *Streptococcus* agalactiae in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. J. Fish Dis. 25: 505 – 513

Lawhavinit, O., Chukanhom, KI. and Hatai, K. 2002. Effect of *Tetrahymena* on the occurrence of achlyosis in the guppy. Mycosci. 43: 27–31.

Leibowitz, M. P., Ariav, R. and Zilberg, D. 2005. Environmental and physiological conditionsaffecting *Tetrahymena* sp. infection in guppies, *Poecilia reticulate* Peters. J. Fish Dis.28: 539–547.

Lim, L.C., Dhert, P. and Sorgeloos, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. Aqua. Res. 34: 923-935.

Lom, J. and Dykova, I. 1992. Protozoan parasites of fishes, Developments in aquaculture and fisheries science, vol. 26, Amsterdam:Elsevier. 252-253.

McNulty, S.T., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., and Evans, J.J. 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass *(Morone chrysops x Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture. 220: 165-173.

Noga, E.J. 2000. Fish disease diagnosis and treatment. First Iowa state University press edi., Iowa State University press, Iowa : 87-105.

Ponpornpisit, A., Endo, M. and Murata, H. 2000. Experimental infections of a ciliates *Tetrahymena pyriformis* on ornamental fishes. Fish. Sci. 66: 1026-1031.

Russo, R., Mitchell, H., and Yanong, R.P.E. 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture. 256: 105-110.

Schâperclaus, W., Kulow, H. and Schreckenbach, K. 1986. Chapter 4 Disease caused by ciliates ; IV Protozoiases : Fish Disease Vol. II. Fifth edi. Schâperclaus, W. (ed) Fischkrankheiten, Akademie-Verlag, Berlin. : 716 –723.

Stoskopf, M.K. 1993. Fish medicine. Saunders W B.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

คุณสมบัติด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ชนิดสารออกฤทธิ์ และความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง

Physical, Chemical and Biological Properties, Active Compound and Toxicity of Indian Almond Leaves Extracted Water on Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) and Guppy (*Poecilia reticulata*)

อรัญญา พลพรพิสิฐ — Aranya Ponpornpisit
นันทริกา ชันซื่อ — Nantarika Chansue
ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ — Nittharatana Paphavasit

2.1 บทนำ

หูกวาง เป็นพืชในวงศ์ combretaceae สกุล *Terminalia catappa L.* มีชื่อเรียกต่าง ๆ ดังนี้ ตัดมือ ดัดมือ โคน ตาปัง ตาแปห์ หลุมปัง Talie, Tavola, Bengal almond, Indian almond, Olive bark tree, Singapore almond, Sea almond, Tropical almond, Umbrella tree เป็นต้น หูกวางเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ มีกิ่งก้านแผ่ปกคลุมลำต้น เป็นไม้ผลัดใบ มีความสูง 10 - 35 เมตร (นันทนา บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539) เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น 50 - 150 เซนติเมตร

ภาพที่ 2.1 ลักษณะลำต้นและกิ่งของต้นหูกวาง

หูกวางเป็นไม้ประจำถิ่นในภูมิประเทศของเขตร้อนชื้น เช่น ไทย พม่า อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ปาปัวนิวกินี หมู่เกาะโซโลมอน ฟิจิ พบได้ทั้งบริเวณชายฝั่งทะเล แนวป่าชายเลน และในเขตชุมชนเมืองทั่วไป ปัจจุบันมีการนำไปเพาะปลูกในประเทศต่าง ๆ เช่น บราซิล หมู่เกาะคาริบเบียน อาฟริกา และได้กลายเป็นไม้ประจำถิ่นในเวลาต่อมา (Thompson and Evans, 2006) ต้นหูกวางปรับตัวได้ดีกับสภาพดินหลากหลายชนิด โดยเฉพาะดินร่วนปนทราย ดินที่มีการระบายอากาศดี ทนต่อแรงลม และทนต่อความเค็มของละอองน้ำทะเล ขยายพันธุ์โดยตอนกิ่งและเพาะปลูกด้วยเมล็ด มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วในปีแรก ๆ ความสูงเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยปีละ 2 เมตร และค่อนข้างคงที่เมื่อโตเต็มที่ ให้ผลเมื่อมีอายุประมาณ 3 ปี ผลเป็นพวงอยู่บริเวณก้านดอก ผิวเรียบ รูปร่างรี แบนข้าง ยาว 3.5 – 7 เซนติเมตร กว้าง 2 – 5.5 เซนติเมตร ดอกขนาดเล็ก สีขาวครีม มี 5 กลีบ กลิ่นฉุน (Thompson and Evans, 2006) กิ่งอ่อนมีขนสีน้ำตาลเหลืองหนาแน่น ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่กลับ หรือรูปไข่แกมวงรี ใบแก่ กว้าง 4 - 12.5 เซนติเมตร ยาว 8 - 22 เซนติเมตร โคนใบสอบ และปลายเว้าเข้าเล็กน้อยคล้ายรูปหัวใจ มีเส้นใบ 9 - 11 คู่ ก้านใบยาว 5-12 มิลลิเมตร มีขนสั้นหนานุ่ม (นันทนา บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2539) ใบอ่อน สีเขียวอ่อน มีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ใบแก่สีเขียวเข้มเป็นมันเงา ใบเมื่อแก่มากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สลับลายสีแดงและอาจเปลี่ยนเป็นสีแดงทั้งใบ ร่วงหล่นเมื่อแก่จัดและจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแห้ง หูกวางผลัดใบทั้งต้นในฤดูหนาวในบางประเทศจะมีการผลัดใบปีละ 2 ครั้ง (Thompson and Evans, 2006)

ก. ข.

ภาพที่ 2.2 **ก. ช่อดอกหูกวางและลักษณะใบ ข. ผลหูกวาง** (Thompson and Evans, 2006)

ประเทศแถบเอเชียแปซิฟิกนำเมล็ดจากผลสดมารับประทานสด หรือรมควันและเก็บรักษาไว้ได้นานนับปี เนื้อไม้ใช้ทำกลอง ทำเรือแคนนู ใช้เป็นเชื้อเพลิง สามารถนำเปลือกต้น ใบ ราก และเปลือกผลมาสกัดสารแทนนิน ทำสีย้อมผ้า หมึก สีย้อมหนัง ใบใช้ห่ออาหาร ทั้งใบ และเปลือกต้นมีคุณสมบัติทางเภสัชกรรมหลายประการ เช่น ขับเหงื่อ แก้ท้องอืด แก้ท้องเสีย แก้ปวดหัว รักษาแผลในช่องปาก ใช้สมานแผล (Thompson and Evans, 2006)

ภาพที่ 2.3 **ต้นหูกวางในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เกษตรกรผู้เลี้ยงปลากัดนำใบหูกวางแห้งสีน้ำตาลมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลา จากการสอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงปลากัดได้รับข้อมูลว่าใช้เพื่อทำให้ปลากัดมีผิวหนังแข็งแรงขึ้น เมื่อนำไปกัดแข่งขันจะทำให้ชนะคู่ต่อสู้และบาดเจ็บไม่มาก บาดแผลหายเร็ว นอกจากนี้เกษตรกรบางรายยังเชื่อว่าใบหูกวางมีสรรพคุณใช้ในการรักษาโรค และกระตุ้นให้ปลาผสมพันธุ์ วิธีการใช้จะนำใบหูกวางแห้งใส่ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงปลาโดยตรง อาจเป็นขวดแก้ว ตู้ปลา หรืออ่างปูน อัตราส่วนที่ใช้ไม่แน่นอนโดยจะสังเกตจากสีน้ำที่เปลี่ยนเป็นสี

น้ำตาลอ่อน โดยทั่วไปจะใส่ในอัตราส่วนประมาณ 1 ใบต่อน้ำ 20 ลิตร บางรายใช้วิธีนำใบหูกวางปริมาณ 10 - 20 ใบ แช่น้ำในบ่อที่ไม่มีปลาประมาณ 20 ลิตร เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงจะนำน้ำที่ได้มาเติมลงในขวดเลี้ยงปลากัด สังเกตว่าน้ำมีสีน้ำตาลเจือจางและทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละครั้งหรือวันเว้นวันโดยเติมน้ำใบหูกวางใส่ลงไปด้วยทุกครั้ง เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสวยงามใน ต. สามควายเผือก จ.นครปฐมและผู้เลี้ยงปลาในเขตหนองแขม จ.กรุงเทพมหานคร ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าปลากัดในบ่อที่มีการใช้ใบหูกวางจะมีสุขภาพแข็งแรงทนทานต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ดีกว่าปลาในบ่อที่ไม่ได้ใช้ใบหูกวาง และสามารถใช้ได้โดยไม่มีผลข้างเคียงใดๆ เกษตรกรจึงเชื่อว่าใบหูกวางมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคปลาสวยงามได้

2.2 สารประกอบหลักในพืชที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรค

สารประกอบหลักที่พบในพืชทั่วไปนั้นมีสามชนิด ได้แก่ โฮโลเซลลูโลส (holocellulose) ลิกนิน (lignin) และสารแทรก (extractive) โดยโฮโลเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบหลักที่มีมากที่สุดในผนังเซลล์ ส่วนสารแทรกจะมีในปริมาณน้อย สารแทรกหมายถึงสารที่ไม่ใช่องค์ประกอบของโครงสร้างของผนังเซลล์ ประกอบด้วยสารอินทรีย์ และอนินทรีย์หลายชนิด แทรกอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช สารแทรกที่พบได้ในพืชทั่วไป เช่น เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ขี้ผึ้ง (waxs) ไขมัน (fats) น้ำมันหอมระเหย (volatile oils) กรดเรซิ่น (resin acids) ลิกแนน (lignans) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) น้ำตาล (sugars) และแทนนิน (tannins) เป็นต้น (สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536)

สารประกอบในพืชที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมีห้ากลุ่ม ได้แก่ ฟีนอล (phenolics) เทอร์พีนอยด์และน้ำมัน (terpenoids, essential oils) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เลกตินและโพลีเปปไทด์ (lectins, poly peptide) และโพลีอะเซทิลีน (Polyacetylenes) โดยกลุ่มฟีนอลเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดที่มีสารประกอบจำนวนมากชนิดที่สุดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ กรดฟีนอล (phenolic acids) สารประกอบฟีนอล (simple phenols) ควิโนน (quinones) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟลาโวนส์ (flavones) ฟลาโวนอลส์ (flavonols) แทนนิน (tannins) และคูมาริน (coumarins) (Cowan, 1999)

ในบรรดาสารประกอบในพืชที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้น แทนนินเป็นชนิดที่มีคุณสมบัติในการสมานแผล (astringents) (Scalbert, 1991)และต้านการอักเสบด้วย (anti-inflamation) (Chattopadhyay *et al*., 2002; Nagappa *et al*., 2003; Fan *et al*., 2004; Chyau *et al*., 2006) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อหลายชนิด ได้แก่ เซลลูเลส (cellulases) เพคติเนส (pectinases) ไซลาเนส (xylanases) เพอรอคซิเดส (peroxidase) แลคเตส (lactase) (Scalbert, 1991) นอกจากนี้ แทนนินยังพบได้ในพืชแทบทุกชนิด มีการกระจายตัวของแทนนินในธรรมชาติในพืชแทบทุกวงศ์ ยกเว้นในพืชชั้นต่ำ เช่น รา สาหร่าย มอสส์ ตลอดจนหญ้าต่าง ๆ ในบรรดาพืชวงศ์ต่าง ๆ นั้น พืชในสกุลที่พบว่ามีแทนนินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญมาก ได้แก่ *Acacia, Castanea, Hamamelis, Quercus, Rosa, Pterocarpus, Rhus และ Terminalia* (Irene, 2001; สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536)

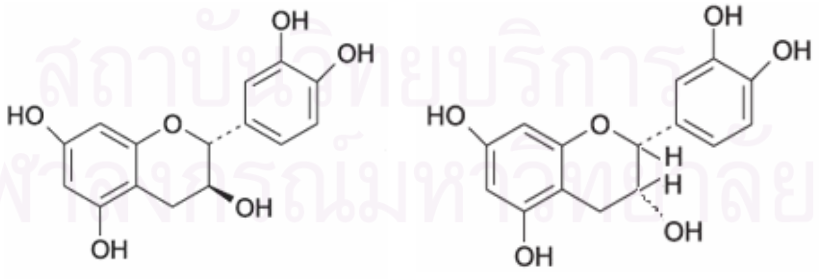
แทนนินเป็นสารประกอบฟีนอลที่ได้จากธรรมชาติ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500 – 3,000 มีหมู่ฟีนอลลิกไฮดรอกซิล (phenolic hydroxyl) อยู่ประมาณ 1 - 2 ต่อ 100 หน่วยน้ำหนักโมเลกุล ที่สามารถเกิดการเชื่อมโยงได้กับสารโปรตีน และสารไบโอโพลิเมอร์ เช่น เซลลูโลส และเพกติน ได้สารใหม่ที่มีคุณสมบัติคงตัว (Gustavson, 1954 อ้างโดย สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536; Scalbert, 1991; Cowan, 1999) แทนนินได้มาจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือก ใบ ผล เปลือกผล เป็นต้น ในขณะที่พืชมีชีวิตอยู่แทนนินจะถูกสร้างขึ้นในรูปสารละลายรวมอยู่ในโปรโตพลาสม (protoplasm) และแวคคิวโอของเซลล์ (cell vacuole) เมื่อเซลล์ตายแล้วโปรโตพลาสมจะสลายตัวแทนนินจะถูกดูดอยู่ในผนังเซลล์ (สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536)

แทนนินมีคุณสมบัติหลายประการได้แก่การจับเป็นสารประกอบกับโปรตีน (proteins binding) ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (covalent bond) ทำให้เกิดสารประกอบที่คงตัวและไม่ละลายน้ำ (hydrophobic effects) (Cowan, 1999) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งอาจเกิดจากการจับตัวที่ผิวเซลล์แบคทีเรีย (adhesions) หรืออาจเกิดจากการจับกับโมเลกุลของโพลีแซคคาร์ไรด์ (polysaccharide) ที่ผิวเซลล์ ทำให้การส่งผ่านโปรตีน หรือการสร้างผนังเซลล์ผิดปกติ หรืออาจมีพิษต่อเซลล์ หรือมีผลยับยั้งการเจริญและพัฒนาโครงสร้างเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรง (Cowan, 1999) หรือออกฤทธิ์คล้ายยาปฏิชีวนะ (Scalbert, 1991; Chung *et al*., 1998a; Chung *et al*., 1998b; Akiyama *et al*., 2001; Kloucek *et al*., 2005) แทนนินมีผลต่อขบวนการเมตาบอลิสมของแบคทีเรีย (Scalbert, 1991) โดยจับกับเหล็ก (iron) ให้อยู่ในรูปของ unavailable iron ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการสร้างสารพันธุกรรม (RNA และ

DNA) หรือสร้างเซลล์ใหม่ได้ (Chung *et al*., 1998b; Akiyama *et al*., 2001) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่บริโภคอาหารที่มีแทนนินสูงและมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอาจมีประสิทธิภาพการย่อยและมีความอยากอาหารลดลงเนื่องจากแทนนินจะจับกับโปรตีนเกิดสารประกอบที่ย่อยได้ยากขึ้น เมื่อแทนนินจับกับไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ในน้ำลายจะทำให้สัตว์มีความอยากอาหารลดลง (Giner, 1966) แทนนินมีผลลดการเจริญเติบโตต่อจุลชีพหลายชนิดในกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น *Streptococcus bovis, Butyvibrio fibrosolvens, Fibrobacter succinogenes, Prevotella ruminicola,* และ *Ruminobacter amylophilis* (Giner, 1966) *S. gallolyticus* และ *S. bovis* (Donovan and Brooker, 2001)

แทนนินแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ โปรแอนโทไซยานิดินส์ (proanthocyanidins) หรือคอนเดนซ์แทนนินส์ (condensed tannins) และไพโรแกลลอล (pyrogallol) หรือไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน (hydrolysable tannins) หรือแทนนินชนิดละลายน้ำ (water-soluble tannins) (Stafford, 1988; Scalbert, 1991; Bandaranayake, 2002; Hagerman, 2002)

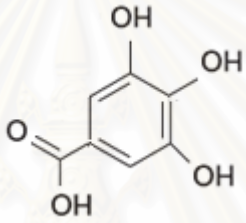
1. Condense tannins หรือ proanthocyanidins (Pas) เป็นแทนนินชนิดรวมตัวแน่นเป็นโพลิเมอริคโพลีฟีนอล (polymeric polyphenols) ที่คงทนต่อการเกิดปฏิกิริยา hydrolytic degradation ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือด่าง ละลายได้ดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และอะซีโตน ชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ catechin และ epicatechin มีโครงสร้างทางเคมี ดังนี้



catechin epicatechin

2. Hydrolysable tannins (Hts) คือ แทนนินที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบโพลิฟีนอล (polyphenol) ที่ซับซ้อน ซึ่งจะสลายตัวได้เมื่อทำการแยกด้วยน้ำ แทนนินชนิดนี้เป็นเอสเทอร์(esters)ระหว่างน้ำตาลหนึ่งโมเลกุลกับกรดโพลิฟีนอลลิกคาร์บอกซิลิก

(polyphenolic carboxylic acids) อีกหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งโมเลกุล น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบมักเป็นกลูโคสเกิดการเชื่อมโยงแบบเอสเทอร์ที่เรียกว่าเดบไซด์ลิงเกจ (depside linkages) ทำให้แทนนินสามารถถูกไฮโดรไลซ์แยกออกได้ด้วยกรด ด่าง และเอนไซม์บางชนิด แทนนินชนิดนี้สามารถแยกออกได้อีกสองชนิด คือ แกลโลแทนนิน (gallo tannins) และเอลลาจิแทนนิน (ellagitannins) โดยแกลโลแทนนินเมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะให้กรดแกลลิค (gallic acid, 3,4,5 -trihydroxyl benzoic acid) ส่วนเอลลาจิแทนนินเมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะให้กรดเอลลาจิก (ellagic acid) (Hagerman, 2002) gallic acid มีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังนี้



gallic acid

พืชในสกุล combretaceae ในวงศ์ *Terminalia* sp. มีกรดแทนนิคชนิด ellagitannins (Irene, 2001; สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536) ซึ่งเป็น hydrolysable tannins โดยเป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากการเมตาบอไลท์ gallic acid พืชในสกุลอื่น ๆ ที่มีกรดแทนนิคชนิด ellagitannins เช่น Myrtacceae (*Eucalyptus* sp.) เป็นต้น

การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบของหูกวางพบว่าการสกัดเปลือกของลำต้นหูกวางด้วยอะซีโตนจะได้สารสกัดต่าง ๆ ได้แก่ แทนนินชนิดรวมตัวแน่น (complex type tannin) 5 ชนิด phenolcarboxylic acids 2 ชนิด phenol glucoside gallates 2 ชนิด ellagictannins 7 ชนิด hydrolysable tannin 1 ชนิด และ flavan-3-ols 1 ชนิด (gallic acid, ellagic acid, 2,3-(*S*)-HHDP-D-glucose, punicalagin, corilagin, tercatain, casuarinin, castalagin, grandinin, castalin,3-methoxy-4-hydroxyphenol-1-*O*-b-D-(6é-*O*-galloyl)-glucoside, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenol-1-*O*-b-D-(6é-*O*-galloyl)-glucoside, epi-catechin-3-*O*-gallate, epigallocatechin-3-*O*-gallate, procyanidin B-1, 3é-*O*-galloyl procyanidin B-2, acutissimin A และ eugenigrandin A) (Lin *et al*., 1999) สารประกอบที่ได้จากใบหูกวางแห้งที่นำมาแช่น้ำแล้ว

นำมาสกัดด้วยเอทานอล ได้แก่ glucosides 2 ชนิด flavonoid glycosides 4 ชนิด isovitexin, vitexin, isoorientin, rutin, gallic acid และ ellagic acid. (Lin *et al*., 2002)

การที่เกษตรกรนำใบหูกวางมาใช้ในการเลี้ยงปลาโดยนำใบหูกวางแห้งใส่ลงในน้ำเลี้ยงปลาโดยตรงหรือแช่น้ำไว้แล้วนำน้ำที่มีสีน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการเลี้ยงปลาเป็นการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสารประกอบที่มีอยู่ในใบหูกวางโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยสารเคมีใด น่าจะเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ได้และอาจมีผลในการรักษาโรคปลาตามวิธีที่ใช้อยู่นั้น คือ hydrolysable tannin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่มีผลในการสมานแผลและต้านจุลชีพ ทำให้ปลาที่เลี้ยงมีผิวหนังแข็งแรง บาดแผลหายเร็ว อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีรายงานการศึกษาคุณสมบัติอื่นใดของน้ำสกัดใบหูกวางทางกายภาพและชีวภาพต่อการรักษาโรคปลาสวยงามโดยตรง

2.3 วิธีการศึกษา

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวาง คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของน้ำสกัดใบหูกวางและศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง (LC_{50}96hr) สถานที่ทดลองคือศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการมีดังต่อไปนี้

2.3.1 สมุนไพร : ใบหูกวาง

ใบหูกวางที่ใช้ในการทดลอง หมายถึง ใบหูกวางที่ได้รับการตรวจสอบพันธุ์พืชแล้ว จากสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ว่าเป็นใบจากต้นหูกวาง (*Terminalia catappa L.*) โดยทำการเก็บรวบรวมใบหูกวางแห้งที่ร่วงใหม่ ๆ ไม่แยกสีใบจากใต้ต้นหูกวางภายในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2548 และเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 โดยเลือกเก็บในวันที่ท้องฟ้าแจ่มใส ไม่มีฝนตก นำใบที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละวันมาเช็ดทำความสะอาดและอบแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บไว้ในถุงพลาสติกใสที่อุณหภูมิ 30 - 31 องศาเซลเซียส แบ่งใบหูกวางออกเป็น 6 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บไว้ใช้ใน

การสกัดสารเพื่อใช้ในการทดลอง ส่วนที่ 2 นำส่งตรวจสอบพันธุ์พืชที่สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ประเทศไทย ส่วนที่ 3 - 6 ส่งตรวจวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวางที่ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ได้แก่

1. ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี
3. Laboratory of Fish Management, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan

2.3.2 สมุนไพร : น้ำสกัดใบหูกวาง

น้ำสกัดใบหูกวางที่ใช้ในการทดลอง เตรียมโดยการนำใบหูกวางแห้งมาชั่งน้ำหนักตามความเข้มข้นที่ต้องการในแต่ละการทดลอง โดยใช้ใบหูกวางที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ล้างในสารละลายด่างทับทิมเจือจาง 5 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง แล้วบรรจุใบหูกวางทั้งหมดลงในถุงผ้าใยสังเคราะห์ นำไปแช่น้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนในภาชนะสะอาดตามปริมาตรที่ต้องการ ในการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ ทำการเตรียมน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (มิลลิกรัม/ลิตร) ได้นำใบหูกวางแห้ง 500 กรัม แช่ในน้ำประปาปราศจากคลอรีน 500 ลิตร โดยแช่ใบหูกวางไว้เป็นเวลา 3 วัน เขย่าถุงผ้าที่ใส่ใบหูกวางวันละ 1-2 ครั้ง ทุกวัน เมื่อครบ 3 วัน นำถุงผ้าที่ใส่ใบหูกวางออก นำน้ำสกัดใบหูกวางมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ จากนั้นนำน้ำสกัดใบหูกวางที่เหลือมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องอบแรงดันไอน้ำ(autoclave) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 มิลลิเมตรปรอท จะได้น้ำสกัดใบหูกวางที่สามารถนำไปใช้ในการทดสอบ minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อเตตร้าไฮมีนา

2.3.3 สัตว์ทดลอง : ปลากัด และปลาหางนกยูง

ปลากัด (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ที่ใช้ในทุกการทดลอง หมายถึง ปลากัดคละเพศ ขนาดเฉลี่ย 3.5 เซนติเมตร และปลาหางนกยูงคละเพศ ขนาด

เฉลี่ย 3.0 เซนติเมตร ซึ่งเป็นปลาที่โตเต็มวัย มีสุขภาพดี ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูง และฟาร์มเลี้ยงปลากัด ในจังหวัดนครปฐม นำมาพักปรับสภาพในตู้ปลาหรือถังใยแก้วสังเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการทดลองทำการสุ่มตรวจผิวหนังของปลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบการติดเชื้อปรสิตใด ๆ

2.3.4 วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวาง

1. วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ในใบหูกวางเปรียบเทียบระหว่างใบสีแดงและสีเหลือง วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ และแร่ธาตุที่น่าจะเป็นองค์ประกอบที่มีมากและมีคุณสมบัติใดคุณสมบัติหนึ่ง ได้แก่ สมานแผล (astringent) เคลือบผิว (cytoprotective) ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (antioxidant) ต้านการอักเสบ (antiinflammation) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) ได้แก่ tannin, rutin, isoquercitrin, Cu และ Zn โดยตรวจวิเคราะห์ tannin ในรูปของ tannic acid โดยวัดเป็น total phenolic compound ที่ทำการสกัดด้วยอะซีโตน และวิเคราะห์ด้วย Folin-Denis และ Folin - Ciocalteau′s reagent (Harvey, 2001) สกัด rutin และ isoquercitrin ด้วยเมทานอล และตรวจวิเคราะห์ ด้วยวิธี LC-MS วิเคราะห์ Cu และ Zn โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Laboratory of Fish Management, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan) แต่ละตัวอย่างตรวจ 4 ซ้ำ
2. วิเคราะห์ปริมาณกรดแทนนิคของใบหูกวางเปรียบเทียบระหว่างใบสีแดง และใบสีเหลือง วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ปริมาณสังกะสี โดยส่งตรวจที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี (Thai Herbal Pharmacopoeia volume I, 2544) แต่ละตัวอย่างตรวจ 1 ซ้ำ

2.3.5 วิธีการหาปริมาณกรดแทนนิคในน้ำสกัดใบหูกวาง (AOAC, 1990; Nwanna *et al*., 2005)

1. นำน้ำสกัดใบหูกวางมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 75 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Folin - Ciocalteau′s ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณกรดแทนนิคในสารละลาย
3. วิธีการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)
    a. เตรียมสารละลายกรดแทนนิคมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกรดแทนนิคมาตรฐาน 2 , 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตรใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ทุกครั้ง
    b. เติมสารละลาย Folin - Ciocalteau′s ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.6 วิธีการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของน้ำสกัดใบหูกวาง

ทำการเตรียมน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ศึกษาคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพของน้ำสกัดใบหูกวาง ในวันที่ 0, 3 และ7 โดยคุณสมบัติทางกายภาพที่ศึกษา ได้แก่ สี กลิ่น รส ความขุ่นใส โดยการสังเกต และการใช้ประสาทสัมผัส ความถ่วงจำเพาะวัด

ด้วย refractometer คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ พีเอช อัลคาไลนิตี้ ความกระด้าง แอมโมเนีย ไนเตรท ไนไตรท์ วัดด้วย Ion analyzer คุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ แพลงค์ตอนพืช แพลงค์ตอนสัตว์ โดยการสังเกต และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ใช้วิธี pour plate method เมื่อครบ 7 วัน แยกใบหูกวางออก แต่ยังคงศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางต่อในวันที่ 14 และ 21 แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ

2.3.7 วิธีการทดสอบค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแบคทีเรีย

1. เตรียมน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 10,000 พีพีเอ็ม ตามวิธีที่ระบุไว้ข้างต้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องอบแรงดันไอน้ำ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 มิลลิเมตรปรอท นำมาปรับความเข้มข้นด้วยน้ำประปากรองเรซิ่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยผ่านการอบด้วยแรงดันไอน้ำเช่นเดียวกัน ปรับให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 400, 600, 800, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000 พีพีเอ็ม นำน้ำใบหูกวางแต่ละความเข้มข้นมาทำการวัดค่าความขุ่น (optical density, OD) โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร บันทึกผล
2. นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas spp.* จำนวน 7 สายพันธุ์ (A0003, A0104, A0204, A0305, A0405, A0506 และ A0606) โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococus dysgalactiae* จำนวน 2 สายพันธุ์ *(Streptococus agalactia* และ *S.dysgalactia)* ใส่ลงในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline, NSS) หลอดละ 1 สายพันธุ์ ปั่นหมุนด้วยความเร็วต่ำด้วยเครื่อง vortex ปรับความขุ่นให้ตรงกับ 0.5 McFarland ทำการเจือจางสิบเท่า (10 fold dilution) ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ เตรียมสารละลายเชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10^{-4} – 10^{-10} จากนั้นนำมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (tryptic soy agar) เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น

3. ทำการทดสอบค่า MIC ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ที่ความขุ่น 0.5 McFarland ทำให้เจือจาง 1 เท่าด้วย NSS แล้วนำเชื้อที่ได้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Muller Hinton Medium (MHM) ที่ผสมน้ำสกัดใบหูกวางที่ 0, 400, 600, 800, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 และ 5,000 พีพีเอ็ม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อเชื้อแบคทีเรีย คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยไม่พบเชื้อเจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.8 วิธีการทดสอบค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อเตตร้าไฮมีนา

1. เตรียมน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 10,000 พีพีเอ็ม ตามวิธีที่ระบุไว้ข้างต้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องอบแรงดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 มิลลิเมตรปรอท
2. เติมน้ำสกัดใบหูกวางลงใน 24 well plate โดยปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 147, 303, 588, 1,111, 2,000, 3,333, 5,000, 6,600 และ 8,000 พีพีเอ็ม
3. เตรียมเชื้อเตตร้าไฮมีนา 5 สายพันธุ์ (TC106,TC206,TC306,TR106,TA103 และ TF103) ปรับให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 800 เซลล์/มิลลิลิตร นำเชื้อเตตร้าไฮมีนาแต่ละสายพันธุ์เติมลงใน 24 well plate ที่มีน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังกล่าว ช่องละ 20 ไมโครลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เตตร้าไฮมีนาภายในระยะเวลา 30 นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยเซลล์จะเปลี่ยนเป็นรูปร่างกลม บวม และแตกในที่สุด โดยค่า MIC ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อเตตร้าไฮมีนา คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำสกัดใบหูกวางที่ยังสามารถสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงใกล้ตายของเซลล์ได้

2.3.9 วิธีการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด (LC_{50} 96 hr)

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด ทำโดยการเตรียมขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมขนาด 1 ลิตร บรรจุน้ำสกัดใบหูกวางปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0, 1,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000 และ 10,000 พีพีเอ็ม นำปลากัดมาใส่ลงในขวดแก้วที่มีน้ำสกัดใบหูกวางที่เตรียมไว้ขวดละ 1 ตัว ความเข้มข้นละ 10 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ไม่มีการให้อาหารหรือเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง สังเกต ความผิดปกติ และบันทึกจำนวนปลาตายทุกวันเป็นเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่า LC_{50} 96 hr โดยวิธี probit analysis

2.3.10 วิธีการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง (LC_{50} 96 hr)

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง ทำโดยการเตรียมขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมขนาด 1 ลิตร เติมน้ำสกัดใบหูกวางปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 5,000, 6,000 และ 7,000 และ 8,000 พีพีเอ็ม นำปลาหางนกยูงมาใส่ลงในขวดแก้วที่มีน้ำสกัดใบหูกวางที่เตรียมไว้ ขวดละ 5 ตัว ความเข้มข้นละ 10 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ไม่มีการให้อาหารหรือเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง สังเกต ความผิดปกติ และบันทึกจำนวนปลาตายทุกวันเป็นเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่า LC_{50} 96 hr โดยวิธี probit analysis

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวาง

ผลการตรวจที่ Laboratory of Fish Management, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology ประเทศญี่ปุ่น โดยทำการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในใบหูกวาง จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กรดแทนนิค (tannic acid) รูติน (rutin) ไอโซเคอร์-

ซิตริน (isoquercitrin) ทองแดง (copper; Cu) และสังกะสี (zinc; Zn) ได้ค่าเฉลี่ยดังตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2 โดยปริมาณที่ตรวจพบจากน้ำหนักใบแห้งพบว่าใบหูกวางสีแดงมีปริมาณกรดแทนนิค รูติน ไอโซเคอร์ซิตริน ทองแดง และสังกะสี มากกว่าใบหูกวางสีเหลือง โดยใบสีเหลืองมีปริมาณกรดแทนนิค 14.5±3.2 เปอร์เซ็นต์ รูติน 20±1.6 มิลลิกรัม/100กรัม ไอโซเคอร์ซิตริน 12±1.6 มิลลิกรัม/100กรัม ทองแดง 0.40±0.12 มิลลิกรัม/100กรัม และสังกะสี 2.56±0.71 มิลลิกรัม/100กรัม ในขณะที่ใบสีแดงมีปริมาณกรดแทนนิค 16.7±2.6 เปอร์เซ็นต์ รูติน 42.5±5.8 มิลลิกรัม/100กรัม ไอโซเคอร์ซิตริน 25±2.99 มิลลิกรัม/100กรัม ทองแดง 0.46±0.1 มิลลิกรัม/100กรัม และสังกะสี 2.37±0.34 มิลลิกรัม/100กรัม

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบหูกวางสีเหลือง และสีแดงคำนวณจากน้ำหนักใบแห้ง

parameter	mean ± SD	
	yellow leaf	red leaf
Tannic acid (%)	14.5±3.2	16.7±2.6
Rutin (mg/100g)	20±1.6	42.5±5.8
Isoquercitrin (mg/100g)	12±1.6	25±2.99
Cu (mg/100g)	0.40±0.12	0.46±0.1
Zn (mg/100g)	2.56±0.71	2.37±0.34

เมื่อทำการสกัดใบหูกวางโดยไม่แยกสีใบด้วยน้ำประปาที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารออกฤทธิ์ที่ได้มีปริมาณน้อยมากและมีกรดแทนนิคเพียงชนิดเดียวที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ โดยตรวจพบเพียง 0.04 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารสกัดจากใบหูกวางที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ

parameter	extracts	detection limits
Tannic acid (%)	0.04	-
Rutin (mg/100g)	Not detected	0.5
Isoquercitrin (mg/100g)	Not detected	0.5
Cu (mg/100g)	Not detected	0.01
Zn (mg/100g)	Not detected	0.05

ส่วนการวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ที่ดำเนินการที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี พบว่าใบหูกวางสีแดงมีปริมาณกรดแทนนิครวมเฉลี่ย 18.76 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบสีเหลืองมีปริมาณกรดแทนนิครวมเฉลี่ย 15.57 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำเฉลี่ย 15.15 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดด้วยเอทานอลเฉลี่ย 11.53 เปอร์เซ็นต์ สังกะสีเฉลี่ย 4.39 มิลลิกรัม/100กรัม (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 **ปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบหูกวางสีเหลือง และสีแดง**

extraction	yellow leaf	red leaf
Tannic acid (%)	15.57	18.76
สารสกัดด้วยน้ำทั้งหมด (%)	15.15	-
สารสกัดด้วยเอทานอลทั้งหมด (%)	11.53	-
สังกะสี (mg/100g)	4.39	-

ปริมาณ และชนิดของแทนนินที่ตรวจพบในพืชจะมากหรือน้อยขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ วิธีการสกัด อุณหภูมิที่ใช้ ชนิดของตัวทำละลาย ชนิดของพืช แหล่งที่ปลูก ภูมิอากาศ เกลือแร่และธาตุอาหารในดิน รวมถึงอายุของกิ่ง ก้าน และใบของพืช (Hargermann, 1988) การตรวจวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวางแห้งในการศึกษานี้ พบว่ามีแทนนินเป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีปริมาณเฉลี่ย 14.5-16.7 เปอร์เซ็นต์ ในใบสีเหลืองและใบสีแดงตามลำดับ เมื่อทำการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน น้ำสกัดใบหูกวางที่ได้จะมีปริมาณแทนนิน 0.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบได้น้อยกว่าในเปลือกเงาะที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 30 และ 70 องศาเซลเซียส ที่สกัดแทนนินได้ 43 – 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536) เนื่องจากแทนนินบางชนิดถูกทำลายที่อุณหภูมิสูง และบางชนิดไม่ละลายในตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่ำ วิธีการสกัดแทนนินเพื่อนำไปใช้จึงมีความสำคัญต่อการนำไปใช้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแทนนินในเปลือกไม้สมอ สีเสียด คือ 70 - 80 องศาเซลเซียส โกงกาง 80 - 90 องศาเซลเซียส เป็นต้น (Chuntanaparp *et al*., 1985) อย่างไรก็ดี เนื่องจาก condense tannins เป็นแทนนินชนิดที่ละลายได้ดีในน้ำร้อน และตัวทำละลายอื่น ๆ ถ้าทำการสกัดด้วยอุณหภูมิ และตัวทำละลายอื่น เช่น แอลล์กอฮอล์ หรืออะซีโตน อาจทำให้ได้แทนนินชนิดดังกล่าวในปริมาณมากเกินไป และอาจเป็นชนิดที่มีความเป็นพิษต่อปลา การศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องปกติ โดยเป็นวิธีการใช้เช่นเดียวกับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสวยงาม การสกัดด้วยวิธีดังกล่าวทำให้ได้ปริมาณแทนนินน้อยกว่า แต่แทนนินชนิดที่ได้เป็น

hydrolysable tannin (Stafford, 1988 ; Scalbert, 1991; Bandaranayake, 2002 ; Hagerman, 2002)

แทนนินมีการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีจากปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้มาก และมีรูปแบบหลายชนิด จึงมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น การจับโลหะ (metal chelators) การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) และ การต้านอนุมูลอิสระ (biological antioxidants) และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม การแพทย์ และเภสัชกรรม หลายประการ เช่น การผลิตน้ำหมึก การฟอกหนัง การทำสีย้อม การทำเครื่องสำอาง การสมานแผล การรักษาอาการพุพอง และอาการท้องเดิน เป็นต้น (สุวรงค์ วงษ์ศิริ, 2536) นอกจากนี้ แทนนินยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา (Goun *et al*, 2003) มีคุณสมบัติลดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีน้ำตาลในเลือดสูง (Nagappa *et al*, 2003) การเป็น metal chelators ของแทนนินช่วยลดปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในน้ำ และขัดขวางการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียบางชนิดได้ คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidants) ช่วยทำให้ของเสียที่สะสมในเซลล์ลดลง นอกจากนี้ แทนนินยังมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว โดยการตกตะกอนโปรตีนและดึงน้ำออกจากเซลล์ทำให้ช่องว่างระหว่างเซลล์มีขนาดเล็กลง เซลล์จึงเรียงตัวชิดกันแน่นขึ้น ดังนั้นเมื่อเกิดบาดแผลจึงช่วยทำให้เลือดหยุดได้เร็วขึ้น ลดการบวมของเซลล์ แทนนินสามารถลดการอักเสบของแผลที่ผิวหนังได้โดยทำงานคล้ายกับ antihistamine หรือ antiserotonin (Chattopadhyay *et al*., 2002) โดยยับยั้งขบวนการอักเสบ เช่น เพิ่มจำนวนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และ คอลลาเจน (collagen) ลดการไหลเวียนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) (Fan *et al*., 2004) เมื่อเกษตรกรนำใบหูกวางไปใช้ในการเลี้ยงหรือรักษาบาดแผลที่ผิวหนังปลาจึงอาจมีคุณสมบัติในการสมานแผล ลดการอักเสบ ทำให้เมือกปกคลุมผิวหนัง ลดจำนวนและโอกาสที่ปรสิตหรือแบคทีเรียจะแทรกเข้าสู่ร่างกายปลาได้มากขึ้น

การศึกษาคุณสมบัติและสารออกฤทธิ์ในใบหูกวางมีผู้ทำการศึกษากันมากในทางเภสัชสมุนไพร การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราพบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของใบหูกวางมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา โดยตรวจพบสารประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์ ได้แก่ แทนนิน และเสตอรอลหลายชนิด (Goun *et al*., 2003) ใบหูกวางมีสรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังในมนุษย์ได้ (Lin *et al*., 2001 cited by Goun *et al*., 2003) ส่วนผลของต้นหูกวางที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทานอล และน้ำที่ระดับความเข้มข้น 40 – 68 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าระดับที่เป็นพิษ 5 เท่า ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทได้ 62 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังให้กินเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (Nagappa *et al*., 2003) ใบมีสรรพคุณช่วยขับเหงื่อ บรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย แก้ท้องเสีย รักษา

แผลในช่องปาก ใบอ่อนใช้รักษาอาการปวดศีรษะ และช่วยลดการบีบตัวของลำไส้ (Thompson and Evan, 2006) การศึกษาประสิทธิภาพของหูกวางในสัตว์น้ำนั้น มีการทดลองใช้สารสกัดหยาบจากใบหูกวางที่ความเข้มข้น 800 พีพีเอ็มในการกำจัดปรสิตภายนอกชนิดเห็บระฆังในลูกปลานิลได้ผลดี โดยสารสกัดหยาบมีความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้น 46,665.94 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับที่ต้องมีการใช้ใบหูกวางในปริมาณมากจึงจะมีผลทำให้ลูกปลานิลตายร้อยละ 50 ในเวลา 16 ชั่วโมง (Chitmanat *et al.,* 2005)

2.5 คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ

การศึกษาคุณสมบัติทางด้านกายภาพพบว่า ในวันแรกน้ำสกัดใบหูกวางมีสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไม่มีตะกอนแขวนลอย มีสีน้ำตาล มีกลิ่นและรสขมคล้ายน้ำชาจีน และเปรี้ยวเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป และจากนั้นจะเริ่มมีกลิ่นบูด และเปรี้ยวมากขึ้น (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านกายภาพ

		physical properties of Huukwang leaf extracted water			
parameter	tap water	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14
color	clear	pale yellow	yellowish brown	yellowish brown	yellowish brown
odor	odorless	odorless	Chinese tea like	age tea like	age tea like
taste	no taste	no taste	slightly bitter and sour	slightly bitter and sour	slightly bitter and sour
particle	no particle	no particle	small particle	small particle	small particle

ส่วนคุณสมบัติทางเคมีของน้ำสกัดใบหูกวางแสดงไว้ในตารางที่ 2.5 ซึ่งพบว่าคุณสมบัติทางเคมีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างวันที่ 0 วันที่ 3 วันที่ 7 และวันที่ 14

ตารางที่ 2.5 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านเคมี

	mean ± SD				
parameter	tap water	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14
density d^{20}	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0
pH	6.8±0.5	6.8±0.3	6.9±0.3	7.1±0.1	7.3±0.1
hardness (ppm)	141±34	137±11	151±19	162±7	141±4
alkalinity (ppm)	114±20	139±17	111±39	131±17	114±13
ammonia (ppm)	0.19±0.3	0.15±0.3	0.17±0.2	0.22±0.3	0.21±0.3
nitrite (ppm)	0.00±0	0.00±0	0.01±0	0.00±0	0.00±0
nitrate (ppm)	0.03±0.1	0.00±0	0.30±0.5	0.05±0.1	0.03±0.1

ในระหว่างการศึกษาคุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านชีวภาพดังตารางที่ 2.6 ไม่มีการปนเปื้อนของแพลงค์ตอนพืชและแพลงค์ตอนสัตว์ แต่พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในวันที่เริ่มทดสอบมีน้อยและจะเพิ่มมากขึ้นถึง 10^7 cfu/mL ในวันที่ 3และเพิ่มมากขึ้นถึง 10^{10} cfu/mL ในวันที่ 14ของการสกัด

ตารางที่ 2.6 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้านชีวภาพ

	mean ± SD				
parameter	tap water	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14
phytoplankton	not found	not found	not found	not found	not found
zooplankton	not found	not found	not found	few	few
total bacterial count (cfu/mL.)	9.57×10^2 ± 18×10^2	1.1×10^4 ± 1.1×10^4	3.5×10^7 ± 3.0×10^7	9.7×10^8 ± 1.2×10^9	1.5×10^{10} ± $1.4.0 \times 10^{10}$

จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางด้านกายภาพของน้ำสกัดใบหูกวางที่ 1,000 พีพีเอ็ม ในระยะเวลาการสกัดตั้งแต่ 0 – 14 วัน พบว่า น้ำสกัดใบหูกวางมีสีน้ำตาลจาง ในวันที่ 1 และมีสีเข้มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น แต่เมื่อใช้เวลาสกัดนาน 3 วัน จะเป็นช่วงเวลาที่ปริมาณสารที่ละลายออกจากใบมีปริมาณสูงที่สุดที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่าจากการดูคุณสมบัติของน้ำสกัดใบหูกวางด้วยตาเปล่า ถึงแม้จะพบว่ามีตะกอนแขวนลอยสีดำขนาดใหญ่ขึ้น แต่อาจเกิดจากการฉีกขาดของใบหูกวางที่แช่น้ำเป็นเวลาหลายวันจึงมีความเปื่อยยุ่ยรวมกับฝ้าสีเงินที่เกิดขึ้นบริเวณผิวน้ำ สำหรับคุณสมบัติทางเคมีนั้นพบว่าในระยะ 3 วันแรกน้ำสกัดที่ได้มีความเป็นกรดด่างต่ำและจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาสกัดนานขึ้น เช่นเดียวกับค่าความกระด้างที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น โดยจะเพิ่มสูงขึ้นมากในวันที่3ของการสกัดและจะมีค่าลดลงเมื่อเก็บน้ำสกัดใบหูกวางไว้นาน 3 สัปดาห์ ค่าอัลคาไลนิตี้ไม่แตกต่างกันในขณะที่แอมโมเนียในน้ำสกัดมีค่าระหว่าง 0-0.22 พีพีเอ็ม ค่าไนไตรท์มีค่าสูงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อใช้เวลาสกัดนานขึ้น ทั้งนี้ค่าไนเตรตไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการสกัด สำหรับคุณสมบัติด้านชีวภาพได้ทำการวัดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำสกัดใบหูกวางพบว่าสามารถตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในปริมาณน้อยในน้ำสกัดใบหูกวางในวันที่ 0 และเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ดังนั้นหากเกษตรกรจะนำใบหูกวางไปใช้จะต้องแยกใบหูกวางออกจากบ่อเลี้ยงปลาภายในเวลาไม่นานเกิน 3 วัน เนื่องจากการใส่ใบหูกวางลงในบ่อเลี้ยงปลานานเกินกว่านั้นจะทำให้มีแบคทีเรียในน้ำเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบ่อเลี้ยงปลาที่มีเศษอาหารปลาและมูลปลาตกค้างซึ่งมีสภาพเหมาะสมและเป็นอาหารสำหรับการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย การตรวจปริมาณแพลงตอนสัตว์และแพลงตอนพืชในน้ำสกัดใบหูกวางที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตรวจพบแพลงตอนสัตว์ขนาดเล็กได้ในจำนวนน้อยในวันที่ 7 และวันที่ 14 ของการสกัด ซึ่งอาจเกิดจากการเจริญของซีสต์ที่ติดมากับใบหูกวางแห้งเมื่อได้รับความชื้นเพียงพอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 การทดสอบค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) **ของน้ำสกัดใบหูกวาง**

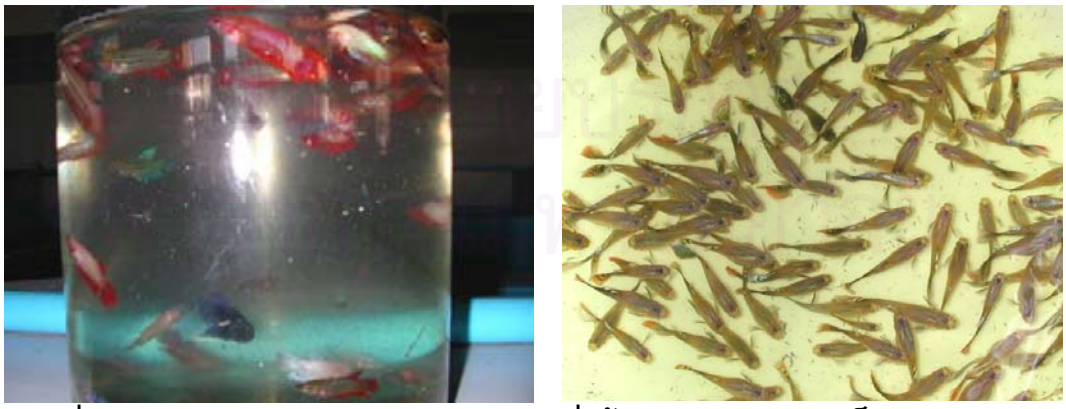
Minimal inhibitory concentration ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแอร์โรโมนาส *(Aeromonas spp.)* และเสตรปโตคอคคัส (*Streptococus spp.*) ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1,000 พีพีเอ็ม และ 4,000 พีพีเอ็ม สำหรับค่า minimal inhibitory concentration ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อเตตร้าไฮมีนา(*Tetrahymena spp.*)ที่ 30 นาที เท่ากับ 2,000 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 2.7)

ตารางที่ 2.7 **ผลการทดสอบ** Minimal Inhibitory Concentration (MIC) **ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อเตตร้าไฮมีนา**

test microorganisms	minimal inhibitory concentration (ppm)
Aeromonas spp.	1,000
Streptococus spp.	4,000
Tetrahymena spp.	2,000

2.7 การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง (LC $_{50}$ 96 hr)

การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง พบว่าความเข้มข้นของน้ำสกัดใบหูกวางที่ทำให้ปลากัด และปลาหางนกยูงตาย 50 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 96 ชั่วโมง (LC $_{50}$ 96 hr) เท่ากับ 6,761 พีพีเอ็ม และ 5,281 พีพีเอ็ม ตามลำดับ (ตารางที่ 2.8 และตารางที่ 2.9) โดยปลากัดที่ได้รับพิษจากการใช้ใบหูกวางในปริมาณที่สูงเกินกว่าระดับ LC_{50} แสดงอาการผิดปกติ โดยการว่ายขึ้นมาที่ผิวน้ำเพื่อฮุบอากาศในอัตราความถี่มากขึ้น บริเวณลำตัวมีเมือกมาก อาจพบตะกอนสีดำเกาะติดผิวหนัง เกล็ดพอง บางตัวนอนนิ่งที่พื้นตู้ ในปลาหางนกยูงก็เช่นเดียวกัน พบว่าปลาที่ได้รับน้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินค่า LC_{50} มีเมือกมากขึ้นและพยายามว่ายน้ำขึ้นมาหายใจบริเวณผิวน้ำ ปลาหางนกยูงบางตัวมีครีบหางเปื่อยและฉีกขาดมากขึ้น



ภาพที่ 2.4 **ปลากัดและปลาหางนกยูงปกติที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวาง**

ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด และปลาหางนกยูง (LC_{50} 96 hr) ที่ศึกษาในครั้งนี้เท่ากับ 6,760 พีพีเอ็ม และ 5,281 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับความเป็นพิษที่ไม่รุนแรง หมายความถึง การใช้ใบหูกวางในปริมาณ 6,760 กรัม และ 5,281 กรัม (6.7- 5.2 กิโลกรัม) ในน้ำ 1,000 ลิตร จึงจะมีผลทำให้ปลากัด และปลาหางนกยูงตายร้อยละ 50 ในเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อคิดเป็นปริมาณแทนนินที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว วิธีการสกัดด้วยน้ำตามวิธีที่ใช้ในการศึกษา (ปริมาณกรดแทนนิค 0.04 mg %) ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวจะมีปริมาณแทนนิน 2.7 มิลลิกรัม และ 2.1 มิลลิกรัม ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่าน้ำสกัดใบหูกวางมีพิษในระดับต่ำต่อปลาทั้งสองชนิด

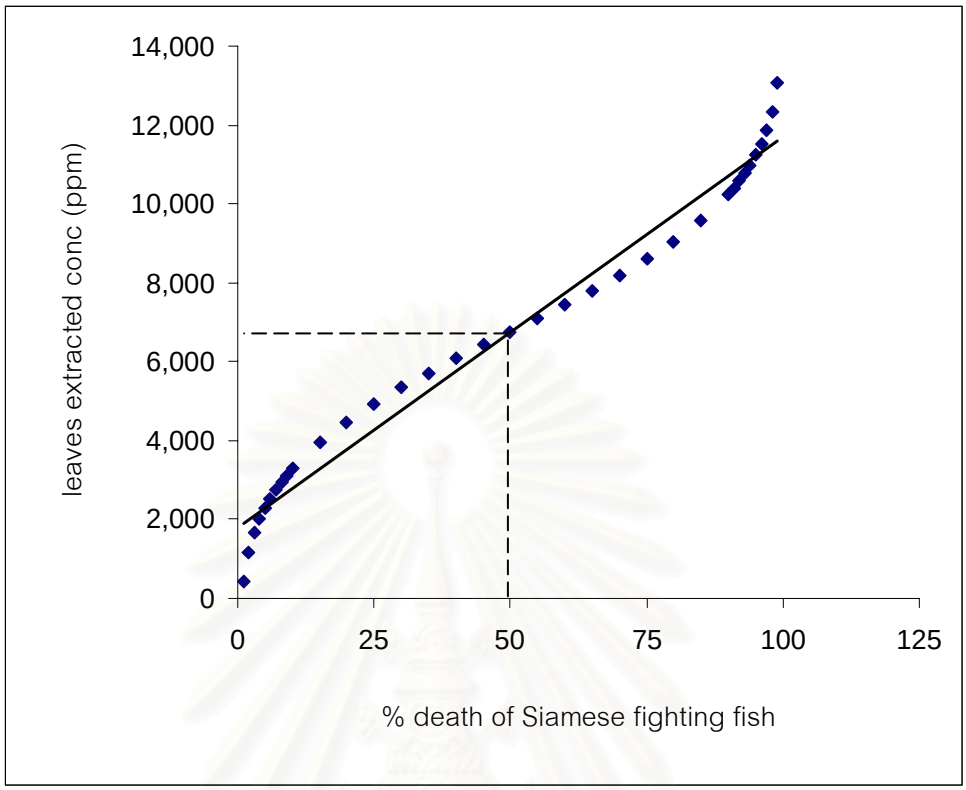
ตารางที่ 2.8 การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด (*LC_{50} 96 hr)

concentration (ppm)	mortality (n)
0	1 (30)
1,000	3 (30)
5,000	5 (30)
6,000	9 (30)
7,000	15 (30)
8,000	18 (30)
9,000	25 (30)
10,000	30 (30)

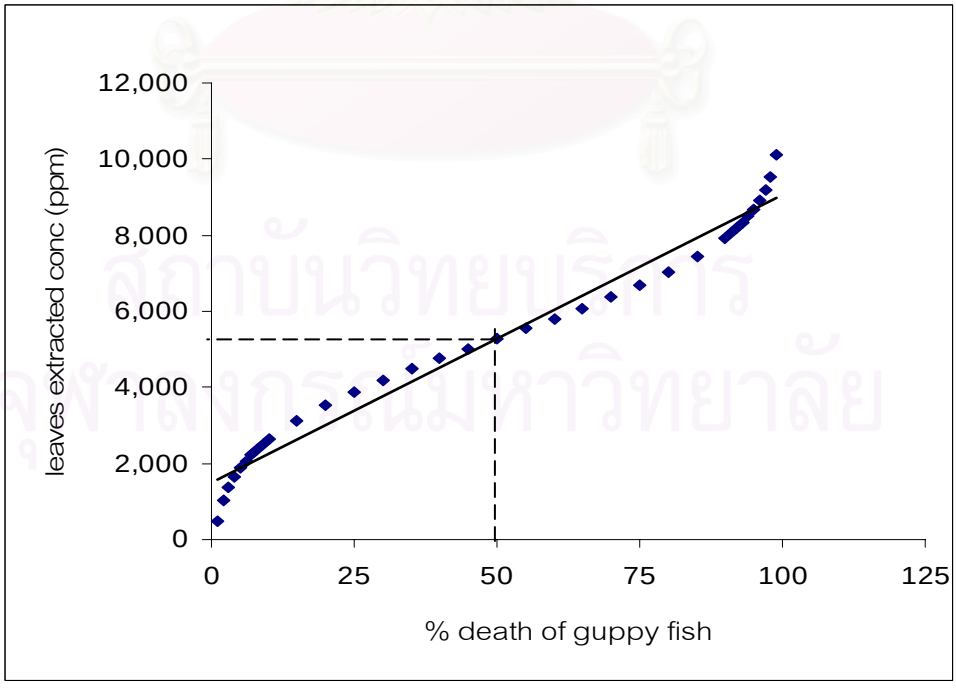
ตารางที่ 2.9 การศึกษาความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง (*LC_{50} 96 hr)

concentration (ppm)	mortality (n)
0	2 (50)
500	3 (50)
1,000	2 (50)
2,000	3 (50)
4,000	7 (50)
5,000	9 (50)
6,000	29 (50)
7,000	49 (50)
8,000	50 (50)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.5 **ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัด** (*LC_{50} 96 hr)



ภาพที่ 2.6 **ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลาหางนกยูง** (*LC_{50} 96 hr)

อย่างไรก็ดี การที่ปลาทั้งสองชนิดแสดงอาการผิดปกติโดยลอยขึ้นมาที่ผิวน้ำบ่อยครั้งขึ้น และตรวจพบตะกอนเกาะตามลำตัวและซี่เหงือก น่าจะเกิดจากการระคายเคืองจากการสะสมของสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงบริเวณเหงือก ขัดขวางกระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบหายใจของปลา (Treves-Brown, 2000) ถึงแม้น้ำสกัดใบหูกวางจะมีความเป็นพิษต่อปลากัดและปลาหางนกยูงในระดับต่ำเนื่องจากต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูงมากถึงประมาณ 5,000 พีพีเอ็ม แต่เนื่องจากระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (MIC) ที่น้ำสกัดใบหูกวางสามารถยับยั้งแอร์โรโมนาส สเตรปโตคอคคัสและเตตร้าไฮมีนามีค่าสูงถึง 1,000, 4,000 และ 2,000 พีพีเอ็ม ดังนั้นหากจะนำใบหูกวางมาใช้โดยตรงเพื่อยับยั้งเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสามชนิดดังกล่าวในปลาที่เลี้ยงในน้ำ 1,000 ลิตร ต้องใช้ใบหูกวางปริมาณมากถึง 1,000 - 4,000 กรัม (1–4 กิโลกรัม) จากการศึกษาของ Pawar และ Pal ในปี 2002 พบว่าระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ที่สารสกัดรากของต้นหูกวางที่ทำการสกัดด้วยเมทานอลสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอีโคไล (*E.coli*) ได้ คือที่ระดับความเข้มข้น 0.065 mg/ml (65 พีพีเอ็ม) และถ้าสกัดด้วยคลอโรฟอร์มสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ได้ คือที่ระดับความเข้มข้น 0.04 mg/ml (40 พีพีเอ็ม)

2.8 สรุป

น้ำสกัดใบหูกวางมี hydrolysable tannin เป็นองค์ประกอบหลัก โดยตรวจพบปริมาณเฉลี่ยในใบสีเหลือง 14.5 เปอร์เซ็นต์ และใบสีแดง 16.7 เปอร์เซ็นต์ น้ำสกัดใบหูกวางที่สกัดได้มีสีน้ำตาล กลิ่นและรสขมคล้ายน้ำชาจีน แต่จะมีรสเปรี้ยวและบูดเมื่อเก็บน้ำสกัดไว้นานเกิน 3 วัน น้ำสกัดใบหูกวางมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนสูงมากในวันที่ 3 เป็นต้นไปโดยพบในปริมาณ $3.5x10^{7}$ cfu/mL น้ำสกัดใบหูกวางมีความเป็นพิษต่อปลากัด (LC_{50}96hr) ที่ระดับความเข้มข้น 6,761 พีพีเอ็มและมีความเป็นพิษต่อปลาหางนกยูง (LC_{50}96hr) ที่ระดับความเข้มข้น 5,281 พีพีเอ็ม น้ำสกัดใบหูกวางสามารถยับยั้งเชื้อแอร์โรโมนาสและเสตรปโตคอคคัสที่เวลา 24 ชั่วโมงได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด1,000 - 4,000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่เวลา 30 นาทีได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 2,000 พีพีเอ็ม

เอกสารอ้างอิง

นันทนา บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (5). สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. พิมพ์ครั้งที่ 1 : 257-260.

สุวรงค์ วงษ์ศิริ. 2536. การสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรงค์ วงษ์ศิริ สุเมธ ชวเดช และ พรสวรรค์ ดิษยบุตร. 2533. การแยกสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพมหานคร.

Akiyama, H., Fuji, K., Yamasaki, O., Oono, T., and Iwatsuki, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrobial Chemotherapy. 48: 87-491.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of analysis. Association of official analytical chemists, Washington DC. (15th edi) : 1230.

Bandaranayake W.M. 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. Wetlands Ecol and Managt 10: 421-452.

Boyd, C.E. 1990. Water Quality in ponds for Aquaculture. Shrimp Mart (Thai) Co. Ltd. Songkhla. Thailand.

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A.B., Sur, T.K., Mandal, S.C., and Bhattacharya, S.K. 2002. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. J. Ethnophamarcology. 82: 229-237.

Chitmanat, C., Tongdonmuan. K., and Nunsong. W. 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27 (Suppl.1): 359-364.

Chung, K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., and Lin, Y. 1998a. Tannins and human health: A review. 1998. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 38(6):421-464.

Chung, K., Lu, Z., and Chou, M.W. 1998b. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology. 36:1053-1060.

Chuntanaparp, P.J., Sri-Aran. and Hoamuangkaew, W. 1985. Non wood forest product in Thailand. Special study on forest management, afforestation and utilization of forest resources in the developing regions, (GCP/RAS/106/JPN). Bangkok. 180 p.

Chyau, C., Ko, P. and Mau, J. 2006. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa L.* leaves. LWT-Food Science and Technology. 39: 1099-1108.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Micro.Rev. 12(4): 564-582.

Donovan, L.O. and Brooker, J.D., 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis.* Microbio.147: 1025–1033.

Fan, Y.M., Xu, L.Z., Gao, J., Wang, Y., Tang, X.H., Zhao, X.N. and Zhang, Z.X. 2004. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa L.*. Fitoterapia 75: 253-260.

Giner-Chavez B.I. 1996. Condensed tannins in tropical forages. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, NY.

Goun, E., Cunningham, G., Chu, D. Nguyen,C. and Miles, D. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. Fitoterapia 76: 592–596.

Gustavson, 1954 อ้างโดย สุวรงค์ 2536. การสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ. วิทยานิพนธ์ บัณฑิต วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Hargerman, A.E. 1988. Extraction of Tannin from fresh and preserved leaves. J.Chem.Ecol. 2: 453-461.

Hargerman, A.E. 2002. Tannins handbook. Department of chemistry and biochemistry. Miamy university. Oxford, USA.

Heath, A.G. 1995. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Lewis Publishers. USA. 3

Irene, M.H. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. Anim. Feed Sci. and Tech. 91: 3 – 20.

Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E. and Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. J. Ethnophamacol. 99: 309-302.

Lin, T.C. and Hsu, F.L.1999. Tannin and related compounds from *Terminalia catappa L.* and *Terminalia paviflora.* J. Chi. Chem. Soc. 46: 613-618.

Lin, Y.L., Kuo, Y.H., Shiao, M.S., Chen, C.C. and Oua. C.O. 2002. Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa L.* L. J. Chi Chem. Soc. 47: 253-256.

Lin *et al*., 2001 cited by Goun *et al*., 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. Fitoterapia 76: 592–596.

Nagappa A.N., Thakurdesai P.A., Venkat Rao N., and Singh J. 2003. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa L. Linn* fruits . J. Ethnopharm 88: 45-50.

Nwanna, L.C., Fagbenro, O.A. and Adeyo, A.O. 2005. Effects of different treatments of dietary soybean meal and phytase on the growth and mineral deposition in African catfish *Clarias gariepinus*. J. Anim. Vet. Adv. 4(12) : 980-987.

Pawar, S.P. and Pal, S.C. 2002. Antimicrobial activity of extracts of Terminalia catappa root. Indian J Med Sci. 56(6): 276-278.

Russo, R. C. 1985. Ammonia nitrite and nitrate. In: Fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications, Rand, G. M. and Petrocelli, S.R. Hemisphere Publishing, Washington, D.C.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30(12): 3875-3883.

Stafford, H.A. 1988. Proanthocyanidins and the lignan connection. Phytochem. 27: 1-6.

Thomson, L.A.J. and Evans, B. 2006. *Terminalia catappa L.* (tropical almond), ver. 2.2. In: Elevitch, C.R. (ed.). Species profiles for pacific island agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawai'i. [online]. Available at: http://www. traditionaltree. org.

Treves-Brown, K.M. 2000. Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 137-138.

Thai herbal pharmacopoeia. 2000. The bureau of drug and narcotic, Department of medical sciences. Ministry of public health. Thailand.

บทที่ 3

ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ในปลากัดและปลาหางนกยูง

Efficacy of Indian Almond Leaves Extracted Water on Bacterial Infection in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) and Guppy (*Poecilia reticulata*)

วีณา เคยพุดซา Weena Koeypudsa
อรัญญา พลพรพิสิฐ Aranya Ponpornpisit

3.1 บทนำ

โรคติดเชื้อที่พบในปลาน้ำจืดสวยงามมีหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ปรสิต และเชื้อรา การติดเชื้อแบคทีเรียมักพบเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนที่เกิดภายหลังการติดเชื้อปรสิตหรือในภาวะที่ปลาอ่อนแอ ได้รับความเครียดจากการเลี้ยงดู หรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง โรคติดเชื้อแบคทีเรียมักพบเป็นโรคแทรกซ้อนที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาสวยงามที่พบได้บ่อย เช่น สเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) แอร์โร-โมนาส ไฮโดรฟิลล่า (*Aeromonas hydrophilla*) เชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่าก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า motile aeromonas septicemia เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้พบได้ในแหล่งน้ำจืด มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง และที่ก่อโรคไม่รุนแรง (Noga, 2000) แอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลล่า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ในปลาน้ำจืดทุกชนิด ปลาสวยงามมักติดเชื้อดังกล่าวจากการที่ผู้เลี้ยงปลาใช้อุปกรณ์การเลี้ยงปลาปะปนกัน หรือมีการใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปลาที่มีบาดแผลที่ผิวหนังจะติดเชื้อและลุกลามรวดเร็ว เชื้อสามารถเข้าสู่กระแสเลือดและก่อโรคได้ในอวัยวะภายใน ทำให้ปลาที่ติดเชื้อป่วยและตายโดยพบจุดเลือดออกร่วมกับการบวมขยายใหญ่ที่เหงือก ผิวหนัง ตับ ไต และถุงลม มักพบของเหลวคั่งในช่องท้องปลา เชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในน้ำเลี้ยงปลาที่มีอินทรียสารสูง มีเศษอาหารปลา มูลปลาและของเสียตกค้าง ปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียในระยะแรกและไม่รุนแรงสามารถรักษาได้ด้วยการให้กินอาหารผสมยาปฏิชีวนะ แต่ปลาที่ติดเชื้อรุนแรงไม่สามารถรักษาได้เนื่องจากปลาป่วยไม่กินอาหารรวมทั้งการลุกลามของเชื้อเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ของตัวปลา หากทำการรักษาด้วย

การใช้ยาปฏิชีวนะผสมในน้ำเลี้ยงปลาจะก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อตามมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการปล่อยน้ำทิ้งจากบ่อปลาออกสู่สิ่งแวดล้อม (Noga, 2000)

การทดสอบวิธีทำให้เกิดการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาหางนกยูงและปลากัดได้ทดลองในเบื้องต้นพบว่า *A. hydrophila* ก่อโรคไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับ *S. dysgalactiae* ซึ่งก่อโรครุนแรงกว่าและเห็นผลในการศึกษาชัดเจนกว่าดังนั้นในการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในงานวิจัยนี้จึงเปลี่ยนจากการทำให้ปลาติดเชื้อ *A. hydrophila* เป็นการทำให้ติดเชื้อ *S. dysgalactiae* แทน

โรคที่เกิดจากการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสในปลาเป็นโรคอุบัติใหม่ที่มีรายงานการแพร่ระบาดในปลาหลายชนิด เช่น ปลานิล (tilapia, *Oreochromis niloticus* L.) ปลากระบอก (mullet, *Liza klunzingeri*) (Evans *et al*., 2002) ในอดีตนั้นการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส จัดเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้น้อยมากในปลา (Schâperclaus, 1986) ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสทำให้เกิดโรคในปลาน้ำจืด ปลาทะเล ปลาเลี้ยงเพื่อการบริโภคและปลาสวยงามหลายชนิด การติดเชื้อสเตรปโตคอคคัสมีสาเหตุโน้มนำจากความเครียด อุณหภูมิน้ำไม่เหมาะสม ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ ไนไตรท์สูง การเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่น (Russo *et al*., 2006) รวมทั้งการเลี้ยงปลาปกติร่วมกับปลาที่เป็นพาหะหรือเป็นโรค (McNulty *et al*., 2003) ปลาที่เกิดโรคติดเชื้อจากเชื้อสเตรปโตคอคคัสจะแสดงอาการซึม สีผิวหนังเข้มคล้ำ มีจุดเลือดออกที่ผิวหนัง เหงือก โดยเฉพาะที่โคนครีบอกและครีบท้อง ทำให้ว่ายน้ำผิดปกติ ตาขุ่นขาว ในรายที่แสดงอาการรุนแรงพบตาโปน และมีจุดเลือดออกที่ตา (Eldar *et al*., 1997, Russo *et al*., 2006)

ภาพที่ 3.1 **ปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อแบคทีเรียแอร์โรโมนาส มีอาการตัวบวม ว่ายที่ผิวน้ำ**

3.2 วิธีการศึกษา

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูง สถานที่ทดลองคือศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

3.2.1 สมุนไพร : ใบหูกวาง

ใบหูกวางที่ใช้ในทุกการทดลอง ถ้ามิได้ให้รายละเอียดใดให้หมายถึง ใบหูกวางที่ได้รับการตรวจสอบพันธุ์พืชแล้ว จากสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ว่าเป็นใบจากต้นหูกวาง (*Terminalia catappa L.* L.) โดยทำการเก็บรวบรวมใบหูกวางแห้งที่ร่วงใหม่ ๆ ไม่แยกสีใบจากใต้ต้นหูกวางภายในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2548 และเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 โดยเลือกเก็บในวันที่ท้องฟ้าแจ่มใส ไม่มีฝนตก นำใบที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละวันมาเช็ดทำความสะอาดและอบแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บไว้ในถุงพลาสติกใสที่อุณหภูมิ 30-31 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.2.2 สมุนไพร : น้ำสกัดใบหูกวาง

น้ำสกัดใบหูกวางที่ใช้ในทุกการทดลอง ถ้ามิได้ให้รายละเอียดใดให้หมายถึงการนำใบหูกวางมาชั่งน้ำหนักตามความเข้มข้นที่ต้องการในแต่ละการทดลอง โดยใช้ใบหูกวางที่ผ่านการอบแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ล้างในสารละลายด่างทับทิมเจือจาง 5 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง แล้วบรรจุใบหูกวางทั้งหมดลงในถุงผ้าใยสังเคราะห์ นำไปแช่น้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนในภาชนะสะอาดตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น ต้องการเตรียมน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (มิลลิกรัม/ลิตร) จะนำใบหูกวางแห้ง 500 กรัม แช่ในน้ำประปาปราศจากคลอรีน 500 ลิตร โดยแช่ใบหูกวางไว้เป็นเวลา 7 วัน เขย่าถุงผ้าที่ใส่ใบหูกวางวันละ 1-2 ครั้ง ทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน นำถุงผ้าที่ใส่ใบหูกวางออก จะได้น้ำสกัดใบหูกวางที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3 สัตว์ทดลอง : ปลากัด และปลาหางนกยูง

ปลากัด (*Betta splendens*) เพศผู้ ขนาด 5.5-5.7 เซนติเมตร และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) เพศผู้ ขนาด 2.5-3.0 เซนติเมตร มีสุขภาพดีจากตลาดซันเดย์ นำมาพักปรับสภาพในตู้ปลาหรือถังใยแก้วสังเคราะห์เป็นเวลา 14 วัน เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดเล็กสำหรับปลาหางนกยูงโดยให้กินจนอิ่มทุกวัน วันละครั้ง เปลี่ยนน้ำทุกวัน วันละ 10 เปอร์เซ็นต์ ปลาทุกตัวอดอาหารก่อนการทดลอง 1 วัน ปลาที่ใช้แล้วจะไม่นำมาใช้อีก ก่อนการทดลองทำการสุ่มตรวจผิวหนังของปลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบการติดเชื้อปรสิตใด ๆ

3.2.4 แบคทีเรีย : สเตรปโตคอคคัส

ในการทดลองนี้ใช้แบคทีเรีย *Streptococcus dysgalactiae* ที่แยกได้จากปลาหางนกยูงและปลากัดป่วย มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, USA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 3.1 (API 20 Strep, bioMerieux, France) ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในแต่ละครั้ง จะวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ความยาวคลื่น 640 nm (Spectrophotometer Novaspec II, SN 11327, Pharmacia LKB Biotechnology, England) เทียบกับสมการ $y = x + 10.944$ ที่มีค่า $R^2 = 1$ โดยที่ y คือ ปริมาณแบคทีเรีย (log) และ x คือ ค่า OD

ปริมาณแบคทีเรีย *S. dysgalactiae* ที่ทำให้ปลาหางนกยูงตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 48 ชั่วโมง (Mean lethal dose, LD_{50} 48 hr) โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection, IP) คือ 6.3×10^4 cfu/mL และปริมาณแบคทีเรียที่ทำให้ปลากัดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (LD_{50} 24 hr) โดยวิธี IP คือ 2.06×10^9 cfu/mL

ตารางที่ 3.1 ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและคุณสมบัติของเชื้อ *S. dysgalactiae* ที่ใช้ในการทดลอง

Tests	Substrates	Reaction / Enzymes	Results
VP	Pyruvate	Acetoin production	negative
HIP	Hippurate	Hydrolysis	negative
ESC	Esculin	β-glucosidase	negative
PYRA	Pyrrolidonyl-2-naphthylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	negative
αGAL	6-Bromo-2-naphthyl-α-D-galactopyranoside	α-galactosidase	negative
βGUR	Naphthol-AS-BI-β-D-glucuronate	β-glucuronidase	negative
βGAL	2-naphthyl-β-D- galactopyranoside	β-galactosidase	negative
PAL	2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	positive
LAP	L-leucine-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	positive
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	positive
RIB	Ribose	Acidification	positive
ARA	L-Arabinose	Acidification	negative
MAN	Mannitol	Acidification	positive
SOR	Sorbitol	Acidification	positive
LAC	Lactose	Acidification	negative
TRE	Trehalose	Acidification	positive
INU	Inulin	Acidification	negative
RAF	Raffinose	Acidification	negative
AMD	Starch	Acidification	positive
GLYG	Glycogen	Acidification	positive
βHEM	Blood agar	Red blood cell hemolysis	positive
Gram	-	-	positive
Motile	-	-	negative
Shape	-	-	cocci
Catalase	-	Gas production	positive

3.2.5 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูง

ปลากัดไทยเพศผู้ขนาด 5.5 - 5.7 เซนติเมตร จำนวน 50 ตัว เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 6×10× 16 เซนติเมตร แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 1 กลุ่มและกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ตัว ตัวละตู้ แต่ละตู้จะกั้นด้วยกระดาษแข็งสีน้ำตาล ไม่ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดการทดลองทุกกลุ่ม ปลาทั้ง 5 กลุ่มจะฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ปริมาณแบคทีเรีย 4.24 x 10^9 cfu/mL บันทึกการตายทุกกลุ่ม ทุกวัน เมื่อครบ 1 วัน จึงผสมน้ำสกัดใบหูกวางที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในตู้เลี้ยงปลา 100, 500, 1000 และ 1500 พีพีเอ็ม ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง ส่วนปลาในกลุ่มควบคุมจะไม่ผสมน้ำสกัดใบหูกวางลงไป บันทึกการตายทุกกลุ่ม ทุกวัน จนครบ 7 วัน ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและไม่ให้อาหารตลอดการทดลองในปลากัดทั้ง 5 กลุ่ม

ปลาหางนกยูงเพศผู้ขนาด 2.5-3.0 เซนติเมตร จำนวน 150 ตัว เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 15×20×25 เซนติเมตร แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดการทดลองทุกกลุ่ม ปลาทั้ง 5 กลุ่มจะฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง ตัวละ 0.03 มิลลิลิตร ปริมาณแบคทีเรีย 1.00 x10^4cfu/mL บันทึกการตายทุกกลุ่ม ทุกวัน เมื่อครบ 2 วัน จึงผสมน้ำสกัดใบหูกวางที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในตู้เลี้ยงปลา 2,10,100 และ 300 พีพีเอ็ม ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง ส่วนปลาในกลุ่มควบคุมจะไม่ผสมน้ำสกัดใบหูกวางลงไป บันทึกการตายทุกกลุ่ม ทุกวัน จนครบ 7 วัน ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลองในปลาหางนกยูงทั้ง 5 กลุ่ม หลังจากแช่ใบหูกวางแล้ว 1 วันให้อาหารปลาทุกกลุ่ม ทุกวัน วันละครั้ง ครั้งละน้อย หากปลากินไม่หมดจะช้อนอาหารที่เหลือทิ้งทันที

3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูง

จากตารางที่ 3.2 พบว่าหลังจากฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้องปลาหางนกยูงทุกตัว ปลาตายเฉลี่ย 25 เปอร์เซนต์ ภายในเวลา 2 วัน (sub LD_{50} ที่ 48 hr) หลังจากนั้น ปลาหางนกยูงจะได้รับน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 0, 2, 10, 100 และ 300 พีพีเอ็ม อีก 7 วัน ประสิทธิภาพในการรักษาปลาหางนกยูง คือ 80, 76.92, 88, 15 และ 17.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปลากัด หลังจากฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง ปลาตายเฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 1 วัน หลังจากนั้น ปลา

ได้รับน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 0, 100, 500, 1,000 และ 1,500 พีพีเอ็ม อีก 7 วัน ประสิทธิภาพในการรักษาปลากัด คือ 57.14, 44.44, 71.43, 83.33 และ 77.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ประสิทธิภาพในการรักษาปลาด้วยน้ำสกัดใบหูกวาง คำนวณได้จาก

ประสิทธิภาพในการรักษา (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{100 \times \text{จำนวนปลาที่รอดชีวิตหลังได้รับน้ำสกัดใบหูกวาง}}{\text{จำนวนปลาที่รอดชีวิตหลังจากฉีด } S.\ dysgalactiae}$

ตารางที่ 3.2 จำนวนปลาหางนกยูงที่รอดชีวิตหลังจากฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง (*) และรักษา(**) ด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของน้ำสกัดใบหูกวาง (พีพีเอ็ม)	ซ้ำ	วันที่										ประสิทธิภาพในการรักษา (เปอร์เซ็นต์)
		0*	1*	2*	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	
0	1	10	10	10	10	10	9	9	9	9	8	80
	2	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	
	3	10	7	6	6	6	6	5	5	4	4	
2	1	10	9	8	8	8	8	7	6	6	6	76.92
	2	10	9	9	9	9	9	9	8	7	7	
	3	10	9	9	9	9	9	9	8	7	7	
10	1	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	88
	2	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	
	3	10	8	6	5	5	4	4	4	4	4	
100	1	10	10	8	8	6	5	5	4	3	2	15
	2	10	8	4	4	2	0	0	0	0	0	
	3	10	9	8	8	7	5	3	3	2	1	
300	1	10	9	7	6	6	4	4	3	3	3	17.65
	2	10	8	8	8	5	2	1	1	0	0	
	3	10	5	2	0	0	0	0	0	0	0	

ตารางที่ 3.3 จำนวนปลากัดที่รอดชีวิต หลังจากฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง (*) และรักษา (**) ด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของน้ำสกัดใบหูกวาง (พีพีเอ็ม)	ซ้ำ	วันที่									ประสิทธิภาพในการรักษา (เปอร์เซ็นต์)
		0*	1*	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**	
0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	57.14
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	
	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
100	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	44.44
	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
500	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	71.43
	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	
	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1,000	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	83.33
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
1,500	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	77.78
	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	
	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1	

Streptococcus spp. เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคระบาดในปลาได้หากมีสาเหตุโน้มนำจากความเครียด อุณหภูมิน้ำไม่เหมาะสม ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ ไนไตรท์สูง เลี้ยงหนาแน่น (Russo *et al*., 2006) และเลี้ยงปลาปนกับปลาที่เป็นพาหะหรือเป็นโรค (McNulty *et al*., 2003) ปลาเรนโบว์เทร้าและปลาคาร์พที่ป่วยด้วยเชื้อ *Streptococcus* spp. จะแสดงอาการซึม ผิวเข้มคล้ำ มีจุดเลือดออกที่โคนครีบอกและครีบท้อง ว่ายน้ำผิดปกติ ตาขุ่น โปน และมีจุดเลือดออกที่ตา (Eldar *et al*., 1997; Russo *et al*., 2006) แต่จากการทดลองฉีดเชื้อ *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้องปลากัดและปลาหางนกยูงไม่พบอาการดังกล่าว พบแต่เพียงอาการว่ายน้ำช้าลง ซึมและตายในที่สุด จากการตรวจวินิจฉัยสาเหตุการตายโดยนำตับของปลาที่ตายใหม่ๆ มาเพาะเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบเชื้อ *S. dysgalactiae* จึงสามารถยืนยันได้ว่าปลาตายเนื่องจากการติดเชื้อดังกล่าวแม้จะไม่แสดงอาการเช่นเดียวกับปลาชนิดอื่น แม้ว่ารายงานการเกิดโรค steptococcosis ในปลาส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *S. iniae* เช่น ปลา rainbow trout (Eldar *et al*., 1997) ปลานิล (Perera *et al*., 1997; Shoemaker *et al*., 2000; Abutbul *et al*., 2004) ปลา Japanese flounder (Nguyen *et al*., 2002) ปลา striped bass (McNulty *et al*., 2003) ปลา zebrafish (Miller and Neely, 2004) และปลา red-tail black shark (Russo *et al*., 2006) แต่การที่ *S. dysgalactiae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่พบได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ในดินและสิ่งปฏิกูล เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์บกหลายชนิด การตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งน้ำและแยกเชื้อได้จากปลาป่วยน่าจะแสดงให้เห็นถึงภาวะการกลายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าวที่สามารถก่อโรคในปลาได้นอกเหนือจากการก่อโรคในสัตว์บกทั่วไป เนื่องจากระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยที่นิยมนำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาเลี้ยงปลาสวยงามโดยตรงโดยไม่ผ่านการบำบัดฆ่าเชื้ออย่างเหมาะสม รวมทั้งระบบการเลี้ยงในฟาร์มสัตว์บกและสัตว์น้ำที่มักจะเลี้ยงในบริเวณเดียวกัน ใช้น้ำและปล่อยน้ำทิ้งลงในแหล่งน้ำเดียวกัน หรือการนำมูลสัตว์มาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการปรับสภาพความสมบูรณ์ของธาตุอาหารในแหล่งน้ำ การเพาะเลี้ยงไรแดงที่เป็นอาหารปลาสวยงามวัยอ่อนโดยใช้น้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงสุกร (ภาพที่ 3.2) การเพาะเลี้ยงลูกน้ำจากมูลไก่ เป็นต้น จากการสืบค้นไม่พบว่ามีรายงานการเกิดโรคจากเชื้อนี้ในปลากัดและปลาหางนกยูง ดังนั้นงานวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นงานวิจัยแรกที่รายงานการเกิดโรค steptococcosis ในปลากัดและปลาหางนกยูง

ภาพที่ 3.2 **บ่อเลี้ยงไรแดงโดยใช้น้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงสุกร**

ภาพที่ 3.3 **การเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงและการเลี้ยงสุกรในบริเวณฟาร์ม**

จากการทดลองนี้ ได้เหนี่ยวนำให้ปลามีการติดเชื้อและตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) โดยการฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้อง (IP) วิธี IP นี้เป็นวิธีที่ยอมรับได้ (Klesius *et al*., 2006) เนื่องจากเป็นการทำให้ปลาเป็นโรคโดยที่ทราบแน่นอนว่าปลาได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าทางช่องท้องและทราบปริมาณแน่นอนของแบคทีเรีย ซึ่งจากการทดลองพบว่าปลากัดและปลาหางนกยูงมี LD_{50} ที่24 และ 48 ชั่วโมง คือ 2.06 x 10^9 และ 6.3 x10^4cfu/mL ตามลำดับ ค่าของ LD_{50} มีรายงานออกมาต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่ใช้ทดลองและระยะเวลาของการติดตามผล เช่น Perera และคณะ (1997) พบว่า จากการฉีด *S. dysgalactiae* เข้าช่องท้องปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotica x T. aurea*) มีค่า LD_{50} ที่96 และ 168 ชั่วโมง คือ 4.9 x 10^5 และ 3.18 x10^5 cfu/mL ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก Abutbul และคณะ (2004) ที่ทดลองฉีด IP ในปลานิล (*Oreochromis* sp.) พบว่ามีค่า LD_{50} ที่ 24 ชั่วโมง คือ 1.2 x 10^8 cfu/mL ส่วนปลา zebrafish เมื่อ IP แล้วมีค่า LD_{50} ที่ 48-72 ชั่วโมง คือ 10^3 cfu/mL (Miller and Neely, 2004)

ปลาที่มีการติดเชื้อ *S. dysgalactiae* เมื่อนำมารักษาโดยการแช่ในน้ำใบหูกวางพบว่าน้ำที่แช่ใบหูกวางเข้มข้น 10 และ 1,000 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค Streptococcosis ที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. dysgalactiae* ในปลาหางนกยูงและปลากัด 88 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ น้ำสกัดใบหูกวางมี tannins มาก ซึ่ง tannins จะประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ hydrolysable tannin (HT) หรือ tannic acids และ condensed tannin (CT) หรือ flavonoid (Krause et al., 2005) ซึ่ง Chen และคณะ (2000) กล่าวว่าใบหูกวางมี HT ประมาณ 0.48 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำสกัดใบหูกวางมีปริมาณ HT เฉลี่ย 14.5 - 16.7 เปอร์เซ็นต์

Tannins มีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ลดการอักเสบ (Chattopadhyay *et al*., 2002; Nagappa *et al*., 2003; Fan *et al*., 2004; Arora *et al*., 2005; Chyau *et al*., 2006) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (disinfectants, bacteriostatic and bactericidal) และออกฤทธิ์คล้ายยาปฏิชีวนะ (Scalbert, 1991; Chung *et al*., 1998a; Chung *et al*., 1998b; Akiyama *et al*., 2001; Kloucek *et al*., 2005) tannins ลดการอักเสบได้โดย CT หรือ flavonoid (Arora *et al*., 2005) ทำงานคล้ายกับ antihistamine หรือ antiserotonin (Chattopadhyay et al., 2002) โดยยับยั้งขบวนการอักเสบ เช่นเพิ่มจำนวนของ fibroblast สร้าง collagen และลดการไหลเวียนของเม็ดเลือดขาว (leukocyte, neutrophil) มาบริเวณที่มีการอักเสบ (Fan *et al*., 2004) ซึ่งผลการทดลองจากการศึกษาในบทที่ 4 พบว่าใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม

สามารถนำมาใช้ในการสมานแผลปลากัดและปลาหางนกยูงที่มีบาดแผลที่ผิวหนังเพียงเล็กน้อยได้ โดยจะพบว่าทั้งปลากัด และปลาหางนกยูงมีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนจนเกือบเป็นปกติในวันที่ 3 ของการรักษา (ดูรายละเอียดประกอบในบทที่ 4)

นอกจากนั้น Tannins มีผลต่อขบวนการ metabolism ของแบคทีเรีย (Scalbert, 1991) โดย HT จะจับกับเหล็กให้อยู่ในรูปของ unavailable iron ซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถนำไปใช้ในขบวนการสร้างสารพันธุกรรม (RNA และ DNA) หรือสร้างเซลล์ใหม่ได้ (Chung *et al*., 1998; Akiyama *et al*., 2001)

3.4 สรุป

กล่าวโดยสรุปแล้ว แบคทีเรีย *S. dysgalactiae* สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Streptococcosis ในปลาหางนกยูงและปลากัดได้โดยวิธี IP ซึ่งมีค่า LD_{50} ที่48 และ 24 ชั่วโมง คือ 6.3×10^{4} และ 2.06×10^{9} cfu/mL ตามลำดับ น้ำสกัดใบหูกวาง 10 และ 1,000 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค Streptococcosis ที่เกิดจากการติดเชื้อในปลาหางนกยูงและปลากัด 88 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., and Zilberg, D. 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.) Aquaculture. 238: 97-105.

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., and Iwatsuki, K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrobial Chemotherapy. 48: 487-491.

Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar,R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh,S. Samanta, N., and Sharma, R.K. 2005. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. Phytotherapy Research. 19:1-22.

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A.B., Sur, T.K., Mandal, S.C., and Bhattacharya, S.K. 2002. Antimicrobial and anti-inflamatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. J. Ethnophamarcology. 82: 229-237.

Chen, P., Li, J., Liu,T., and lin, T. 2000. Folk medicine *Terminalia catappa L.* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Cancers Letters. 152: 115-122.

Chung, K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., and Lin, Y. 1998a. Tannins and human health: A review. 1998. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 38(6): 421-464.

Chung, K., Lu, Z., and Chou, M.W. 1998b. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology. 36: 1053-1060.

Chyau, C., Ko, P., and Mau, J. 2006. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa L.* leaves. LWT-Food Science and Technology. 39: 1099-1108.

Davies, M.R., Mcmillan, D.J., Sriprakash, K.S., and Chhatwal, G.S. 2006. Distribution of group A streptococcal virulent genes in group C and G streptococci. International Congress Series. 1289: 184-187.

Eldar, A., Horovitcz, A., and Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology. 56: 175-183.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Glibert, P.M., Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M.A., Landsberg J., Duremdez, R., Al Marzouk, A. and Al Zenki, S. 2002. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus* agalactiae in cultured seabream, Sparus auratus (L.)and wild mullet, Liza klunzingeri (Day), in Kuwait. J. Fish Dis. 25: 505–513

Fan, Y.M., Xu, L.Z., Gao,J., Wang,Y., Tang,X.H., Zhao, X.N., and Zhang, Z.X. 2004. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa L*.. Fitoterapia. 75: 253-260.

Klesius, P.H., Evans, J.J., Shoemaker, C.A., and Pasnik, D.J. 2006. A vaccination and challenge model using calcein marked fish. Fish & Shellfish Immunology. 20:20-28.

Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., and Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. J. Ethnopharmacology. 99: 309-312.

Krause, D.O., Smith, W.J.M., Brooker, J.D., and McSweeney, C.S. 2005. Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. Animal feed Science and Technology. 121: 59-75.

Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Luk, W., Fung, A.M.Y., Hui, W., Fong, A.H.C., Chow, C., Wong, S.S.Y., and Yuen, K. 2006. Clinical isolates of Streptococcus iniae from Asia are more mucoid and β-hemolytic than those from North America. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 54:177-181.

McNulty, S.T., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., and Evans, J.J. 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass *(Morone chrysops x Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. Aquaculture. 220:165-173.

Miller, J.D., and Neely, M.N. 2004. Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis. Acta Tropica. 91: 53-68.

Min, B.R., Attwood, G.T., Mcnabb, W.C., molan, A.L., and Barry, T.N. 2005. The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. Animal Feed Science and Tecnology. 121: 45-58.

Nagappa, A.N., Thakurdesai, P.A., Rao, N.V., and Singh, J. 2003. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa L. Linn* fruits. J. Ethnopharmacology. 88: 45-50.

Nguyen, H.T. Kanai, K., and Yoshikoshi, K. 2002. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. 205: 7-17.

Noga, E.J. 2000. Fish disease diagnosis and treatment. First Iowa state University press edi., Iowa State University press, Iowa : 87-105.

Perera, R.P., Johnson, S.K., and Lewis, D.H. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Taxas. Aquaculture. 152:25-33.

Roach, J.C.M., Levett, P.N., and Lavoie, M.C. 2006. Identification of *Streptococcus inae* by commercial bacterial identification systems. J. Microbiological Methods. *Article in press.*

Russo, R., Mitchell, H., and Yanong, R.P.E. 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture. 256:105-110.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30(12):3875-3883.

Schâperclaus, W., Kulow, H. and Schreckenbach, K. 1986. Chapter 4 Disease caused by ciliates ; IV Protozoiases : Fish Disease Vol. II. Fifth edi. Schâperclaus, W. (ed) Fischkrankheiten, Akademie-Verlag, Berlin. : 716 –723.

Shoemaker, C.A., Evans, J.J., Klesius, P.H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 188: 229-235.

บทที่ 4

ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผลและโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา ที่ผิวหนังปลากัด และปลาหางนกยูง

Therapeutic Effect of Indian Almond Leaves Extracted Water on Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) and Guppy (*Poecilia reticulata*) Skin Wound and *Tetrahymena* Infection

อรัญญา พลพรพิสิฐ Aranya Ponpornpisit
จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ Jirasak Tangtrongpiros
มาโกโต เอนโด Makoto Endo

4.1 บทนำ

ปลากัด หรือ Siamese fighting fish (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง หรือ guppy (*Poecilia reticulata*) เป็นปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมมาตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน ปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงามมักเกิดจากความเสียหายที่ผิวหนังทำให้ปลามีความสวยงามและมีราคาด้อยลงเช่นมีบาดแผล มีปรสิตภายนอก รวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ผิวหนัง การเกิดบาดแผลที่ผิวหนังปลาพบได้บ่อยจากการใช้วัสดุผิวหยาบแห้งในการจับปลา การคัดขนาดปลา การขนส่ง การต่อสู้กันเองเป็นต้น บาดแผลที่ผิวหนังเป็นช่องทางให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแทรกเข้าสู่ร่างกายปลา เมื่อไม่ได้รับการรักษาหรือได้รับการรักษาไม่เหมาะสมจะเกิดการติดเชื้อเพิ่มขึ้นและเกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก ในกรณีที่เกิดบาดแผลในระหว่างการบรรจุปลาเพื่อจัดจำหน่ายให้กับลูกค้า มักพบว่าปลาจะอ่อนแอและตายเมื่อสินค้าส่งถึงปลายทางในระยะเวลาไม่นาน ก่อให้เกิดความไม่เข้าใจกันในเรื่องคุณภาพปลาระหว่างผู้ซื้อและผู้ขายปลา

โรคติดเชื้อที่พบในปลาน้ำจืดสวยงามมีหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ปรสิต และราเชื้อที่ก่อโรครุนแรงที่พบเป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามที่ตรวจพบได้บ่อย ได้แก่ ปรสิตชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะปรสิตที่ผิวหนัง การติดเชื้อแบคทีเรียมักพบเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนที่เกิดภายหลัง

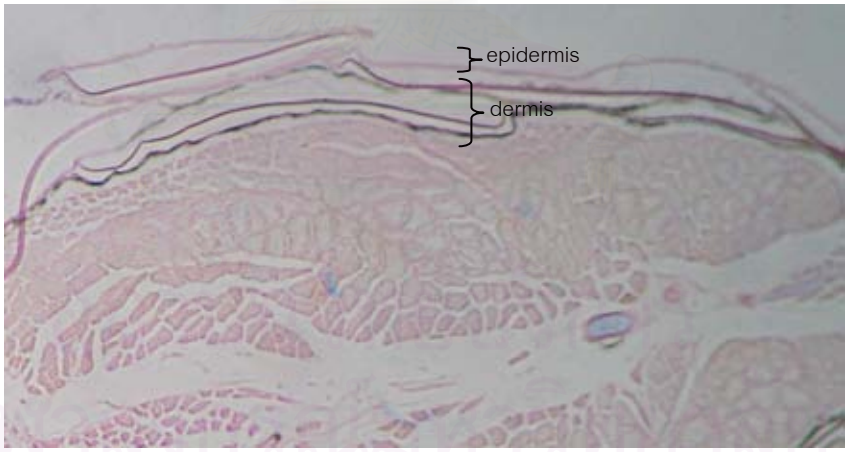
การติดเชื้อปรสิตหรือในภาวะที่ปลาอ่อนแอได้รับความเครียดจากการเลี้ยงดูหรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง ปรสิตที่ก่อโรคในปลาสวยงามอาจพบที่ผิวหนังหรือภายในร่างกายปลา อาจเป็นการติดเชื้อแทรกซ้อนเช่นเดียวกับการติดเชื้อแบคทีเรียหรืออาจจะเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนก็ได้ ปรสิตที่พบบ่อยได้แก่ปรสิตเซลล์เดียวที่เรียกว่าโปรโตซัว (protozoa) ซึ่งอาจดำรงชีพแบบอิสระอยู่ในแหล่งน้ำ (free living protozoa) หรือเป็นปรสิตก่อโรคที่ต้องอาศัยบนตัวปลา (parasitic protozoa) การดำรงชีพของโปรโตซัวต้องอาศัยองค์ประกอบร่วมของสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมได้แก่อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเค็ม ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ ความอ่อนแอของปลา ซึ่งจะโน้มนำให้โปรโตซัวเข้าสู่ร่างกายปลาได้ง่ายและเพิ่มจำนวนมากขึ้นทั้งในน้ำและบนตัวปลา โปรโตซัวที่พบที่ผิวหนังปลาหางนกยูงมีหลายชนิดเช่น เห็บระฆัง (*Trichodina*) อิ๊คทีออพไทเรียส (*Ichthyopthirius*) เตเตร้าไฮมีนา (*Tetrahymena*) เป็นต้น สำหรับแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้งชนิดที่เป็นสาเหตุโน้มนำและติดเชื้อแทรกซ้อนในภายหลังมีหลายชนิดเช่น แอร์โรโมนาส (*Aeromonas*) ซูโดโมนาส (*Pseudomonas*) เสตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) เป็นต้น (Michel and Alderman, 1991)

การศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของเชื้อเตตร้าไฮมีนาและการติดเชื้อเชื้อนี้ในปลาสวยงามนั้นเคยมีรายงานตั้งแต่ค.ศ.1905 (Elliott, 1973; Corliss,1953) แต่การศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวยังไม่มีรายงานใดที่กล่าวอ้างถึงโดยสมบูรณ์ การติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลาสวยงามทั้งที่เลี้ยงในฟาร์ม ปลาที่นำเข้าหรือปลาที่ส่งออกได้ถูกพบและมีการศึกษามากขึ้นทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในปลาหางนกยูง (ฐิติพร หลาวประเสริฐและคณะ, 2001; Lawhavinit, 2002; อรัญญา พลพรพิสิฐและคณะ, 2003; Leibowitz *et al*., 2005) โรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาหรือที่รู้จักกันในกลุ่มผู้เลี้ยงปลาหางนกยูงของไทยว่า โรคตัวเปื่อย เป็นโรคติดเชื้อโปรโตซัวที่สำคัญที่พบบ่อยในปลาหางนกยูง ได้รับการขนานนามว่า “Guppy Killing Disease” (Lom and Dykova, 1992) เนื่องจากมีความก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูง เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะชอนไชกัดกินเนื้อเยื่อปลาทำให้เกิดบาดแผลที่ผิวหนังและอาจลุกลามเข้าสู่อวัยวะภายใน ปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อดังกล่าวจะตายหมดบ่ออย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ฐิติพร หลาวประเสริฐและคณะ, 2001; Ponpornpisit *et al*., 2000) การตรวจปลาหางนกยูงจากตลาดซันเดย์ เขตจตุจักรกรุงเทพมหานครอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปีตั้งแต่เดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2545 ร่วมกับการสังเกตอาการพบว่าปลาหางนกยูงส่วนใหญ่ที่มีปรสิตภายนอกมักจะว่ายน้ำแฉลบไปมา อาจมีบางตัวที่อยู่นิ่งและแยกตัวจากปลาอื่นในฝูง ปลาที่ป่วยมากมักมีครีบเปื่อยและมีเมือกมาก ตรวจพบปรสิตที่ผิวหนัง 5 ชนิด ได้แก่ ปลิงใส (Monogenean) เห็บระฆัง เตตร้าไฮมีนา อิคทีออพไทเรียส และเอพิโอโซมา (*Apiosoma*) โดยปรสิต 3 ชนิดที่พบบ่อยและอาจเป็นชนิดที่ทำให้ปลา

หางนกยูงที่ถูกซื้อไปจากตลาดแห่งนี้ตายเป็นจำนวนมาก ได้แก่ ปลิงใส เห็บระฆัง และเตตร้าไฮมีนา (อรัญญา พลพรพิสิฐและคณะ, 2003)

4.2 การเกิดแผลที่ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง

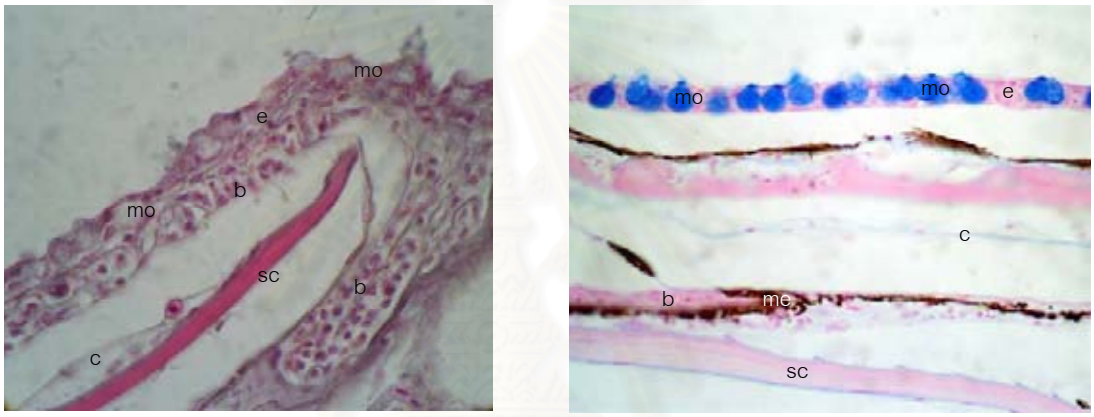
ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง (ภาพที่4.1และภาพที่4.2) มี 2 ชั้น ได้แก่ชั้นอิพิเดอมิส (epidermis)และชั้นเดอมิส (dermis) ชั้นอิพิเดอมิสเป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดได้แก่เซลล์เยื่อบุ (epithelial cells) เซลล์เมือก (mucous cells) เซลล์ที่ฐาน (basal cells) และเซลล์รับความรู้สึก (sensory cells) และเซลล์ตั้งต้น (germinal cells) ในบางโอกาสอาจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) และแม็คโครฟาจน์ (macrophages) เซลล์ที่เป็นโครงสร้างหลักของชั้นอิพิเดอมิสคือเซลล์เยื่อบุ โดยที่เซลล์ที่อยู่ชั้นบนสุด (superficial cell) จะมีรูปร่างแบน (squamous cells) เซลล์ที่ฐานเป็นเซลล์ที่ยังมีการเจริญเติบโตตลอดเวลาโดยจะเจริญเป็นเซลล์เยื่อบุใหม่ทดแทนเซลล์เก่าที่ตายและหลุดลอกไปผิวหนังปลาปกคลุมด้วยเมือกซึ่งประกอบด้วยเซลล์เมือกที่เจริญมาจากเซลล์ที่ฐานเช่นเดียวกับเซลล์เยื่อบุโดยเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์เมือกจะค่อยๆ เคลื่อนตัวขึ้นไปที่ผิวหนังชั้นนอกสุดเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อปกคลุมผิวหนังและหลุดลอกออกในที่สุด



ภาพที่ 4.1 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง กำลังขยาย** 40 **เท่า** (alcian blue stain)

ชั้นเดอมิสเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังชั้นใน ที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวม (loose connective tissue) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบแน่น (dense connective tissue) มีเซลล์เม็ดสี (chromatophores) ชนิดต่างๆ ปลากัดมีเซลล์เม็ดสีหลายชนิด ได้แก่ เมลาโนฟอร์ (melanophores)

ให้สีน้ำตาลหรือสีดำ อิริโทรฟอร์ (erythrophores) ให้สีส้มหรือสีแดง แซนโทรฟอร์ (xanthrophores) ให้สีเหลือง หรือสีส้ม ลิวโคฟอร์ (leucophores) ให้สีขาว และอิริโดฟอร์ (iridophores) ให้สีเงินแวววาว (Chaplen *et al*., 2002) ขอบเขตชั้นนอกสุดของชั้นเดอมิสติดกับเซลล์ที่ฐาน ชั้นในสุดติดต่อกับหลอดเลือดฝอย เนื่องจากภายในชั้นเดอมิสมีเซลล์เม็ดสีกระจายอยู่ทั่วไปทำให้ปลากัดและปลาหางนกยูงมีสีสันสวยงามแตกต่างกัน ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวมจะมีเกล็ด (scales) และเส้นใยคอลลาเจน (collagen fibers) เรียงตัวอยู่หลวม ๆ ส่วนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบแน่นจะมีเส้นใยคอลลาเจนที่เรียงตัวกันอย่างหนาแน่น แต่ไม่มีส่วนของเกล็ดปลาแทรกในชั้นนี้



ปลาหางนกยูง **ปลากัด**

ภาพที่ 4.2 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูง** (H & E stain) **และปลากัด** (alcian blue stain) **ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง กำลังขยาย** 400 **เท่า** epithelial cells (e) mucous cells (mo) basal cells (b) scales (sc) melanophores (me) collagen fibers (c)

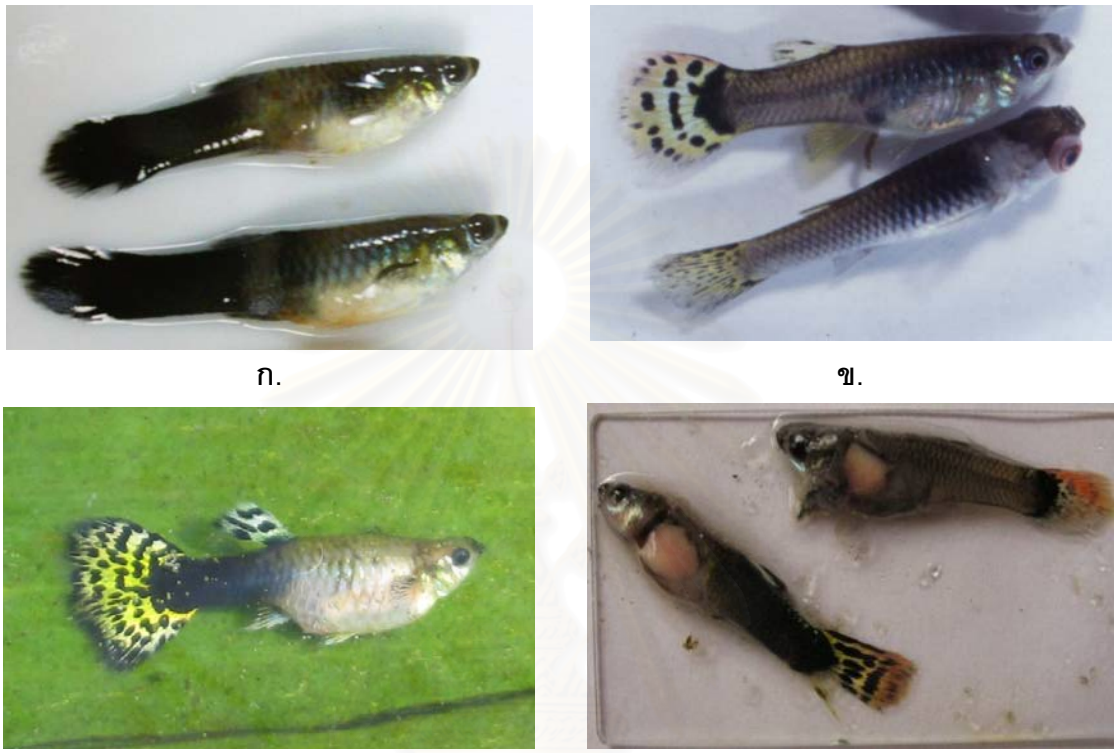
ผิวหนังเป็นอวัยวะชั้นนอกสุดของปลาเป็นบริเวณที่จะรับสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ การระคายเคืองเกิดขึ้นที่ผิวหนังได้ไม่ว่าสาเหตุทางกายภาพ ชีวภาพ หรือทางเคมี อาการที่พบเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมที่ผิวหนัง ได้แก่ การถูไถผิวหนังลำตัวกับสิ่งต่าง ๆ ในตู้ปลา การสร้างเมือกเพิ่มขึ้น ปริมาณเมือกที่เพิ่มมากขึ้นในบ่อหรือตู้ปลาทำให้น้ำเป็นฟองขุ่นสามารถสังเกตพบได้ ในกรณีที่เซลล์ที่ผิวหนังเพิ่มจำนวนมากขึ้น (hyperplasia) หรือมีการลอกหลุดมากกว่าปกติอาจทำให้สังเกตเห็นปื้นสีขาวที่บริเวณดังกล่าวได้ ปลาที่มีความผิดปกติอย่างเรื้อรังที่ผิวหนังถ้าหากไม่ได้รับการรักษาอาจมีอาการรุนแรงขึ้น มีการเกิดเนื้อตายเฉพาะที่ อาจเกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนและอาจเสียชีวิตเนื่องจากระบบควบคุมสมดุลน้ำผิดปกติ

การเกิดบาดแผลที่ผิวหนังปลาเป็นลักษณะเฉพาะที่พบได้บ่อย เกิดได้จากการถูกสัมผัสด้วยวัสดุมีคม วัสดุผิวแห้ง หรือผิวหยาบ เช่น ตาข่ายจับปลา หรือผ้าแห้ง หรือการสัมผัสกับสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน การติดเชื้อพยาธิภายนอกชนิดต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของผิวหนังที่เกิดบาดแผลชนิดครูด (scratching) เริ่มจากการลอกหลุดของผิวหนังชั้นนอก (epidermis layer slough off) เซลล์เยื่อบุยกตัว (epithelial exfoliation) มีเลือดออกจากหลอดเลือดฝอย (breeding) เลือดคั่ง (hyperemia and congestion) เนื้อเยื่อชั้นเดอมิสถูกทำลาย (dermis layer destruction) พบลักษณะเนื้อตาย (necrotic figure) และเกล็ดลอกหลุด (scale slough off) อาจพบเป็นบริเวณกว้างในบริเวณที่เกิดบาดแผล เมื่อเวลาผ่านไป ร่างกายปลาจะสร้างเนื้อเยื่อทดแทน มีการสร้างเมือกมากขึ้นเพื่อลดการอักเสบทำให้เห็นเซลล์เมือก (mucous cell) เพิ่มจำนวน ถ้าเป็นบาดแผลขนาดเล็กอาจหายได้เองภายในเวลา 3 – 5 วัน แต่ กรณีที่เป็นบาดแผลบริเวณกว้างและลึก ถ้าหากไม่ได้รับการรักษาจะทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนและเกิดเนื้อตายตามมา หน้าที่ของผิวหนังในการควบคุมสมดุลน้ำในร่างกายปลาจะเสียไป และเกิดรอยโรคที่รุนแรงมากขึ้น

4.3 การติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลาสวยงาม

เชื้อเตตร้าไฮมีนามีหลายสายพันธุ์ มีทั้งที่ดำรงชีพเป็นปรสิตบนตัวปลา และชนิดที่อยู่อิสระในแหล่งน้ำ ชนิดที่เป็นปรสิตก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูง ได้แก่ *Tetrahymena corlissi* (จิ๊ติพร หลาวประเสริฐและคณะ, 2001, Lom and Dykova, 1992) ส่วนเชื้อที่อยู่อิสระในแหล่งน้ำและสามารถเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อได้ในปลาหางนกยูงและปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Tetrahymena pyriformis* (Ponpornpisit *et al*., 2000) ปลาที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี acid treated method (Ponpornpisit *et al*., 2000) มีหลายชนิด เช่น ปลาทอง (Gold fish ; *Carassius auratus*) ปลาพลาตี้ (Platy fish; *Xiphophorus maculatus*) ปลานีออน (Neontetra fish; *Paracheirodon innesi*) ปลาเชอรี่บาร์บ (Cherry barb fish; *Puntius titteya*) และปลาเทวดา (Angel fish; *Pterophyllum scalare*) เป็นต้น (Ponpornpisit *et al*., 2000) แม้ว่ายังไม่เคยมีรายงานการพบเชื้อดังกล่าวในปลากัดแต่มีแนวโน้มว่าหากน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลามีการปนเปื้อนเชื้อเตตร้าไฮมีนาก็อาจทำให้ปลาที่มีแผลหรืออ่อนแอติดเชื้อดังกล่าวได้ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาปลาที่ติดเชื้อดังกล่าวให้หายได้เนื่องจากเชื้อจะลุกลามเข้าสู่ร่างกายปลาอย่างรวดเร็ว โดยปลาที่มีการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาจะมีสีผิวหนังซีดจาง ตามลำตัวมีเกล็ดตั้งพอง ครีบกร่อน โดยเฉพาะครีบหาง (อรัญญา พลพรพิสิฐและคณะ, 2003) รอยโรคที่เด่นชัดที่เกิดจากการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนดังภาพที่ 4.3 คือ แถบสีขาวซีดที่ผิวหนัง อาจพบอาการตาบวมโปน ท้องบวม อวัยวะภายใน เช่น ตับ

ลำไส้ มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีซีดขาวซึ่งเกิดจากการที่มีเชื้อเตตร้าไฮมีนาแทรกอยู่เป็นจำนวนมากในบริเวณดังกล่าว



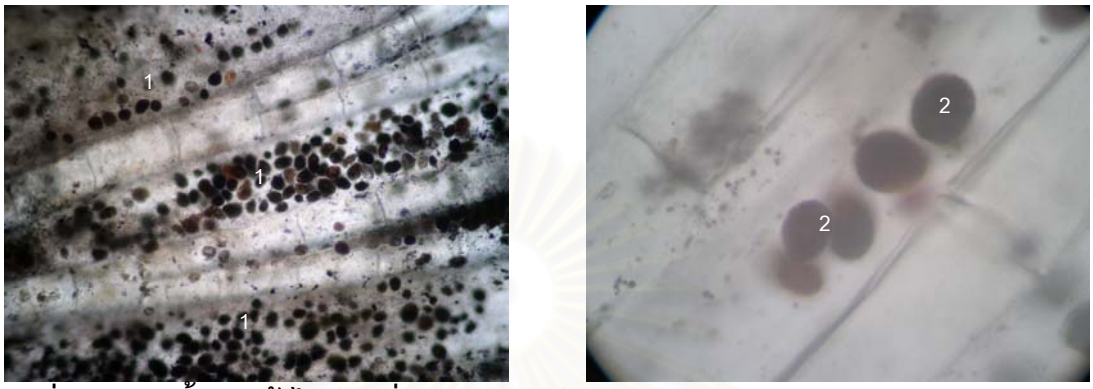
ก. ข.

ค. ง.

ภาพที่ 4.3 **ปลาหางนกยูงที่มีรอยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาตรวจพบแถบสีขาวที่ลำตัว ผิวหนัง (ก.) อาจพบอาการตาบวมโปน (ข.) ท้องบวม (ค.) อวัยวะภายในบวมและมีสีซีดขาว (ง.)**

เชื้อเตตร้าไฮมีนาสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ เมื่ออยู่ในธรรมชาติจะดำรงชีพโดยการกินสารอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะขยายพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ (binary fission) แต่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมขาดแคลนธาตุอาหาร เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยขบวนการคอนจูเกชั่น (conjugation process) จากนั้นเซลล์รุ่นต่อไปที่เกิดขึ้นจะเจริญโดยการแบ่งตัวแบบไมโตซีสไปอีกหลายครั้งแต่ก็ยังไม่อยู่ในสภาพเจริญพันธุ์โดยสมบูรณ์ยังไม่สามารถมีการคอนจูเกต (conjugate) จนกว่าจะแบ่งเซลล์ต่อไปอีกระยะหนึ่งซึ่งมีระยะเวลาแตกต่างไปตามพันธุ์ และเมื่อถึงวาระเจริญพันธุ์โดยสมบูรณ์ ก็จะอยู่คงสภาพดังกล่าวไปอีกช่วงเวลาหนึ่งและถ้าไม่มีการคอนจูเกตเกิดขึ้น เซลล์นั้นก็จะหมดสภาพที่จะสืบพันธุ์ได้อีกเซลล์จะเคลื่อนที่ช้าลงและตายในที่สุด ลักษณะเริ่มแรกของเซลล์ที่ไม่สามารถ

สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศได้และใกล้จะหมดอายุขัย คือ ไมโครนิวเคลียส (micronucleus) จะหดหายไป และเซลล์จะลีบเล็กลง



ภาพที่ 4.4 **เชื้อเตตร้าไฮมีนาที่พบบริเวณครีบหางปลาหางนกยูงป่วย ตรวจโดยวิธีย้อมสด** (direct smear) **ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง กำลังขยาย** 40 **เท่า** (1) **และกำลังขยาย** 400 **เท่า** (2)

ช่วงเวลาการแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของธาตุอาหารและสายพันธุ์ของเชื้อเตตร้าไฮมีนา เช่น การแบ่งตัวของ *T. pyriformis* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด ด่าง 7-7.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดโปรติโอสเปปโตน (proteose peptone) 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีระยะเวลาการแบ่งตัวเฉลี่ย 4 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแบ่งตัวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ด้วยเช่นกัน โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 18 - 36 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าเชื้อเตตร้าไฮมีนาบางสายพันธุ์จะทนอยู่ได้นานหลายสัปดาห์ที่ 4 องศาเซลเซียสก็ตาม ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับการแบ่งตัวอยู่ระหว่าง 7.25-7.3 แต่ก็ยังมีตัวแปรอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการแบ่งเซลล์ เช่น ลักษณะและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ถ้าใช้โปรติโอสเปปโตนเข้มข้น 0.1-2.5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะแบ่งตัวได้รวดเร็วแต่ถ้าเข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการแบ่งเซลล์จะลดลงอย่างมากและถ้าเข้มข้นถึง 10 เปอร์เซ็นต์จะเป็นพิษต่อเซลล์ ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นต่ำเซลล์จะใช้เวลาในการแบ่งตัวนานขึ้น ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าที่เตรียมเก็บไว้เป็นเวลานานจะมีความดันออสโมติคที่ไม่เหมาะสม มีสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ทำให้การแบ่งเซลล์ผิดปกติไป (Elliott, 1905)

4.4 วิธีการศึกษา

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผลที่ผิวหนังและการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูง ได้ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

4.4.1 สัตว์ทดลอง : ปลากัด และปลาหางนกยูง

ปลากัด (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ที่ใช้ในทุกการทดลอง ถ้ามิได้ให้รายละเอียดใดให้หมายถึงปลากัดคละเพศขนาดเฉลี่ย 3.5 เซนติเมตร และปลาหางนกยูงคละเพศ ขนาดเฉลี่ย 3.0 เซนติเมตร ซึ่งเป็นปลาที่โตเต็มวัย มีสุขภาพดี ได้จากฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงและฟาร์มเลี้ยงปลากัดในจังหวัดนครปฐม นำมาพักปรับสภาพในตู้ปลาหรือถังใยแก้วสังเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการทดลองทำการสุ่มตรวจผิวหนังของปลาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบการติดเชื้อปรสิตใด ๆ

4.4.2 สมุนไพร : ใบหูกวาง

ใบหูกวางที่ใช้ในทุกการทดลอง ถ้ามิได้ให้รายละเอียดใดให้หมายถึง ใบหูกวางที่ได้รับการตรวจสอบพันธุ์พืชแล้ว จากสำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืชว่าเป็นใบจากต้นหูกวาง (*Terminalia catappa L.* L.) โดยทำการเก็บรวบรวมใบหูกวางแห้งที่ร่วงใหม่ ๆ ไม่แยกสีใบจากใต้ต้นหูกวางภายในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2548 และเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 โดยเลือกเก็บในวันที่ท้องฟ้าแจ่มใส ไม่มีฝนตก นำใบที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละวันมาเช็ดทำความสะอาดและอบแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บไว้ในถุงพลาสติกใสที่อุณหภูมิ 30-31 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง

4.4.3 สมุนไพร : น้ำสกัดใบหูกวาง

น้ำสกัดใบหูกวางที่ใช้ในทุกการทดลอง ถ้ามิได้ให้รายละเอียดใดให้หมายถึงการนำใบหูกวางมาชั่งน้ำหนักตามความเข้มข้นที่ต้องการในแต่ละการทดลอง โดยใช้ใบหูกวางที่ผ่านการอบแห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ล้างในสารละลายด่างทับทิมเจือจาง 5 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง แล้วบรรจุใบหูกวางทั้งหมดลงในถุงผ้าใยสังเคราะห์ นำไปแช่น้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนในภาชนะสะอาดตามปริมาตรที่ต้องการ เช่น ต้องการเตรียมน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม (มิลลิกรัม/ลิตร) จะนำใบหูกวางแห้ง 500 กรัม แช่ในน้ำประปาปราศจากคลอรีน 500 ลิตร โดยแช่ใบหูกวางไว้เป็นเวลา 7 วัน เขย่าถุงผ้าที่ใส่ใบหูกวางวันละ 1-2 ครั้ง ทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน นำถุงผ้าที่ใส่ใบหูกวางออก จะได้น้ำสกัดใบหูกวางที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.4 ปรสิต : เตตร้าไฮมีนา

ปรสิตเตตร้าไฮมีนาที่ใช้ในทุกการทดลอง ถ้ามิได้ให้รายละเอียดใดให้หมายถึง *T. colissi* ซึ่งแยกเชื้อได้จากปลาหางนกยูงที่แสดงอาการครีบเปื่อย มีปื้นสีขาวที่ผิวหนัง นำเชื้อที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ proteose peptone ที่ประกอบด้วย proteose peptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ tryptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.02 เปอร์เซ็นต์ (ATCC culture medium 357, 10801 University Boulevard, Manassas, VA) ตรวจสอบสายพันธุ์ *T. colissi* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 400 เท่า จากรูปร่างลักษณะเฉพาะของปรสิต ที่มีรูปร่างกลม รี (pyriform shape) ขนาดความกว้างยาวเมื่อเจริญเต็มที่เฉลี่ย 40 × 50 ไมโครเมตร การย้อมสีซิลเวอร์อิมเพรกเนชั่น (silver impregnation stain) พบเส้นขนรอบตัว (ciliary meridian) จำนวน 20-30 แถว มีเส้นขนที่ยาวกว่าเส้นอื่นที่ด้านท้ายลำตัว (caudal cilium) มีปาก (microstome) อยู่บริเวณส่วนหัวม้วนพับเข้าในเซลล์และมีเยื่อบางๆ เรียงตัวกัน 3 ชั้น (paroral membrane) มีนิวเคลียส 1 อัน และ มีแวคคิวโอล จำนวนมากอยู่ภายในเซลล์ สามารถขยายพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบหนึ่งเป็นสอง (binary fission) เคลื่อนที่แบบอิสระไม่มีทิศทางแน่นอน มีการสร้างซีสต์ สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ proteose peptone ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

ทำการเก็บรักษาเชื้อ *T. colissi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ proteose peptone 25 เปอร์เซ็นต์ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้เชื้อเจริญอย่างช้า ๆ และคงสภาพอยู่ได้เป็นเวลานานขึ้น ทำการย้ายเชื้อ (subculture) ทุก 2 สัปดาห์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-31 องศาเซลเซียส ก่อนการ

ทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อ *T. colissi* มาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนอีกครั้ง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จึงทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการ

4.4.5 วิธีการทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังปลา

การทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังปลา ทำตามวิธี acid treated method (Ponpornpisit *et al*., 2000) โดยการวางยาสลบปลาด้วย 2 phenoxy ethanol จากนั้นนำปลาวางในจานแก้ว ใช้แผ่นสำลีซับเบา ๆ บริเวณโคนครีบหางของปลา นำแถบสำลีกว้าง 1 x 3 x 5 มิลลิเมตร ชุบกรดอะซิติคที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในปลาหางนกยูงและ 5 เปอร์เซ็นต์ในปลากัด วางทาบตามแนวยาวจากโคนครีบหางของปลาถึงส่วนปลายหางเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำแถบสำลีออกหยดน้ำสะอาดล้างตัวปลา

4.4.6 วิธีการทำให้ปลาติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา

นำปลาที่ถูกทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังไปพักในภาชนะที่บรรจุน้ำสะอาด และให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา เมื่อปลาฟื้นจากการสลบและว่ายน้ำเป็นปกติ ทำให้ปลาติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาโดยนำปลาใส่ในขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยม ปริมาตรน้ำ 500 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ความหนาแน่น 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปล่อยให้เกิดการติดเชื้อโดยเลี้ยงปลาในภาชนะดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดนำปลามาตรวจยืนยันการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยพบเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่บริวณโคนครีบหางปลาเป็นชนิดที่มีเม็ดสีภายในแวคคิวโอลของเซลล์ในปลาที่ให้ผลบวกและไม่พบเชื้อในปลาที่ให้ผลลบ นำเฉพาะปลาที่ให้ผลบวกและมีสุขภาพแข็งแรงเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.7 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการหายของแผลในปลากัดและปลาหางนกยูง

1. นำปลากัดจำนวน 100 ตัวจากฟาร์มในจังหวัดนครปฐม พักปรับสภาพเป็นเวลา3วันในตู้กระจก ที่มีน้ำประปากรองคลอรีนปริมาตร 50 ลิตร ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง
2. แบ่งปลา 7 กลุ่ม กลุ่มละ 1 ตัว ทำการทดลอง 6 ซ้ำ เลี้ยงปลาแต่ละกลุ่มในขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมปริมาตรน้ำ 400 มิลลิลิตร

   กลุ่มที่ 1 ปลาปกติเป็นกลุ่มควบคุม
   กลุ่มที่ 2 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง
   กลุ่มที่ 3 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง แช่ในยาปฏิชีวนะอ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน (oxytetracyclin) 100 พีพีเอ็ม
   กลุ่มที่ 4 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง แช่ในกรดแกลลิค (gallic acid) 0.2 %
   กลุ่มที่ 5 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง แช่ในกรดแกลลิค (gallic acid) 0.4 %
   กลุ่มที่ 6 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง แช่ในกรดแทนนิค (tannic acid) 0.04 %
   กลุ่มที่ 7 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง แช่ในน้ำสกัดใบหูกวาง 1,000 พีพีเอ็ม
3. ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ไม่มีการให้อาหาร เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกกลุ่ม ทุกวัน วันละ 200 มิลลิลิตร โดยกลุ่มที่ 3 – 6 จะทำการเติมสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการรักษาทดแทนในน้ำที่เปลี่ยนถ่ายให้มีความเข้มข้นคงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 5 วัน
4. สังเกตความผิดปกติทุกวัน เก็บตัวอย่างปลาแช่ในน้ำยาดองเนื้อเยื่อชนิดบูอิน (Bouin fixative) วันละ 2 ตัว เป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างที่ได้ส่งตัดชิ้นเนื้อตามวิธีทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อตรวจการหายของแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการหายของแผลในปลาหางนกยูงใช้วิธีการเดียวกับการศึกษาในปลากัดแต่ใช้ปลาหางนกยูงแทน โดยใช้ปลาหางนกยูงกลุ่มละ 5 ตัว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เลี้ยงในขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยม มีน้ำ 400 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน

4.4.8 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูง

1. นำปลากัดจำนวน 100 ตัวจากฟาร์มในจังหวัดนครปฐมพักปรับสภาพเป็นเวลา7 วัน ในตู้กระจก ที่มีน้ำประปากรองคลอรีนปริมาตร 50 ลิตร ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง
2. ทำให้ปลาทุกตัวติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งปลาเป็น 4 กลุ่ม ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แบ่งปลาเป็นกลุ่มละ 5 ตัว ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 7 ตัวในการทดลองครั้งที่ 2 เลี้ยงปลาแต่ละกลุ่มในขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยม ปริมาตรน้ำ 800 มิลลิลิตร

   กลุ่มที่ 1 ปลาปกติเป็นกลุ่มควบคุม
   กลุ่มที่ 2 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง
   กลุ่มที่ 3 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง และติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา แช่ในน้ำสกัดใบหูกวาง 50 พีพีเอ็ม
   กลุ่มที่ 4 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง และติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา แช่ในน้ำสกัดใบหูกวาง 100 พีพีเอ็ม
   กลุ่มที่ 5 ปลาที่ทำให้เกิดแผลที่ผิวหนัง และติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา แช่ในน้ำสกัดใบหูกวาง 200 พีพีเอ็ม

3. ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ให้อาหารปริมาณน้อยทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกกลุ่ม ทุกสองวัน ครั้งละ 200 มิลลิลิตร โดยกลุ่มที่ 3 – 5 จะทำการเติมน้ำสกัดใบหูกวางทดแทนในน้ำที่เปลี่ยนถ่ายให้มีความเข้มข้นคงที่ตลอดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน
4. นับอัตราการตาย และแยกปลาที่ตายออกทุกวัน เก็บตัวอย่างปลาที่ตายแช่ในน้ำยาดองเนื้อเยื่อชนิดบูอิน (Bouin fixative) เพื่อตรวจผลการรักษาทางจุลพยาธิวิทยา

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลาหางนกยูง ใช้วิธีการเดียวกับการศึกษาในปลากัดแต่ใช้ปลาหางนกยูงแทน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ใช้ปลาหางนกยูงกลุ่มละ 5 ตัว และ 7 ตัว ในการทดลองครั้งที่ 1 และการทดลองครั้งที่ 2 ตามลำดับ เลี้ยงในขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยม มีน้ำ 800 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน

4.4.9 วิธีการใช้ใบหูกวางรักษาปลาหางนกยูงป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* ในฟาร์ม

นำปลาหางนกยูงที่ตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธี microscopic method พบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* จากฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม ตรวจพบอัตราการป่วย 70 เปอร์เซ็นต์ อัตราการตายที่ 48 ชั่วโมง 40 เปอร์เซ็นต์

1. นำปลาหางนกยูงป่วยดังกล่าวจำนวน 640 ตัว แบ่งปลาเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 40 ตัว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในตู้กระจกขนาดความจุ 60 ลิตร เติมน้ำประปาตู้ละ 20 ลิตร
2. นำใบหูกวางแห้งมาล้างและจุ่มในสารละลายด่างทับทิมที่ความเข้มข้น5เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วินาที นำไปใส่ในตู้ปลากลุ่มที่ 1–4 ที่ความเข้มข้น 0, 1,000, 2,000 และ 3,000 พีพีเอ็มตามลำดับ
3. ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ให้อาหารปริมาณน้อยทุกวัน วันละ 1 ครั้ง นับจำนวนปลาตายทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.10 วิธีการใช้ใบหูกวางร่วมกับเกลือแกงในการรักษาปลาหางนกยูงป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* ในฟาร์ม

1. นำปลาหางนกยูงป่วยดังกล่าวจำนวน 48 ตัว แบ่งปลาเป็น 12 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยม ปริมาตรน้ำ 500 มิลลิลิตร
2. นำใบหูกวางแห้งมาล้างและจุ่มในสารละลายด่างทับทิมที่ความเข้มข้น5เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 วินาที นำไปใส่ในตู้ปลาร่วมกับเกลือแกง (NaCl) ดังนี้

กลุ่มที่ 1	0 % NaCl ไม่ใส่ใบหูกวาง
กลุ่มที่ 2	0 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 1,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 3	0 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 2,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 4	0 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 3,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 5	0.5 % NaCl ไม่ใส่ใบหูกวาง
กลุ่มที่ 6	0.5 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 1,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 7	0.5 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 2,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 8	0.5 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 3,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 9	1.0 % NaCl ไม่ใส่ใบหูกวาง
กลุ่มที่ 10	1.0 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 1,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 11	1.0 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 2,000 พีพีเอ็ม
กลุ่มที่ 12	1.0 % NaCl ใส่ใบหูกวาง 3,000 พีพีเอ็ม

3. ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลา ให้อาหารปริมาณน้อยทุกวัน วันละ 1 ครั้ง นับจำนวนปลาตายทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการหายของแผลในปลากัดและปลาหางนกยูง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการหายของแผลในปลากัดและปลาหางนกยูง พบว่าในระยะเวลา 5 วันที่ทำการทดลอง ปลากัดที่ถูกทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษาและกลุ่มที่ได้รับการรักษามีอัตราตาย 0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1) ในขณะที่ปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษามีอัตราตาย 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) จากการสังเกตพบว่าแผลที่ผิวหนังปลากัดหายได้รวดเร็วกว่าแผลที่ผิวหนังปลาหางนกยูง

การทำให้เกิดแผลและการทำให้ปลาติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในห้องปฏิบัติการในปลากัดและปลาหางนกยูงตามวิธีของ Ponpornpisit และคณะ (2000) ที่ศึกษาการแทรกตัวของเชื้อเตตร้าไฮมีนาเข้าสู่ผิวหนังปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลต่างชนิดกัน การศึกษาดังกล่าวใช้กรดอะซิติคที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ทำให้เกิดบาดแผลที่เยื่อบุผิวหนังปลาทั้งชั้นอิพิเดอมิสและชั้นเดอมิสทั้งในแนวกว้างและแนวลึก เปิดช่องทางให้เชื้อเตตร้าไฮมีนาแทรกตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังได้ง่ายขึ้น การใช้ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้พบว่าทำให้มีอัตราการตายสูง ดังนั้นจึงได้ปรับใช้ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติคลดลงและใช้ระยะเวลาการสัมผัสกรดกับผิวหนังปลาน้อยลง เพื่อให้เกิดบาดแผลในระดับที่ไม่รุนแรงเกินไปและไม่ทำให้ปลาตายจากบาดแผลที่เกิดขึ้น การที่ปลาหางนกยูงในการศึกษานี้มีความทนทานต่อการเกิดแผลน้อยกว่าอาจเกิดจากปัจจัยในตัวปลาหางนกยูงเอง ได้แก่ อายุ เพศ สายพันธุ์ ขนาด สภาพร่างกาย ลักษณะการเรียงตัวและความหนาของเซลล์ที่ผิวหนัง รวมถึงปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ อาหาร การจัดการ (Elliot, 2000)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 อัตราตายของปลากัดที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลในระหว่างการรักษาเป็นเวลา 5 วัน

treatments	(n)	mean mortality rates (%)
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม	12	0±0
กลุ่มที่ 2 ทำให้เกิดแผล ไม่ทำการรักษา	12	0±0
กลุ่มที่ 3 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย oxytetracyclin 100 ppm	12	0±0
กลุ่มที่ 4 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย gallic acid 0.2 %	12	0±0
กลุ่มที่ 5 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย gallic acid 0.4 %	12	0±0
กลุ่มที่ 6 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย tannic acid 0.04 %	12	0±0
กลุ่มที่ 7 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย น้ำสกัดใบหูกวาง 1,000 ppm	12	0±0

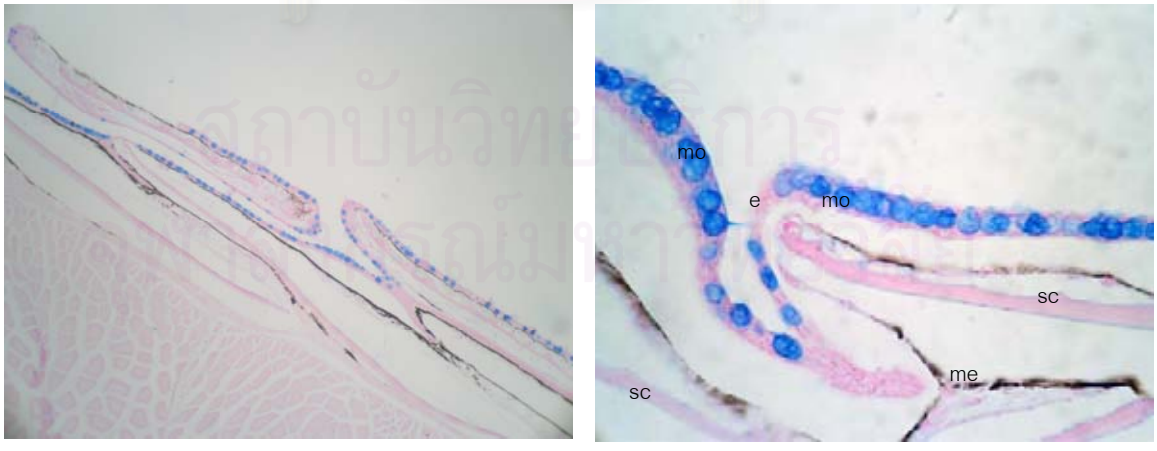
ตารางที่ 4.2 อัตราตายของของปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้เกิดบาดแผลในระหว่างการรักษาเป็นเวลา 5 วัน

treatments	(n)	mean mortality rates (%)
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม	15	0±0
กลุ่มที่ 2 ทำให้เกิดแผล ไม่ทำการรักษา	15	20±0
กลุ่มที่ 3 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย oxytetracyclin 100 ppm	15	0±0
กลุ่มที่ 4 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย gallic acid 0.2 %	15	20±0
กลุ่มที่ 5 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย gallic acid 0.4 %	15	0±0
กลุ่มที่ 6 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย tannic acid 0.04 %	15	0±0
กลุ่มที่ 7 ทำให้เกิดแผล รักษาด้วย น้ำสกัดใบหูกวาง 1,000 ppm	15	0±0

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า ปลากัดและปลาหางนกยูงกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกทำให้เกิดแผลมีผิวหนังเป็นปกติ (ภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.6) ปลากัดและปลาหางนกยูงกลุ่มที่ถูกทำให้เกิดแผลในวันที่ 0 พบการลอกหลุดของชั้น epidermis ได้แก่ epithelial cells, mucous cells, basal cells และบางส่วนของชั้น dermis ได้แก่ scales และ muscle (ภาพที่ 4.7 และภาพที่ 4.8) ในวันที่ 1

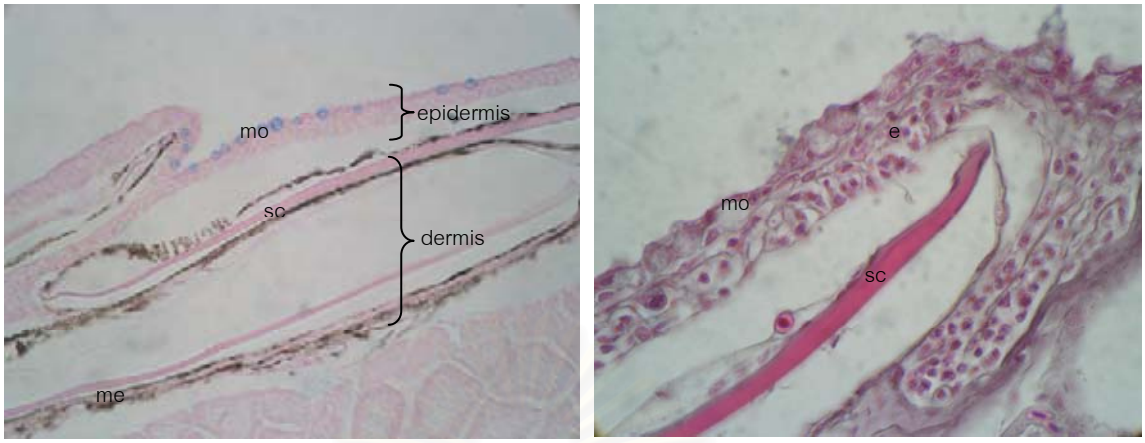
ยังคงพบรอยโรคดังกล่าวแต่เริ่มมี regeneration และมี regeneration เพิ่มมากขึ้นจนเกือบเป็นปกติในวันที่ 3 โดยปลากัดและปลาหางนกยูงกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน (oxytetracyclin) 100 พีพีเอ็ม กรดแกลลิค (gallic acid) 0.4 เปอร์เซ็นต์ กรดแทนนิค (tannic acid) 0.04 พีพีเอ็ม และน้ำสกัดใบหูกวาง 1,000 พีพีเอ็ม มี regeneration รวดเร็วกว่าแต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละกลุ่มได้ (ภาพที่ 4.9, 4.10 และ 4.11) พบตะกอนสีดำที่เกิดจากน้ำสกัดใบหูกวางจับตัวกับโปรตีนเกาะที่เยื่อบุผิวหนัง และการเพิ่มจำนวนของเม็ดสีเมลานินที่ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง (ภาพที่ 4.12)

จากการศึกษาเปรียบเทียบการทำให้ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาด้วยวิธีการใช้กรดอะซิติคทำให้เกิดแผลในห้องปฏิบัติการในปลาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปลาหางนกยูง ปลานีออน ปลาเมดาก้า ปลาทอง ปลาพลาตี้ ปลาเทวดา และปลาดุก พบว่าปลาที่มีความทนทานต่อการติดเชื้อ เช่น ปลาดุก และปลาทอง มีผิวหนังหนากว่าปลาที่มีความไวต่อการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนา (Ponpornpisit *et al*., 2000) ปลาหางนกยูงที่ได้รับแสงสว่างมีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่าปลาที่เลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 – 27 องศาเซลเซียสทำให้เชื้อเตตร้าไฮมีนาเพิ่มจำนวนมากขึ้น การเลี้ยงปลาที่ความหนาแน่นสูง การขนส่ง การเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ รวมถึงสารอินทรีย์ในน้ำล้วนเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้ปลาหางนกยูงอ่อนแอและมีโอกาสติดเชื้อได้มากขึ้น (Leibowitz *et al*., 2005) กรณีปลากัดยังไม่เคยมีรายงานการใช้กรดอะซิติคทำให้เกิดบาดแผลและการทำให้ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาครั้งแรกที่พบว่าสามารถใช้กรดอะซิติคทำให้เกิดแผลและการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดได้



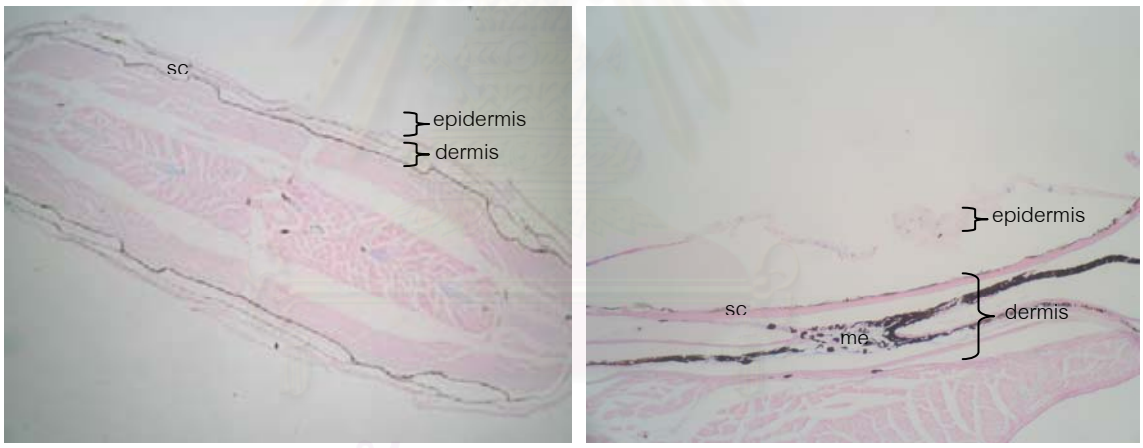
ก. ข.

ภาพที่ 4.5 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดที่ไม่มีแผล** (alcian blue stain) **ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 40 **เท่า (ก.) และกำลังขยาย** 400 **เท่า (ข.) พบการเรียงตัวปกติของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและชั้นเดอมิส**



ก. ข.

ภาพที่ 4.6 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงที่ไม่มีแผล ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 40 **เท่า** (alcian blue stain) (ก.) **และกำลังขยาย** 400 **เท่า** (H & E stain)(ข.) **พบการเรียงตัวปกติของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและชั้นเดอมิส**

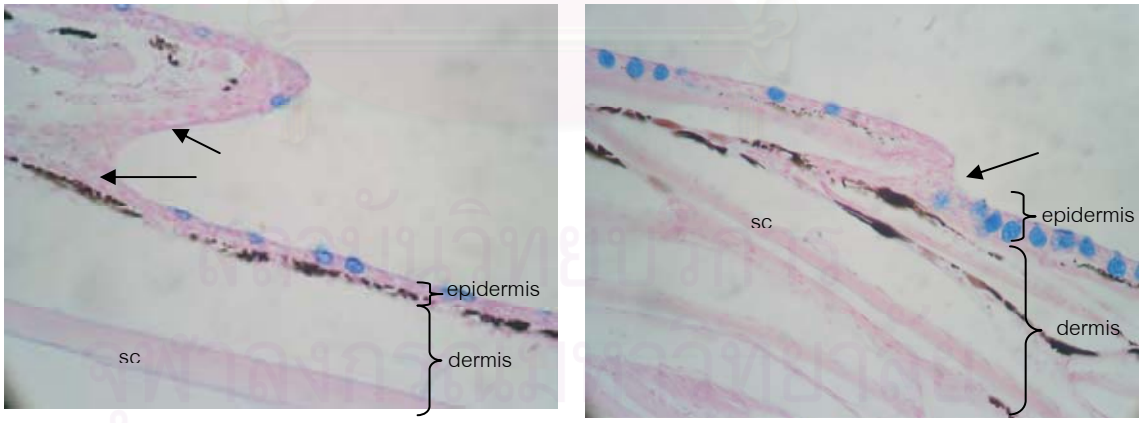


ก. ข.

ภาพที่ 4.7 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดในวันที่ถูกทำให้เกิดแผล ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 40 **เท่า (ก.) และกำลังขยาย** 100 **เท่า (ข.)** (alcian blue stain) **พบการฉีกขาดของเนื้อเยื่อชั้นอิพิ-เดอมิสและบางส่วนของเนื้อเยื่อชั้นเดอมิส**

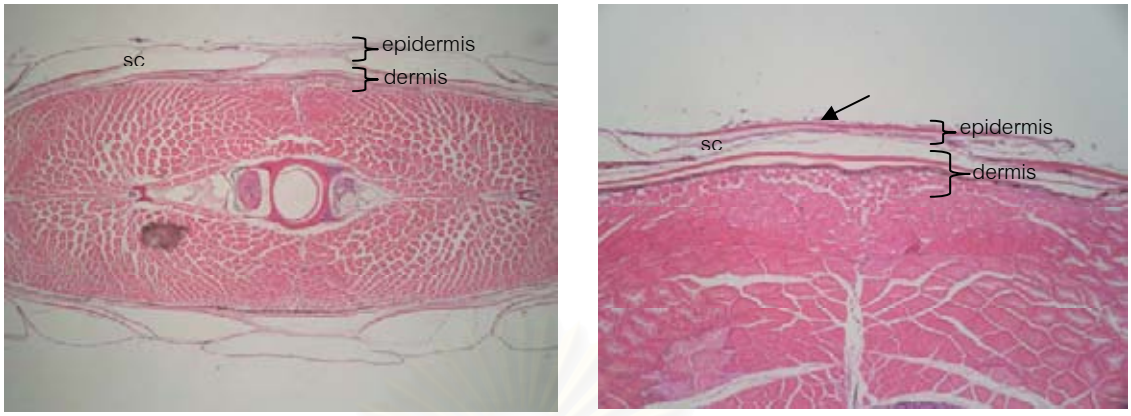
ก. ข.

ภาพที่ 4.8 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงในวันที่ถูกทำให้เกิดแผล ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 40 **เท่า (ก.) และกำลังขยาย** 100 **เท่า (ข.) (**H & E stain**) พบการฉีกขาดของเนื้อเยื่อชั้นอิพิเดอมิสและบางส่วนของเนื้อเยื่อชั้นเดอมิส**



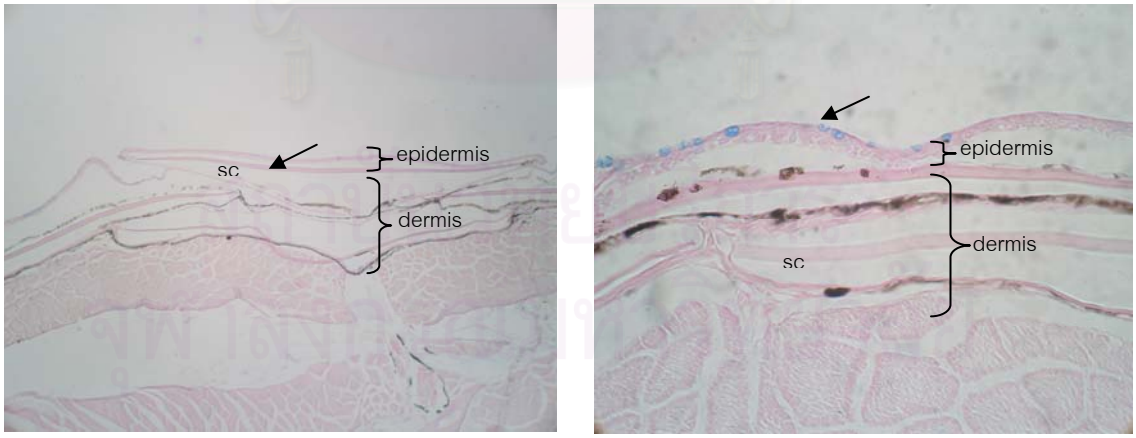
ก. ข.

ภาพที่ 4.9 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดที่ถูกทำให้เกิดแผลในวันที่**1 **(ก.) และวันที่** 3 **(ข.) ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 400 **เท่า (**alcian blue stain**) พบการเจริญของเยื่อบุผิวชั้นอิพิเดอมิส (ศรชี้)**



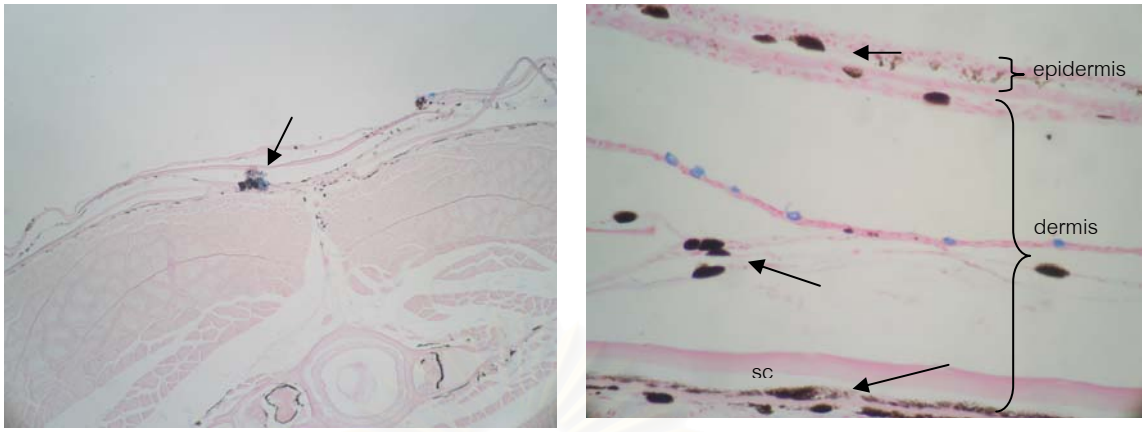
ก. ข.

ภาพที่ 4.10 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลากัดที่ถูกทำให้เกิดแผลในวันที่** 1 **ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 40 **เท่า (ก.) และกำลังขยาย** 100 **เท่า (ข.) (**H & E stain**) เริ่มมีการเจริญของเยื่อบุผิวทดแทนและยังพบการลอกหลุดของเยื่อบุผิวชั้นอิพิเดอมิสบางส่วน (*ศรชี้*)**



ก. ข.

ภาพที่ 4.11 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้เกิดแผล วันที่** 3 **ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 100 **เท่า (ก.) และกำลังขยาย** 400 **เท่า (ข.) (**alcian blue stain**) พบการเจริญของเยื่อบุผิวทดแทนที่สมบูรณ์ (*ศรชี้*)**



ก. ข.

ภาพที่ 4.12 **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผิวหนังปลาหางนกยูงที่รักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย** 100 **เท่า (ก.) และกำลังขยาย** 400 **เท่า (ข.) (alcian blue stain) มีตะกอนสีดำและการเพิ่มจำนวนของเม็ดสีเมลานินในชั้นเดอมิสและอิพิเดอมิส (ศรชี้)**

4.6 ประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูงที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การใช้วิธีการทำให้เกิดแผล (acid treated method) เพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัด โดยใช้กรดอะซิติคทำให้เกิดแผลที่โคนครีบหาง พบว่าเมื่อใช้กรดเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ทาบที่โคนครีบหางปลาเป็นเวลา 1 นาทีไม่พบปลาตาย และปลาติดเชื้อ แม้จะให้ปลาสัมผัสเชื้อจนถึง 48 ชั่วโมง ในขณะที่การทาบเป็นเวลา 2 นาที พบปลาตายที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ตรวจไม่พบการติดเชื้อ และยังคงตรวจไม่พบการติดเชื้อในปลาที่เหลือแม้จะผ่านไปถึง 48 ชั่วโมงก็ตาม ในขณะที่การทาบด้วยกรดเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลาติดเชื้อทั้งหมด และทำให้ปลาที่ติดเชื้อครึ่งหนึ่งตายเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 อัตราการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาและอัตราการตายของปลากัดที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วยวิธี acid treated method

acetic acid (%)	exposure time (min)	24 hour			48 hour		
		infection rate (%)	mean intensity (number)	mortality rate (%)	infection rate (%)	mean intensity (number)	mortality rate (%)
10	1	100	10	50	100	10	50
	2	100	10	50	100	10	50
5	1	0	0	50	0	0	50
	2	0	0	50	0	0	0

การใช้วิธีการทำให้เกิดแผล (acid treated method) เพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อเตตร้า-ไฮมีนาในปลาหางนกยูงพบว่าเมื่อใช้กรดเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ทาบที่โคนหางปลาหางนกยูงเป็นเวลา 1 นาที หรือ 2 นาที และเมื่อใช้กรดเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทาบเป็นเวลา 2 นาที ปลาทั้งหมดจะตายภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจบริเวณรอยแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อเตตร้าไฮมีนาจำนวนน้อย (1-5 เซลล์) หรือไม่พบเลย ในขณะที่การใช้กรดอะซิติคเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทาบ 1 นาทีจะทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง และเมื่อตรวจบริเวณแผลของปลาทั้งหมดจะพบเชื้อเตตร้าไฮมีนาจำนวนมาก (มากกว่า 10 เซลล์) และพบเม็ดสีภายในแวคคิวโอลของเซลล์ ส่วนการทำให้เกิดบาดแผลด้วยกรดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นั้นไม่พบการติดเชื้อหรือการตายภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรก แต่พบการตายโดยไม่มีการติดเชื้อในกลุ่มที่ทาบกรดเป็นเวลา 1 นาที และพบการตายโดยมีการติดเชื้อในกลุ่มที่ทาบด้วยกรดเป็นเวลา 2 นาที ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 อัตราการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาและอัตราการตายของปลาหางนกยูงที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วยวิธี acid treated method

acetic acid (%)	exposure time (min)	24 hour			48 hour		
		infection rates (%)	mean intensity (number)	mortality rates (%)	infection rates (%)	mean intensity (number)	mortality rates (%)
10	1	100	1-5	100	-	-	-
	2	100	1-5	100	-	-	-
5	1	100	1-5	100	-	-	-
	2	100	1-5	100	-	-	-
3	1	100	1-5	100	-	-	-
	2	100	1-5	100	-	-	-
2	1	100	10	50	100	1-5	50
	2	100	1-5	100	-	-	-
1	1	0	0	0	50	1-5	50
	2	0	0	0	0	0	50

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัด พบว่าปลากัดที่มีแผลแต่ไม่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนามีอัตรารอด 52.22 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลากัดที่มีแผลร่วมกับการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนามีอัตรารอด 22.22 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับน้ำสกัดใบหูกวาง 50, 100 และ 200 พีพีเอ็ม มีอัตรารอด 36.67, 56.67 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ตรวจไม่พบเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ผิวหนังปลาที่รอดชีวิตทั้งหมด

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลาหางนกยูงพบว่าปลาหางนกยูงที่มีแผลแต่ไม่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนามีอัตรารอด 83.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาหางนกยูงที่มีแผลร่วมกับการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนามีอัตรารอด 27.78 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ติดเชื้อและได้รับน้ำสกัดใบหูกวาง 50, 100 และ 200 พีพีเอ็ม มีอัตรารอด 33.33, 16.67 และ 22.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ตรวจพบเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ผิวหนังปลาที่รอดชีวิตในระดับต่ำ

ตารางที่ 4.5 อัตรารอดของปลากัดที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาด้วย acid treated methodและรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

parameters	mean survival rates (%)
acid treated without *Tetrahymena*	52.22
acid treated with *Tetrahymena*	22.22
acid treated with *Tetrahymena*+ 50 ppm leaves extract	36.67
acid treated with *Tetrahymena*+ 100 ppm leaves extract	56.67
acid treated with *Tetrahymena*+ 200 ppm leaves extract	51.11

ตารางที่ 4.6 อัตรารอดของปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาด้วย acid treated method และรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆกัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

parameters	mean survival rates (%)
acid treated without *Tetrahymena*	83.33
acid treated with *Tetrahymena*	27.78
acid treated with *Tetrahymena*+ 50 ppm leaves extract	33.33
acid treated with *Tetrahymena*+ 100 ppm leaves extract	16.67
acid treated with *Tetrahymena*+ 200 ppm leaves extract	22.22

ความสำเร็จในการรักษาปลาที่ติดเชื้อปรสิตขึ้นกับความเหมาะสมหลายปัจจัย เช่น การเลือกใช้ยาหรือสารเคมี ระดับความเข้มข้นที่ใช้ วิธีการใช้ การติดเชื้อกลับซ้ำ เป็นต้น (Taylor, 1999) แม้การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมีข้อดีหลายประการได้แก่การลดรายจ่ายผู้เลี้ยงปลา ความปลอดภัยสูง ลดการใช้ยาและสารเคมีนำเข้าจากต่างประเทศ ใช้รักษาโรคที่ไม่รุนแรงที่มีโอกาสเกิดการดื้อยาสูง เช่นโรคปรสิตภายนอกต่าง ๆ ได้ แต่การใช้สมุนไพรก็มีข้อจำกัดหลายประการ พืชสมุนไพรบางชนิดหายาก ปริมาณไม่เพียงพอ วิธีการใช้ ปริมาณการใช้ไม่แน่นอนการใช้เพียงชนิดเดียวมักไม่ค่อยได้ผล การให้ผลการรักษาช้า (จินตนา อินทรมงคลและคณะ, 2546) การที่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาสวยงามนำใบหูกวางมาใช้ในการเลี้ยงปลากัดเป็นการนำมาใช้เนื่องจากใบหูกวางหาได้ง่ายไม่มีค่าใช่จ่าย ผลที่เกิดขึ้นดีหรือไม่อย่างไรวัดจากความรู้สึกไม่มีการวิจัยที่สนับสนุน การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาวิเคราะห์และพิสูจน์ว่าการใช้ใบหูกวางที่กันอยู่นั้นมีประโยชน์หรือไม่ในแง่ของการรักษาแผลและเพิ่มอัตรารอดให้กับปลาที่ติดเชื้อปรสิตเตตร้าไฮมีนาการศึกษาครั้งนี้พบว่าใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางสามารถใช้ได้ในกรณีที่ปลากัดหรือปลาหางนกยูงมีบาดแผลที่ไม่รุนแรง

ไม่มีการอักเสบ การสมานแผลน่าจะเกิดจากคุณสมบัติในการสมานแผล (astringents) และต้านการอักเสบ (antiinflammation) ของกรดแทนนิคที่ตรวจพบในใบหูกวาง (Scalbert, 1991) (Chattopadhyay *et al*., 2002; Nagappa *et al*., 2003; Fan *et al*., 2004; Chyau *et al*., 2006) โดยจะพบว่าทั้งปลากัดและปลาหางนกยูงมีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนจนเกือบเป็นปกติในวันที่ 3 ของการรักษาแต่เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอ๊อกซี่เตตร้าซัยคลินไม่พบว่าการใช้ใบหูกวางให้ผลดีกว่าหรือไม่ ตะกอนสีดำที่เกิดจากน้ำสกัดใบหูกวางจับตัวกับโปรตีนเกาะที่เยื่อบุผิวหนังน่าจะมีส่วนสำคัญช่วยในการห้ามเลือดในกรณีที่เกิดบาดแผลทำให้เลือดหยุดเร็วขึ้น การเพิ่มจำนวนเม็ดสีเมลานินที่ผิวหนังเป็นขบวนการที่ช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (Balm *et al*.,1995; Harris and Bird, 1998; Elliot, 2000) การใช้น้ำสกัดใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาทำให้ปลากัดมีอัตรารอดสูงขึ้น แต่การใช้รักษาในปลาหางนกยูงไม่ช่วยให้มีอัตรารอดสูงขึ้นทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะว่าเชื้อเตตร้าไฮมีนาเป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูงแต่ไม่ก่อโรครุนแรงในปลากัด ถึงแม้จะทำให้เกิดการติดเชื้อที่บาดแผลได้แต่เป็นการติดเชื้อในระดับต่ำเมื่อได้รับการรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางจึงหายได้เร็วและไม่พบเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ถูกทำลายไป เมื่อเปรียบเทียบกับปลาหางนกยูงแล้วปลากัดนับว่ามีความทนทานต่อการเกิดแผลและการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนามากกว่าปลาหางนกยูงสอดคล้องกับทุกรายงานที่ศึกษาการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาว่าเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยและก่อโรครุนแรงอย่างมากในปลาหางนกยูง (ฐิติพร หลาวประเสริฐและคณะ, 2001; Lawhavinit, 2002; อรัญญา พลพรพิสิฐและคณะ, 2003; Lom and Dykova, 1992; Ponpornpisit *et al*., 2000; Leibowitz *et al*., 2005) การศึกษาในปลาม้าลายพบว่าเมื่อเกล็ดปลาหลุดออกไปแล้วการเจริญขึ้นใหม่ของเกล็ดปลาม้าลายมีเพียง 7.45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 15 วัน (Sire *et al*., 2000) การที่ปลาหางนกยูงมีผิวหนังบางกว่าปลากัดเมื่อเกิดบาดแผลจะมีโอกาสที่เกล็ดจะหลุดได้ง่ายกว่า และเมื่อไม่มีการเจริญทดแทนหรือมีการเจริญทดแทนช้า จึงเป็นช่องทางให้เกิดการติดเชื้อต่าง ๆ ได้ง่าย ในขณะที่ปลากัดแม้เยื่อบุผิวชั้นอิพิเดอมิสจะถูกทำลายแต่เกล็ดที่อยู่ในชั้นเดอมิสยังปกคลุมผิวหนังปลาอยู่จึงป้องกันการแทรกตัวของเชื้อเตตร้าไฮมีนาได้มากกว่า อย่างไรก็ตามน้ำสกัดใบหูกวางในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา 50–200 พีพีเอ็มซึ่งเป็นระดับใกล้เคียงกับที่เกษตรกรใช้ในฟาร์มที่ความเข้มข้นประมาณ 1 ใบต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ 100 พีพีเอ็ม ไม่สามารถกำจัดเชื้อเตตร้าไฮมีนาทั้งหมด เนื่องจากการทดลองในบทที่ผ่านมา พบว่าค่า MIC ของน้ำสกัดใบหูกวางต่อเชื้อเตตร้าไฮมีนาเท่ากับ 2,000 พีพีเอ็ม โดยระดับความเข้มข้น 6,761 พีพีเอ็มและ 5,281 พีพีเอ็ม จะเป็นพิษต่อปลากัดและปลาหางนกยูงทำให้มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ การไม่สามารถกำจัดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในร่างกายปลาและในน้ำเลี้ยงปลาได้หมดทำให้เชื้อที่ยังคงเหลืออยู่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้อีก ทั้งนี้เชื้อเตตร้าไฮมีนาสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้โดยการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและเพิ่มจำนวนได้

อย่างรวดเร็วโดยการแบ่งตัวแบบหนึ่งเป็นสอง (binary fission) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (Elliott, 1973) เช่น การใช้ใบหูกวางแห้งใส่ลงในบ่อหรือตู้เลี้ยงปลานานเกิน 3 วันซึ่งจะมีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในน้ำหรือมีการให้อาหารปลาทำให้มีอาหารและสภาพแวดล้อมในน้ำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเชื้อจึงทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้นดังนั้นปลาที่ได้รับการรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวจึงมีโอกาสเกิดโรคกลับซ้ำได้ถ้าผิวหนังยังมีบาดแผลซึ่งเป็นช่องทางให้เชื้อแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อผิวหนังได้

4.7 การใช้ใบหูกวางรักษาปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* ในฟาร์ม

เมื่อนำปลาหางนกยูงที่ป่วย และตรวจพบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐมมาทดลองทำการรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางในห้องปฏิบัติการ พบว่าอัตรารอดของปลาที่ได้รับการรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ 0, 1,000, 2,000 และ 3,000 พีพีเอ็ม เท่ากับ 47.5, 56.25, 18.75 และ 17.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 แสดงอัตรารอดของปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาจากฟาร์มเมื่อรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

parameters	(n)	mean survival rate (%)
0 ppm leaf extract (control)	40	47.5
1,000 ppm leaf extract	40	56.25
2,000 ppm leaf extract	40	18.75
3,000 ppm leaf extract	40	17.5

การนำปลาป่วยจากฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม มาทำการแยกเชื้อ เลี้ยงเพิ่มจำนวน และการย้อมสีซิลเวอร์อิมเพรกเนชั่นร่วมกับการวัดขนาดและตรวจดูโครงสร้างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างพบเชื้อเตตร้าไฮมีนาคอลิซชี่ (*Tetrahymena corlissi*) เนื่องจากเป็นโปรโตซัวรูปร่างกลมรี มีแนวเส้นขนรอบตัว 25-31 แถว มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 10-90 μm และมี caudal cilium (Corliss, 1970 ; Elliott, 1973) ซึ่ง *T. corlissii* เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงในปลาหางนกยูงและเป็นเตตร้าไฮมีนาชนิดที่ดำรงชีพเป็นปรสิต (parasitic form) (ฐิติพร หลาวประเสริฐและคณะ, 2001; Corliss, 1970 ; Elliott, 1973; Lawhavinit, 2002; Lom and Dykova, 1992) เมื่อนำใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าระดับที่เกษตรกรใช้ในฟาร์ม

มาทดลองใช้รักษาโรคติดเชื้อดังกล่าวในปลาหางนกยูงที่ป่วย และตรวจพบการติดเชื้อจากฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ปลาหางนกยูงป่วยมีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษาแต่ยังคงมีปลาบางส่วนตาย น่าจะเป็นเพราะว่าที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม นั้นยังเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่สามารถกำจัดเชื้อเตตร้าไฮมีนาได้ทั้งหมดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่พบในปลาป่วยนี้เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงทำให้เชื้อบางส่วนที่ไม่ถูกทำลายมีการเพิ่มจำนวนและสามารถก่อโรคในปลาที่อ่อนแอได้ การศึกษาสารสกัดหยาบใบหูกวางในการรักษาปรสิตเซลล์เดียวชนิดเห็บระฆังในปลานิล พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 800 พีพีเอ็มสามารถกำจัดเห็บระฆังได้เมื่อใช้เป็นเวลา 2 วัน (Chitmanat, 2005) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นที่สูง 2,000 – 3,000 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูงเท่ากับและมากกว่าระดับน้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเตตร้าไฮมีนา ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวอาจทำลายเชื้อได้แต่เป็นระดับความเข้มข้นที่สูงใกล้เคียงกับระดับที่มีความเป็นพิษต่อปลาจึงทำให้ปลาบางส่วนที่อ่อนแอมากไม่สามารถทนทานได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในธรรมชาตินั้นมีเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วยซึ่งทำให้มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูงกว่าการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาเพียงชนิดเดียว ซึ่งการติดเชื้อปรสิตร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดมักพบได้บ่อยกว่าการติดเชื้อชนิดเดียว (Egusa, 1992) และการติดเชื้อร่วมกันของปรสิตมากกว่าสองชนิดเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายมากกว่าการติดเชื้อเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง (Woo, 1995) ปรสิตที่ผิวหนังยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน (Schâperclaus, 1986 ; Egusa, 1992; Taylor, 1999; Noga, 2000)

4.8 การใช้ใบหูกวางร่วมกับเกลือแกงในการรักษาปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อ *T. corlissi*

เมื่อนำปลาหางนกยูงที่ป่วย และตรวจพบการติดเชื้อ *T. corlissi* จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาหางนกยูงแห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐมมาทดลองทำการรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวางร่วมกับเกลือแกงพบว่าปลาหางนกยูงที่ได้รับการรักษาด้วยเกลือแกง 0.5, 1.0 เปอร์เซ็นต์ และที่ได้รับการรักษาด้วยน้ำสกัดใบหูกวาง 1,000 พีพีเอ็มร่วมกับเกลือแกง 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาหางนกยูงในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษามีอัตรารอด 0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 อัตรารอดของปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาจากฟาร์มเมื่อรักษาด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับน้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้นต่าง ๆกัน เป็นเวลา 7 วัน

parameters	(n)	mean survival rate (%)
0 % NaCl + 0 ppm leaf extract	4	0
0 % NaCl +1,000 ppm leaf extract	4	0
0 % NaCl + 2,000 ppm leaf extract	4	25
0 % NaCl + 3,000 ppm leaf extract	4	75
0.5 % NaCl + 0 ppm leaf extract	4	100
0.5 % NaCl +1,000 ppm leaf extract	4	75
0.5 % NaCl + 2,000 ppm leaf extract	4	25
0.5 % NaCl + 3,000 ppm leaf extract	4	75
1.0 % NaCl + 0 ppm leaf extract	4	100
1.0 % NaCl +1,000 ppm leaf extract	4	100
1.0 % NaCl + 2,000 ppm leaf extract	4	75
1.0 % NaCl + 3,000 ppm leaf extract	4	75

การทดลองใช้ใบหูกวางร่วมกับเกลือแกงในการรักษาปลาหางนกยูงป่วยที่ตรวจพบการติดเชื้อ *Tetrahymena corlissi* ในฟาร์ม พบว่าเกลือแกงช่วยให้ปลาป่วยมีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งการใช้เกลือแกงเพียงอย่างเดียวและการใช้เกลือแกงร่วมกับใบหูกวาง เกลือแกงเมื่อเติมลงในน้ำทำให้เกิดภาวะ hyperosmolarity จึงดึงน้ำออกจากตัวปลา ลดการบวม และช่วยกระตุ้นให้ปลามีการขับเมือกมากขึ้นทำให้ปรสิตหลุดออกและอาจดึงน้ำออกจากเซลล์เตตร้าไฮมีนาโดยตรงทำให้เซลล์เหี่ยวและตายไป (Schâperclaus, 1986)

4.9 **สรุป**

ใบหูกวางหรือน้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม สามารถนำมาใช้ในการสมานแผลปลากัดและปลาหางนกยูงที่มีบาดแผลที่ผิวหนังเพียงเล็กน้อยได้ ในกรณีที่มีการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาร่วมด้วยนั้นการใช้น้ำสกัดใบหูกวางที่ความเข้มข้น 50-200 พีพีเอ็ม ช่วยทำให้ปลากัดและปลาหางนกยูงมีอัตรารอดเพิ่มขึ้นแต่เนื่องจากไม่สามารถกำจัดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่มีในตัวปลาหางนกยูงได้ทั้งหมดจึงมีโอกาสติดเชื้อกลับซ้ำได้ อย่างไรก็ดี การติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยเนื่องจากแผลที่ผิวหนังปลากัดหายได้เร็ว การใช้ใบหูกวางที่ความเข้มข้น 1,000 – 3,000 พีพีเอ็มร่วมกับเกลือแกงที่ความเข้มข้น 0.5 – 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาแผลและลดการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่เกิดการระบาดขึ้นในฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงมีส่วนช่วยลดอัตราการตายของปลาได้มากกว่าการไม่ใช้หรือการใช้ใบหูกวางเพียงชนิดเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

จินตนา อินทรมงคล กัลยาณี พรหมสุภา ธัญญาธร จรัณยานนท์ ประภัสสร วุฒิปาณี และนิสาชล ศรีอ่อน. 2546. การประมวลภูมิปัญญาท้องถิ่นการใช้สมุนไพรในโค-กระบือในภาคตะวันตก. เอกสารสรุปรายงานสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ฐิติพร หลาวประเสริฐ เฉลิมพล ไกรศรี สุปราณี ชินบุตร. 2544. การศึกษาโรคตัวเปื่อยในปลาหางนกยูง วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ. กรมประมง. 11 (2) : 5-6.

อรัญญา พลพรพิสิฐ ศักดิ์ชัย โตภาณุรักษ์ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2003. การสำรวจปรสิตภายนอกที่พบในปลาหางนกยูงที่ตลาดซันเดย์. วารสารการประมง. 56 (6): 571-577.

อรัญญา พลพรพิสิฐ ศักดิ์ชัย โตภาณุรักษ์ มงคล เตชะกำพุ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2006. ปรสิตภายนอกที่พบในปลาหางนกยูงส่งออกและแนวทางการพัฒนาคุณภาพ. วารสารการประมง. 59 (2): 127-133.

Balm, P.H.M., Iger, Y., Prunet ,P., Pottinger, T.G. and Wendelaar Bonga, S.E. 1995. Skin ultrastructure in relation to prolactin and MSH function in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* exposed to environmental acidification. Cell Tiss. Res. 279: 351-358.

Chaplen F. R. Rosalyn, H. U., Philip, N. M. and Wojtek, K. 2002. Fish chromatophores as cytosensors in a microscale device: detection of environmental toxins and bacterial pathogens pigment. Cell Res. 15: 19-26.

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A.B., Sur, T.K., Mandal, S.C., and Bhattacharya, S.K. 2002. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. J. Ethnopharm. 82: 229-237.

Chitmanat, C., Tongdonmuan. K., and Nunsong. W. 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27 (Suppl.1): 359-364.

Chyau, C., Ko, P. and Mau, J. 2006. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa L.* leaves. LWT-Food Science and Technology. 39: 1099-1108.

Corliss, J.O.1953. Comparative studies on Holotrichous ciliates in the Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena group. II Morphology, life cycles and systemic status of strains in pure culture. Parasitol. 43: 49 -87.

Corliss, J.O.1970. The comparative systemetics of species comprising the Hyminostome ciliate genus *Tetrahymena*. J. Protozool. 17: 198-209

Egusa, S. 1992. Appendix 1 Trematoda Disease : Infectious Disease of Fish. AA.Balkema publishers, Old post road, Brookfield, USA. : 594 – 599.

Elliott, A.M. 1973. Morphology of *Tetrahymena*. In "Biology of *Tetrahymena.*" (ed. By Elliott A.M.). Dowden Hutchinson and Ross, Inc., Pennsylvania. : p. 5-19

Elliott, D. G. 2000. Integumentary system. In "The laboratory fish." (ed. By Ostrander, G. K.) Academic press. San Diego, California : 678 p

Fan, Y.M., Xu, L.Z., Gao, J., Wang, Y., Tang, X.H., Zhao, X.N. and Zhang, Z.X. 2004. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa L.*. Fitoterapia 75: 253-260.

Harris J. and Bird D.J. 1998. Alpha-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) and melanin-concentrating hormone (MCH) stimulate phagocytosis by head kidney leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Fish & Shellfish Immuno.. 8 (8): 631-638.

Lawhavinit O. Chukanhom, K. and Hatai, K. 2002. Effect of Tetrahymena on the occurrence of achlyosis in the guppy. Mycoscience 43: 27–31.

Leibowitz, M., Pimenta, R., Ariav and Zilberg, D. 2005. Environmental and physiological conditions affecting Tetrahymena sp. infection in guppies, *Poecilia reticulate* Peters. J. Fish Dis. 28: 539–547.

Lim, L.C., Dhert, P. and Sorgeloos, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. Aqua. Res. 34: 923-935.

Lom, J. and Dykova, I. 1992. Protozoan parasites of fishes, developments. In aquaculture and fisheries science, vol. 26, Elsevier, Amsterdam. : 252-253.

Michel, C. and Alderman, J. 1991. Chemotheropy in aquaculture today. In "Chemotherapy in aquaculture : from theory to reality". Symposium. Paris 12-15 March. : 3-23.

Nagappa, A.N., Thakurdesai, P.A., Venkat, Rao N., and Singh, J. 2003. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa L. Linn* fruits . J. Ethnopharm 88: 45-50.

Noga, E, J. 2000. Fish disease diagnosis and treatment. First edition, Iowa State University press, Iowa, USA. : 87-105.

Ponpornpisit, A., Endo M. and Murata, H. 2000. Experimental infections of a ciliates *Tetrahymena pyriformis* on ornamental fishes. Fisheries Sci. 66: 1026-1031.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochem. 30(12): 3875-3883.

Schâperclaus, W., Kulow, H. and Schreckenbach, K. 1986. Disease caused by ciliates ; Protozoiases In “Fish Disease” Vol. II. Fifth edition. (ed. By Schâperclaus, W.) Fischkrankheiten, Akademie-Verlag, Berlin. :716 –723.

Sire, J. Y. Girondot, M. and Babiar, O. 2000. Marking Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae), using scale regeneration. J. Exp. Zoo. 286: 297-304.

Taylor, M.A. 1999. Parasites, resistance and control strategies. Fish Vet. J. 3: 43-45.

Woo, P.T.K. 1995. Trichodina and other ciliates ; protozoan and metazoan infections In “Fish Disease and Disorders” Vol. I. Wallingford: CAB International. : 237-244.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

บทสรุปและแนวทางการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลาสวยงาม

Conclusion and Application in Utilization of Indian Almond Leaves in Ornamental Fish Culture

อรัญญา พลพรพิสิฐ — Aranya Ponpornpisit
นันทริกา ชันซื่อ — Nantarika Chansue
ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ — Nittharatana Paphavasit
วีณา เคยพุดซา — Weena Koeypudsa
จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ — Jirasak Tangtrongpiros
มาโกโต เอนโด — Makoto Endo

ปลากัดหรือ Siamese fighting fish (*Betta splendens*) และปลาหางนกยูงหรือ Guppy (*Poecilia reticulata*) เป็นปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมมาตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน มีราคาไม่แพง สามารถเพาะพันธุ์ได้ง่าย มีความทนทาน ปรับตัวได้ดีกับทุกสภาพแวดล้อม จึงสามารถนำมาผลิตและจำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศอย่างสม่ำเสมอ ปลาสวยงามจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ปัญหาสำคัญในเรื่องคุณภาพของปลาสวยงามมักเกิดจากความเสียหายที่ผิวหนังทำให้ปลามีความสวยงามและมีราคาด้อยลง เช่น มีบาดแผล มีปรสิตภายนอก รวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ผิวหนัง ดังนั้นการเพิ่มความทนทานที่ผิวหนังรวมถึงการรักษาแผลที่ผิวหนังปลาจะช่วยลดโอกาสการติดเชื้อที่บาดแผลและช่วยพัฒนาคุณภาพปลาสวยงามส่งออกจากประเทศไทย การใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลากัดมีการใช้มานานสิบปี นับเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทยที่สำคัญ โดยเกษตรกรเชื่อว่าสารที่มีอยู่ในใบหูกวางช่วยทำให้ปลากัดมีผิวหนังหนาขึ้น ช่วยรักษาแผลที่ผิวหนังและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผสมพันธุ์ อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานวิจัยใดที่อ้างถึงประโยชน์และวิธีการใช้ใบหูกวางในลักษณะดังกล่าว ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำสกัดจากใบหูกวางในการรักษาโรคติดเชื้อปรสิตภายนอกและโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลาสวยงามจะเป็นหลักฐานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญที่จะสนับสนุนแนวคิดของเกษตรกรในการใช้ใบหูกวางรักษาโรคติดเชื้อในปลาสวยงาม ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองตามวัตถุประสงค์

หลักออกเป็น 3 ส่วนคือ การศึกษาคุณสมบัติด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพ ชนิดของสารออกฤทธิ์และความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง ส่วนที่สองเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูง และส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาแผลและโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่ผิวหนังปลากัดและปลาหางนกยูง ผลจากงานวิจัยสามส่วนจะได้นำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อวิเคราะห์แนวทางการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลาสวยงาม

ผลการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในใบหูกวางที่พบได้แก่กรดแทนนิค (tannic acid) รูติน (rutin) ไอโซเคอร์ซิตริน (isoquercitrin) ทองแดง (copper: Cu) และสังกะสี (Zinc : Zn) ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติและสารออกฤทธิ์ในใบหูกวางในทางเภสัชสมุนไพรพบว่าแทนนินและเสตอรอลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดหยาบของใบหูกวางที่สกัดด้วยเอทานอล ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา ปริมาณและชนิดของแทนนินที่ตรวจพบในพืชจะมากหรือน้อยขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ วิธีการสกัด อุณหภูมิที่ใช้ ชนิดของตัวทำละลาย ชนิดของพืช แหล่งที่ปลูก ภูมิอากาศ เกลือแร่ และธาตุอาหารในดินรวมถึงอายุของกิ่ง ก้านและใบของพืช ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการสกัดใบหูกวางแห้งด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องซึ่งใกล้เคียงกับวิธีการที่เกษตรกรเลี้ยงปลาสวยงามใช้จะให้ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำทั้งหมด 15.15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลทั้งหมด 11.53 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีที่ตรวจพบในใบหูกวางสีเหลืองได้แก่ กรดแทนนิค (tannic acid) 14.5±3.2 เปอร์เซ็นต์ รูติน (rutin) 20±1.6 มิลลิกรัม/100 กรัม ไอโซเคอร์ซิตริน (isoquercitrin) 12±1.6 มิลลิกรัม/100 กรัม ทองแดง (copper) 0.40±0.12 มิลลิกรัม/100 กรัม และสังกะสี (Zinc) 2.56±0.71 มิลลิกรัม/100 กรัม ในขณะที่ใบสีแดงพบองค์ประกอบต่าง ๆ ในสัดส่วนที่มากกว่า ได้แก่ กรดแทนนิค (tannic acid) 16.7±2.6 เปอร์เซ็นต์ รูติน (rutin) 42.5±5.8 มิลลิกรัม/100 กรัม ไอโซเคอร์ซิตริน (isoquercitrin) 25±2.99 มิลลิกรัม/100 กรัม ทองแดง (copper) 0.46±0.1 มิลลิกรัม/100 กรัม และสังกะสี (zinc) 2.37±0.34 มิลลิกรัม/100 กรัม สารสกัดใบหูกวางแห้งด้วยน้ำเป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะได้สารละลายใสสีน้ำตาลเหมือนสีชา กลิ่นชา รสฝาด มีฝ้าสีเงินบาง ๆ ปกคลุมผิวน้ำ เมื่อทำการกวนน้ำจะพบตะกอนแขวนลอยขนาดเล็ก ในวันที่เริ่มทำการสกัดใบหูกวางจะตรวจไม่พบแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 3 วัน จะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นรสเปรี้ยวและมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย 10^7 cfu/ml

น้ำสกัดใบหูกวางมีพิษในระดับต่ำต่อปลากัดและปลาหางนกยูง โดยพบความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง (LC 96 hr) เท่ากับ 6,760 พีพีเอ็ม และ 5,281 พีพีเอ็มตามลำดับ ส่วนระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด (MIC) ที่น้ำสกัดใบหูกวางสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดแอร์โรโมแนส (*Aeromonas* spp.) และสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) และโปรโตซัวชนิดเตตร้าไฮมีนา (*Tetrahymena* spp.) มีค่าสูงถึง 1,000 , 4,000 และ 2,000 พีพีเอ็ม ดังนั้นหากจะนำใบหูกวางมาใช้ประโยชน์โดยตรงเพื่อยังยั้งเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสามชนิด จะต้องใช้ใบหูกวางในปริมาณมากประมาณ 1-4 กิโลกรัม สำหรับปลาที่เลี้ยงในน้ำ 1,000 ลิตร

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลากัดและปลาหางนกยูงนั้น จากการศึกษาเบื้องต้นที่ทดสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อ *A.hydrophila* ในปลาทั้งสองชนิดพบว่า *A.Hydrophila* ก่อโรคไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับ *S.dysgalactiae* ซึ่งก่อโรครุนแรงกว่าและเห็นผลในการศึกษาชัดเจนกว่า ดังนั้นในการศึกษาส่วนนี้จึงเน้นการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดใบหูกวางต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *S.dysgalactiae* ในปลากัดและปลาหางนกยูงแทน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำสกัดใบหูกวางเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็มและ 10 พีพีเอ็ม มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค Streptococcosis ในปลากัดและปลาหางนกยูง 88 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและออกฤทธิ์คล้ายยาปฏิชีวนะคือแทนนิน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ยืนยันว่าสารออกฤทธิ์หลักในน้ำสกัดใบหูกวาง คือ แทนนินชนิด hydrolysable tannin

ผิวหนังปลาหางนกยูงบางกว่าผิวหนังปลากัด การเกิดแผลที่ผิวหนังปลาหางนกยูงจะเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าปลากัด โอกาสที่จะเกิดแผลลึกถึงชั้นเกล็ดพบได้มากกว่าปลากัด ดังนั้นแผลที่ผิวหนังปลาหางนกยูงจึงหายได้ยากกว่าในปลากัด การเปรียบเทียบการหายของแผลของปลาที่ใช้กรดแทนนิคกับปลาที่มีแผลแต่ไม่ใช้กรดแทนนิคแสดงให้เห็นว่าแผลของปลาหางนกยูงที่ไม่ได้รับการรักษาไม่หาย มีความรุนแรงมากขึ้น และมีอัตราการตายเกิดขึ้น การใช้ใบหูกวางแช่น้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลากัด และปลาหางนกยูงที่ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม ช่วยให้แผลที่เกิดจากกรดอะซิติก หายได้เร็วกว่าปลากัดที่ไม่ได้ใช้ใบหูกวางโดยปลากัดจะสร้างเยื่อบุผิวขึ้นทดแทนเยื่อบุผิวที่เสียหายภายในเวลา 3 วัน แต่ในปลาหางนกยูง เนื่องจากแผลที่เกิดขึ้นมักจะเกิดรุนแรงกว่าบางครั้งการใช้จึงไม่ค่อยได้ผล การใช้ใบหูกวางรักษาแผลทั้งในปลากัด และปลาหางนกยูงจะได้ผลในเฉพาะในกรณีบาดแผลมีขนาดเล็ก บาดแผลที่ไม่รุนแรง เนื่องจากคุณสมบัติในการสมานแผลขององค์ประกอบในใบหูกวางค่อนข้างมีฤทธิ์อ่อน

น้ำสกัดใบหูกวางไม่สามารถใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในปลากัดและปลาหางนกยูง แม้การใช้น้ำสกัดใบหูกวางที่ระดับความเข้มข้น 50-200 พีพีเอ็มช่วยทำให้ปลากัด และปลาหางนกยูงที่ติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในห้องปฏิบัติการมีอัตรารอดเพิ่มขึ้น แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อที่มีในตัวปลาหางนกยูงทั้งหมดได้ จึงมีโอกาสเกิดการติดเชื้อกลับซ้ำได้มาก ในปลากัดนั้นการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาในการเลี้ยงปกติจะมีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจากผิวหนังหนา มีเกล็ดแข็งแรง แผลที่ผิวหนังหายได้เร็วจึงลดโอกาสที่เชื้อเตตร้าไฮมีนาจะแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง

แนวทางการใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลาสวยงาม

ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันภูมิปัญญาของเกษตรกรที่ใช้ใบหูกวางในการเลี้ยงปลากัด โดยสารออกฤทธิ์ในน้ำสกัดใบหูกวางโดยเฉพาะแทนนินช่วยรักษาแผลที่ผิวหนังของปลาได้ การใช้ใบหูกวางเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะอ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ในกรณีที่แผลไม่รุนแรง ในกรณีบาดแผลที่ผิวหนังที่ไม่รุนแรงนั้น การหายของแผลทั้งในปลากัดและปลาหางนกยูงบางส่วนเกิดขึ้นได้เอง แต่กรณีที่บาดแผลรุนแรง การใช้ใบหูกวางสามารถช่วยเพิ่มอัตรารอดของปลาที่มีแผลที่ผิวหนังได้มากกว่าการไม่ใช้ได้เล็กน้อย แต่การใช้ยาปฏิชีวนะก็ยังให้ผลที่ดีกว่า อย่างไรก็ดี ในกรณีที่ไม่สามารถหาซื้อยาปฏิชีวนะได้หรือในกรณีที่มีบาดแผลไม่รุนแรง การใช้ใบหูกวางก็เป็นอีกทางเลือกที่ดี ที่สามารถนำมาใช้ได้ แม้ว่าจะไม่สามารถนำมาใช้แทนและให้ผลได้เท่าเทียมกัน แต่ก็ดีกว่าการไม่ใช้อะไรในการรักษาแผลซึ่งจะทำให้ปลาติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาได้ง่ายขึ้น และทำให้อัตรารอดของปลาลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาหางนกยูง การใช้ใบหูกวางที่มีความเข้มข้น 1,000-3,000 พีพีเอ็มร่วมกับการใช้เกลือแกงที่มีความเข้มข้น 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาแผลและลดการติดเชื้อเตตร้าไฮมีนาที่เกิดขึ้นในฟาร์มเลี้ยงปลาหางนกยูงช่วยเพิ่มอัตรารอดได้มากกว่าการใช้ใบหูกวางเพียงชนิดเดียวหรือการไม่ใช้

ความเป็นพิษของน้ำสกัดใบหูกวางต่อปลากัดและปลาหางนกยูง (LC_{50} 96 hr) เท่ากับ 6,760 พีพีเอ็ม และ 5,281 พีพีเอ็ม ตามลำดับ จากการศึกษาถึงแม้ว่าน้ำสกัดใบหูกวางมีพิษในระดับต่ำต่อปลาทั้งสองชนิด แต่ก็พบว่าปลาทั้งสองชนิดแสดงอาการผิดปกติโดยลอยขึ้นมาบนผิวน้ำบ่อยครั้งขึ้น ตรวจพบตะกอนเกาะตามลำตัวและซี่เหงือกซึ่งน่าจะเกิดจากการระคายเคืองและการสะสมของสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงบริเวณเหงือก ทำให้ขัดขวางกระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนได้ออกไซด์ในระบบการหายใจของปลา อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของน้ำสกัดใบหูกวางที่จะทำให้ปลาตายได้จะมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมากเนื่องจากปริมาณที่เกษตรกรใช้อยู่

ปัจจุบันนั้นเพียง 100 พีพีเอ็ม ถ้าจะให้ถึงระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษจะต้องใช้ใบหูกวางแห้งมากถึง 5-6 กิโลกรัมในน้ำ 1,000 ลิตร

การใช้ใบหูกวางแม้จะมีข้อดีแต่ก็มีข้อพึงระมัดระวัง เนื่องจากใบหูกวางที่แช่น้ำไว้เกิน 3 วัน จะเริ่มมีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำมากขึ้น เนื่องจากการเน่าสลายของใบเกิดเป็นอินทรีย์สารที่เป็นอาหารสำหรับการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรีย การเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียจะเป็นอันตรายโดยตรงต่อปลาโดยเฉพาะในการเลี้ยงปลาที่มีความหนาแน่นสูงหรือปลาที่มีแผลที่ผิวหนังอยู่แล้วและยังไม่หายสนิท ดังนั้นในการนำใบหูกวางมาใช้ประโยชน์ในการรักษาแผลจึงควรใช้น้ำแช่ใบหูกวางที่เตรียมใหม่ ๆ ไม่เกิน 3 วัน หรือเปลี่ยนน้ำทุก ๆ วัน หรือใช้ใบหูกวางแช่ลงในบ่อเลี้ยงปลาโดยตรง และแยกใบออกทุก ๆ 3 วัน แล้วทำการเปลี่ยนน้ำแล้วใช้ใบใหม่ใส่ลงในบ่อปลา รักษาแผลจนกว่าจะหายสนิท ที่อาจสังเกตได้จากพฤติกรรมของปลา เช่น การว่ายน้ำ การกินอาหาร เป็นต้น

การเลือกใบที่จะนำมาใช้ เนื่องจากใบหูกวางมีทั้งใบสดและใบแห้งสีเขียว สีเหลือง และสีแดง จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากรดแทนนิคพบได้มากในใบหูกวางแห้ง โดยพบในใบสีแดงมากกว่าใบสีเหลือง ดังนั้นในการเลือกใช้ใบจึงควรเลือกใช้ใบสีแดง แต่กรณีที่ไม่สามารถเลือกใบสีแดงได้ ก็สามารถใช้ใบสีเหลืองแทนได้แต่อาจต้องใช้ในปริมาณที่มากขึ้น โดยใช้ใบแห้งไม่ใช่ใบสด เนื่องจากใบสดจะให้ปริมาณกรดแทนนิคที่น้อย และทำให้น้ำสกัดเน่าเสียรวดเร็ว เนื่องจากมีน้ำเป็นองค์ประกอบในใบมากกว่าใบหูกวางแห้ง

การใช้ใบหูกวางแห้งมาแช่น้ำจะมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของแบคทีเรียทำให้ปลามีความเสี่ยงต่อการติดโรคและอ่อนแอลง ดังนั้นควรมีการศึกษาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ในใบหูกวางมาเป็นสารเหนียวจะช่วยลดปัญหาการเพิ่มขึ้นหรือการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังทำให้สารออกฤทธิ์มีความเข้มข้นมากกว่าวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย