รายงานการวิจัย

เรื่อง

ประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยชนิด *Haliotis asinina* LINNAEUS 1758

The efficiency of the antimicrobial drugs against tropical abalone (*Haliotis asinina* LINNAEUS 1758) pathogenic bacteria (*Vibrio* spp.)

สัญญาเลขที่ GRB_๐๕๑_๕๒_๖๕_๐๒

รหัสโครงการ ๖๕๔๒๖๕๐๐๑๐๐๐๔_๑๒๓๐๐๑๐๕๐๐_๑๓๖๕๑๑๐๐๐๔

โดย

นางสาวทิพวรรณ ตัณฑวณิช

ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยชนิด *Haliotis asinina* LINNAEUS 1758

The efficiency of the antimicrobial drugs against tropical abalone (*Haliotis asinina* LINNAEUS 1758) pathogenic bacteria (*Vibrio* spp.)

สัญญาเลขที่ GRB_๐๕๑_๕๒_๖๕_๐๒
รหัสโครงการ ๖๕๔๒๖๕๐๐๑๐๐๐๔_๑๒๓๐๐๑๐๕๐๐_๑๓๖๕๑๑๐๐๐๔

โดย

นางสาวทิพวรรณ ตัณฑวณิช
ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2552 ขอขอบคุณ รศ.ดร.เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีการเพาะและการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อไทย (RU-Abalone) ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและจัดเตรียมลูกพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ เจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำและศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ หน่วยอายุรศาสตร์สัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในระหว่างการดำเนินงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อไทย ที่มีขนาดความยาวเปลือก 2.27±0.02 เซนติเมตร และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 2.77±0.06 กรัม และแสดงวิการโรคบริเวณเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายในฉีกขาด กล้ามเนื้อเท้าเป็นแผลวงสีขาวและไม่เกาะพื้นผิว โดยทำการแยกเชื้อวิบริโอจากอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ/ตับอ่อน (Hepatopancreas), อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad), น้ำเลือด (Hemolymph), กล้ามเนื้อเท้า (Foot Muscle) และเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายใน มาเพาะเลี้ยงและทำการพิสูจน์เชื้อเพื่อแยกชนิด (Identification) โดยการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20E พบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *V. cholerae*, *V. fluvialis* และ*V. vulnificus*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่พบมาทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 13 ชนิด โดยวิธี Agar Disc Diffusion Method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Meuller Hilton Agar พบว่า chloramphenicol และ nalidixic acid สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิดได้ 100% รองลงมา ได้แก่ doxycycline hydrochloride, furazolidone, norfloxacin, oxolinic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, oxytetracycline, tetracycline และ sulfadimethoxine ตามลำดับ ส่วน erythromycin และ novobiocin นั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิดได้ จากนั้นเลือกยาต้านจุลชีพมาเพียง 5 ชนิด ได้แก่ oxytetracycline, sulfadimethoxine, enrofloxacin, tetracycline และ oxolinic acid เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อ *V. cholerae*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* โดยวิธี Broth Dilution Method พบว่า oxolinic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัด *V. cholerae* และ *V. fluvialis* สูงสุด (MIC ≥ 0.125, MBC ≥ 16 ppm และ MIC ≥ 0.125, MBC ≥ 16 ppm ตามลำดับ) ส่วน enrofloxacin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัด *V. vulnificus* สูงสุด (MIC ≥ 0.50, MBC ≥ 32 ppm) ส่วน sulfadimethoxine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิดได้ต่ำสุด

การศึกษาเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีสโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. เข้ากล้ามเนื้อเท้าหอยเป๋าฮื้อ พบว่า ค่า LD_{50} ของเชื้อ *V. cholerae* (1.04×10^7 CFU/ml.) มีค่าต่ำกว่า *V. fluvialis* (1.87×10^7 CFU/ml.) และ *V. vulnificus* (2.87×10^9 CFU/ml.) ซึ่งแสดงว่า *V. cholerae* มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุด จึงเลือก *V. cholerae* มาเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยเป๋าฮื้อ แล้วทำการศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดในการรักษาโรควิบริโอซีสในหอยเป๋าฮื้อ โดยยาแต่ละชนิดใช้ 3 ขนาด ให้ยาด้วยวิธีการแช่ต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมต่อการรักษาโรคในหอยเป๋าฮื้อของ oxytetracycline, sulfadimethoxine, enrofloxacin, tetracycline และ oxolinic acid มีค่าเป็น 50, 20, 5, 10 และ 1 ppm ตามลำดับ สำหรับอัตราการรอดชีวิตสูงสุดของหอยเป๋าฮื้อมีค่า 66.67±6.67%, 46.67±3.33%, 53.33±3.33%, 43.33±3.33% และ 43.33±3.33% ตามลำดับ

คำสำคัญ : ยาต้านจุลชีพ, เชื้อแบคทีเรีย, หอยเป๋าฮื้อ, โรควิบริโอซีส, เชื้อวิบริโอ

ABSTRACT

Study on the efficiency of different antimicrobial agents against tropical abalone (*Haliotis asinina*) pathogenic bacteria (*Vibrio* spp.). Bacteria were isolated from diseased abalone with shell length of 2.27±0.02 cm and body wet weight of 2.77±0.06 g. These abalones showed the signs of torn soft tissue between foot muscle and shell, white patch on foot muscle and reduced ability to hold onto the substrate. Bacteria were isolated from hepatopancreas, gonad, hemolymph, foot muscle and soft tissue between foot muscle and shell and brought to determine the causes of disease and medicinal therapeutic. Bacterial strains were identified by commercial biochemical test kit (API 20E) as follow *V fluvials, V. cholerae* and *V. vulnificus*.

Thirteen different antimicrobial agents were tested against these *Vibrio* spp. by agar disc diffusion method on Meuller Hilton Agar. All *Vibrio* spp. were 100% sensitive to chloramphenicol and nalidixic acid. There after doxycycline hydrochloride, furazolidone, norfloxacin, oxolinic acid, ciprofloxacın, enrofloxacin, oxytetracycline, tetracycline and sulfadimethoxine respectively. On contrast, erythromycin and novobiocin had lowest sensitivity against *Vibrio* spp. After that selected five different antimicrobial agents: oxytetracycline, sulfadimethoxine, enrofloxacin, tetracycline and oxolinic acid. This study was to determine antibacterial activity of five antimicrobial agents against all *Vibrio* spp. by using Broth Dilution Method. It found that oxolinic acid had highest inhibit to *V. cholerae* and *V. fluvialis* (MIC $\geq$ 0.125, MBC $\geq$ 16 ppm และ MIC $\geq$ 0.125, MBC $\geq$ 16 ppm respectively). Enrofloxacin had highest inhibit to *V. vulnificus* (MIC $\geq$ 0.50, MBC $\geq$ 32 ppm). On the other hand, sulfadimethoxine had lowest inhibit to all *Vibrio* spp.

The bacterial suspension at median lethal dose (LD_{50}) was injected to foot muscle of abalone. The LD_{50} results of *V. cholerae V. fluvialis* and *V. vulnificus* were 1.04×10^7, 1.87×10^7 and 2.87×10^9 CFU/ml respectively. It showed that *V. cholerae* had highest virulence. The Tropical ablone were induced to vibriosis by *V. cholerae*. Then studied on five antimicrobial agents used for treatment of *V. cholerae* infection in abalone were oxytetracycline, sulfadimethoxine, enrofloxacın, tetracycline and oxolinic acid. After 24 hour of bacterial challenge, all abalone bathed in three different doses of each antimicrobial agent and reared along seven day. The results showed the effective dose of oxytetracycline, sulfadimethoxine, enrofloxacin, tetracycline and oxolinic acid were 50, 20, 5, 10 and 1 ppm respectively. The survival rates were 66.67±6.67%, 46.67±3.33%, 53.33±3.33%, 43.33±3.33% and 43.33±3.33% respectively

Keywords: antimicrobial, bacteria, abalone, vibriosis, *Vibrio* spp.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	1
- ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
- ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
- การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	13
- แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	14
วิธีการดำเนินการวิจัย	14
ผลการทดลอง	24
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	41
ข้อเสนอแนะ	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	50
ก.	51
ข.	52
ค.	56
ง.	58
จ.	61
ฉ.	67
ช.	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กลไกการออกฤทธิ์และผลต่อเชื้อแบคทีเรียของยาต้านจุลชีพ	10
2	ยาต้านจุลชีพที่มักจะใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ	10
3	ผลการแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในหอยเป๋าฮื้อ โดยทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20 E test kit	26
4	ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 13 ชนิดกับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิด	27
5	ค่า MIC และ MBC ของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิด ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 3 ชนิด	32
6	ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา oxytetracycline	34
7	ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา sulfadimethoxine	35
8	ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา enrofloxacin	36
9	ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา tetracycline	37
10	ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา oxolinic acid	38
11	ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ต่างๆ ตลอดการทดลอง	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หอยเป๋าฮื้อที่พบในประเทศไทยทั้ง 3 ชนิด	3
2	อาการเนื้อตายในเฮปปาโตแพนเครียสเกิดจากการติดเชื้อวิบริโอ (Vibriosis)	7
3	หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ทดลอง	6
4	หอยเป๋าฮื้อเลี้ยงในกระบะพลาสติกก่อนทดลอง	6
5	อาการหอยเป๋าฮื้อที่ป่วย	16
6	การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทำการแยกชนิด	16
7	ลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้วิธี Agar Disk Diffusion Method	17
8	ชุดทดลองเพื่อหาค่า LD_{50} ภายใน 24 ชั่วโมงและการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส	18
9	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความขุ่นใสต่างกัน เมื่อผ่านการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)	19
10	โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (MBC)	19
11	กระบะและแก้วพลาสติกสำหรับเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ และระบบที่ใช้ทดลอง	21
12	ขั้นตอนการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Total bacterial count)	22
13	ผลการทดสอบคุณสมบัติของ *V. cholerae*	25
14	ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *V. fluvialis*	25
15	ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *V. vulnificus*	25
16	ลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 13 ชนิดของ *Vibrio* spp.	30
17	ลักษณะอาการของหอยเป๋าฮื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส	31
18	อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา oxytetracycline	35
19	อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา sulfadimethoxine	36
20	อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา enrofloxacin	37
21	อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา tetracycline	38
22	อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา oxolinic acid	39

บทนำ

วาริชกรรมการเพาะเลี้ยงได้ทวีความสำคัญต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์มากขึ้นตามลำดับ โดยประเทศไทยนั้นจัดได้ว่าเป็นประเทศที่มีอาชีพด้านการเกษตรเป็นหลัก นโยบายการพัฒนาด้านการเกษตรได้แบ่งแนวทางการพัฒนาออกเป็นสองแนวทาง ได้แก่ แนวทางการพัฒนาสำหรับเกษตรพอเพียงและแนวทางการพัฒนาสำหรับเกษตรเพื่อการแข่งขันในเชิงพาณิชย์ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีความสมดุลกัน ในปัจจุบันสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและกรมประมงได้ร่วมกันเผยแพร่ความรู้และเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อไทยเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะการทำฟาร์มเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อไทยบนบกในระบบน้ำหมุนเวียนแบบกึ่งปิด ระบบดังกล่าวเป็นระบบที่มีความคุ้มทุนในเชิงพาณิชย์ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันนี้ระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิตหอยเป๋าฮื้อไทยชนิด *Haliotis asinina* เชิงพาณิชย์ในประเทศไทยนั้นมีประสิทธิภาพดี แต่เมื่อเลี้ยงไปได้ระยะหนึ่งในระบบการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ซึ่งมีอัตราการเลี้ยงค่อนข้างหนาแน่น จึงอาจเป็นสาเหตุให้เกิดปัญหาด้านโรคสัตว์น้ำตามมา และสร้างความสูญเสียให้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการเป็นอย่างมาก ดังนั้น ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะศึกษาค้นคว้าการใช้ยาหรือสารสกัดจากธรรมชาติเข้ามาช่วยในการรักษาโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยเพื่อให้มีปริมาณผลผลิตและอัตราการรอดเพิ่มมากขึ้น และเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรอินทรีย์ เพื่อให้เกิดการบริหารจัดการและใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้อย่างยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

แต่ในปัจจุบันนี้ ความรู้และข้อมูลในการใช้ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. หรือที่เรียกว่าโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยเป๋าฮื้อไทยนั้นยังมีไม่มากนัก ซึ่งถ้าหากเกษตรกรนำยาต้านจุลชีพไปใช้อย่างไม่ถูกต้องและเหมาะสมทั้งในชนิด ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ ก็อาจจะก่อให้เกิดผลเสียตามมาอย่างมหาศาล ด้วยเหตุนี้จึงควรทำการศึกษาหาชนิดและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในหอยเป๋าฮื้อได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพให้เหมาะสม และในอนาคตก็อาจจะนำความรู้และข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยเป๋าฮื้อไทยแทนการใช้ยาต้านจุลชีพได้ เพื่อช่วยให้หอยเป๋าฮื้อมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี ทนต่อโรคและมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น และเป็นการเพิ่มรายได้และมูลค่าให้สามารถพัฒนาไปสู่ตลาดแข่งขันได้ อีกทั้งยังช่วยลดผลกระทบต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมด้วย

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ได้ผลในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและหาซื้อได้ง่าย มาใช้ในการรักษาโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยเป๋าฮื้อไทย

- เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ โดยสามารถทราบชนิดและขนาด ตลอดจนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยเป๋าฮื้อไทยได้
- เพื่อศึกษาอัตราการรอดของหอยเป๋าฮื้อไทยที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้จะครอบคลุมถึงอาการของการเกิดโรควิบริโอซีสในหอยเป๋าฮื้อไทย และวิธีการรักษาโดยการใช้ยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ได้ผลในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและหาซื้อได้ง่ายในพื้นที่ โดยจะทำการศึกษาให้ทราบถึงขนาดและปริมาณของยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยได้ และเพื่อเป็นการทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพที่มีผลกระทบและอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่งด้วย

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ได้ผลในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและหาซื้อได้ง่ายในพื้นที่ เพื่อเป็นการศึกษาป้องกันและรักษาโรควิบริโอซีสในหอยเป๋าฮื้อไทย โดยจะทำการศึกษาให้ทราบถึงขนาดและปริมาณของยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสามารถนำความรู้และข้อมูลจากการใช้ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อวิบริโอในหอยเป๋าฮื้อไทยนั้น มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อที่จะศึกษาวิจัยต่อยอดต่อไป โดยการนำสารสกัดจากสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ในการรักษาและป้องกันโรควิบริโอซีสในหอยเป๋าฮื้อไทยแทนยาต้านจุลชีพได้ เพื่อจะได้เปรียบเทียบหากระบวนการรักษาและชนิดของสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์คล้ายยาต้านจุลชีพชนิดนั้นๆ มาทดแทนยาต้านจุลชีพที่เป็นอันตรายต่อคนและสภาพแวดล้อมได้ และเพื่อเป็นการส่งเสริมการทำเกษตรแบบอินทรีย์ และเป็นการบริหารจัดการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้อย่างยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย โดยจะนำความรู้และเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นเพิ่มอัตราการรอดและเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มในการผลิตหอยเป๋าฮื้อไทยให้ไปสู่การแข่งขันระดับโลกและพึ่งพาตนเองได้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้นำไปใช้ได้ทั้งในแง่ของวิชาการและในการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อไทยในรูปแบบของ small scale และ commercial scale ซึ่งจะสามารถลดอัตราการตายและเพิ่มผลผลิตจากอัตราการรอดของหอยเป๋าฮื้อไทยได้ โดยปกติแล้วหากไม่มีการติดโรคอัตราการรอดตายของหอยเป๋าฮื้อไทยก็มีค่าต่ำแต่ถ้าหากมีการเกิดโรคหอยด้วยก็จะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตต่ำยิ่งกว่านี้ ซึ่งจะก่อให้เกิดความสูญเสียต่อรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงหอยเป๋าฮื้อไทยเป็นอย่างยิ่ง

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

<u>ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับหอยเป๋าฮื้อไทย</u>

หอยเป๋าฮื้อไทย หอยโข่งทะเลหรือหอยร้อยรู และมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า abalone จัดเป็นหอยทะเลฝาเดียว หอยเป๋าฮื้อที่พบในธรรมชาติทั่วโลกมีประมาณ 100 ชนิด โดยแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งต่างๆในโลกตั้งแต่เขตร้อนไปจนถึงเขตอบอุ่น (Temperate Zone) แต่ที่นิยมเลี้ยงมีไม่เกิน 20 ชนิด มีขนาดค่อนข้างใหญ่และใช้เวลาเลี้ยง 4-5 ปี ในน่านน้ำไทยมีรายงานว่าพบหอยเป๋าฮื้อ 3 ชนิด คือ *Haliotis asinina* Linnaeus, 1758; *H. ovina* Gmelin, 1791 และ *H. varia* Linnaeus, 1758 (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของ อนุวัฒน์ นทีวัฒนาและยอห์น ฮิลลิแบร์ก (2529) ที่ได้สำรวจชนิดที่บริเวณเกาะภูเก็ตและเกาะใกล้เคียง พบหอยเป๋าฮื้อ 3 ชนิดนี้เช่นกัน หอยเป๋าฮื้อชนิด *H. asinina* มีขนาดใหญ่ที่สุดในจำนวน 3 ชนิดและมีสัดส่วนของเนื้อที่ใช้เป็นอาหารมากกว่าชนอื่น (ธานินทร์ สิงหะไกรวรรณ และมาซาโนริ โดอิ, 2536) และเป็นหอยที่เริ่มมีการวิจัยและพัฒนากันในด้านการวิจัยพื้นฐานทั้งทางชีววิทยา การเพาะและเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ โดยได้รับการสนับสนุนจากกรมประมงตั้งแต่ปี พ.ศ.2533 เป็นต้นมา แต่ข้อมูลการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์ยังมีน้อยมาก

ภาพที่ 1 หอยเป๋าฮื้อที่พบในประเทศไทยทั้ง 3 ชนิด

ก. *H. asinina* Linnaeus, 1758 ข. *H. ovina* Gmelin, 1791 ค. *H. varia* Linnaeus, 1758

หอยเป๋าฮื้อไทยมีข้อเสียคือมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับหอยเป๋าฮื้อของอเมริกาเหนือ คือ *H. rufescens* ที่มีขนาดโตเต็มที่ถึง 28 เซนติเมตร หอยเป๋าฮื้อที่พบในประเทศไทยที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ *H. asinina* มีเปลือกยาวสูงสุด 12 เซนติเมตร และมีข้อมูลในเรื่องการเลี้ยง การกินอาหารและการเจริญเติบโตมากที่สุด อันดับรองลงมาคือ *H. ovina* (Jarayabhand, *et al.*, 1995) ซึ่งหอยชนิด *H. Ovina* และ *H. varia* จะมีขนาดเล็กกว่า โดยมีความยาวสูงสุดประมาณ 7 เซนติเมตร แต่ขนาดที่พบโดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 6 เซนติเมตร และมีเนื้ออยู่ภายในเปลือกน้อยกว่าชนิด *H. asinina* ที่เนื้อจะออกมาหุ้มเปลือกหอย โดยหอยทั้ง 3 ชนิดนี้จะอาศัยอยู่ตามแนวหินหรือปะการังที่ตายแล้วที่ระดับความลึกตั้งแต่ 1-7 เมตร ที่น้ำทะเลใสมีความเค็มคงที่ระหว่าง 32-34 ส่วนในพัน (ppt.) ทั้งนี้ *H. asinina* และ *H. ovina* สามารถพบได้ทั้งทางฝั่ง

ทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย แต่ไม่มีรายงานการพบ *H. varia* ที่ฝั่งอ่าวไทยแต่อย่างใด (Jarayabhand, *et al.*, 1995) จากการศึกษาตามเอกสารของวันทนา อยู่สุข (2528) พบว่าหอยเป๋าฮื้อจัดอยู่ใน

Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Subclass Prosobranchia

Order Archaeogastropoda

Family Haliotidae

Genus Haliotis

หอยเป๋าฮื้อมีลักษณะสัณฐานเปลือกแบน รูปยาวรี ยอดเตี้ย ลักษณะคล้ายจานริ มีสีเขียวเข้ม น้ำตาลหรือแดงคล้ำ ไม่มีฝาปิดเปลือก ตามขอบเปลือกมีรูหายใจช่องเล็กๆ เรียงเป็นแถวยาวตามขอบเปลือกด้านซ้ายไปจนถึงขอบปาก โดยจำนวนรูหายใจจะแตกต่างกันไปตามชนิด เมื่อมันเจริญเติบโตขึ้นรูหายใจนี้จะเกิดขึ้นใหม่โดยรูหายใจเดิมจะถูกปิดจากด้านใน หอยเป๋าฮื้อมีกล้ามเนื้อเท้าที่มีขนาดใหญ่และแข็งแรงใช้ในการเคลื่อนที่และยึดเกาะกับวัตถุ ปกติจะชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีออกซิเจนเพียงพอและมีความเค็มค่อนข้างคงที่ (Hahn, 1989) หอยเป๋าฮื้อมีเพศแยก (dioecious) เพศผู้จะมีอวัยวะสืบพันธุ์สีครีมหรือสีงาช้าง เพศเมียมีสีเขียวเข้ม หอยเพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อบริเวณที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัย ซึ่งจะไปกระตุ้นให้หอยเพศเมียปล่อยไข่ออกมา การผสมพันธุ์เป็นแบบภายนอกตัว และมักเกิดในเวลากลางคืน ส่วนใหญ่จะมีช่วงฤดูผสมพันธุ์ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม และปรากฏว่าสามารถเพาะพันธุ์ได้และวางไข่ได้ตลอดทั้งปี (Singhagraiwan, 1989; Poomthong, *et al.*, 1997)

หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์กินพืช (Herbivore) ออกหากินอาหารในเวลากลางคืน (nocturnal) หอยเป๋าฮื้อวัยอ่อนจะกินไดอะตอมเกาะติด (sessile diatom) จำพวก *Nitzchia* sp. และ *Navicula* sp. (ธานินทร สิงหะไกรวรรณ และมาซาโนริ โดอิ, 2536) เมื่อโตขึ้นจะกินสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่จำพวกสาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียวและสีน้ำตาล สาหร่ายที่นิยมนำมาเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ ได้แก่สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* sp.) สาหร่ายวุ้นหรือสาหร่ายหนาม (*Acanthophora* sp.) และ *Laurencia* sp. (สุพิศ ทองรอด และคณะ, 2545) และในช่วงที่ขาดแคลนอาหารธรรมชาติ ก็ยังสามารถใช้อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงแทนได้

หอยเป๋าฮื้อไทยเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ สามารถนำเปลือกมาใช้งานศิลปหัตถกรรมได้ เนื่องจากด้านในของเปลือกเป็นมุก โดยจัดได้ว่าหอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์น้ำที่มีมูลค่าสูงและมีรสชาติดี ผลผลิตของหอยเป๋าฮื้อที่เข้าสู่ตลาดโลกแต่เดิมนั้นมาจากการจับจากธรรมชาติ เมื่อความต้องการหอยเป๋าฮื้อในตลาดโลกเพิ่มมากขึ้นจนทำให้หอยเป๋าฮื้อจากธรรมชาติมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในเชิงพาณิชย์ขึ้น

โรคและเชื้อแบคทีเรียที่พบในหอยเป๋าฮื้อไทย

การเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อนี้ สิ่งที่ผู้เลี้ยงต้องคำนึงเสมอคือเรื่องความสะอาดทั้งของน้ำและบ่อเลี้ยง หากมีการเลี้ยงอย่างหนาแน่นเกินไป แต่ไม่มีการระบายน้ำที่ดีหรือไม่มีการทำความสะอาดอยู่เป็นประจำก็จะทำให้เกิดเชื้อแบคทีเรียในบ่อได้ ทำให้เปลือกหอยภายในกร่อนและเท้ากับกระเพาะบวมแดงและตายในที่สุด ซึ่งจะเป็นมากในช่วงอากาศร้อนมากๆ โดยเฉพาะในช่วงเดือนเมษายน ในระหว่างการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในบ่อคอนกรีตหรือถังไฟเบอร์พบว่ามีการตายเป็นระยะ บางครั้งถึงกับตายยกบ่อ หอยที่ตายจะมีลักษณะท้องบวม เท้าเปื่อยและเปลือกแตกผุ เมื่อนำหอยที่ตายไปตรวจสอบที่สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง พบว่า เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโรคในกลุ่ม *Vibrio* spp. มักเกิดในกรณีที่เลี้ยงหอยหนาแน่นเกินไปและถ่ายเทน้ำได้ไม่ดีพอหรือพื้นบ่อที่เลี้ยงสกปรก หากมีการจัดการบ่อที่ดีก็สามารถป้องกันโรคเหล่านี้ได้ ในกรณีที่พบว่าหอยมีอาการเบื้องต้น เช่น เคลื่อนที่ช้า ไม่หลบแสง ท้องบวมให้รีบแยกออกและใส่ยา Neomycin ร่วมกับ Streptomycin อย่างละ 5 ppm. แช่ไว้ครึ่งวันก็จะหาย กรณีเกิดในบ่อใหญ่หรือเป็นหลายตัวก็ให้ลดน้ำลงครึ่งบ่อและใช้ยาเหลืองหรือ Acriflavin 0.25 ppm. แช่ครึ่งวันและใช้ติดต่อกัน 3 วัน ก็สามารถป้องกันการตายยกบ่อได้ (กัมปนาท สุคนธนิตย์, 2544)

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีความพยายามในการจัดการสิ่งต่างๆให้ดีที่สุดแล้ว แต่เราก็ไม่สามารถทำให้สภาพแวดล้อมต่างๆเหมือนกับสภาพตามธรรมชาติจริงๆ ที่หอยอาศัยอยู่ จึงก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น ลูกหอยเจริญเติบโตช้า หอยตายเพราะความเครียด และเกิดโรคต่างๆซึ่งทำให้เกิดความเสียหายในการเพาะเลี้ยง โรคของหอยเป๋าฮื้อเกิดจากเชื้อโรคหลายชนิด เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว ตลอดจนปรสิตภายนอกจำพวกปลิงใสและหนอน อาการของโรคที่พบบ่อยๆในระบบการเลี้ยง ได้แก่ อาการท้องบวม อาการเท้าเปื่อย อาการเปลือกผุกร่อนและอาการตัวเกร็งตาย (สารานุกรมไทยฉบับเยาวชนฯ เล่ม 26, 2545: ออนไลน์)

จากผลงานวิจัยของ Moriarty (1997) นั้นพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถพบได้ทั้งในน้ำทะเลจากบ่อพักน้ำ น้ำที่ใช้เลี้ยงหอย วัสดุรองพื้นบ่อ อาหารที่ใช้เลี้ยงหอย และแม้กระทั่งจากตัวหอย (whole body) เชื้อแบคทีเรียที่พบนี้จะมีทั้งประโยชน์และโทษในการเลี้ยง โดยเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญโดยเฉพาะ *Vibrio* spp. จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่น่าสนใจ เพราะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เลี้ยงในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม (Roch, 1999) โดย Ripabelli และคณะ (1999) พบว่า *Vibrio* spp. จะก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) ส่วน Cheng และ Chen (2004) พบว่า *V. parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อ Taiwan abalone (*Haliotis diversicolour supertexta*) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Cai และคณะ (2006) พบว่า *V. alginolyticus* นั้นก่อให้เกิดโรคในหอยหลายชนิด เช่น Taiwan abalone (*H. diversicolour supertexta*), Carpet shell clam (*Ruditapes decussates*) (Gomez-Leon, *et al.*, 2005) และ Catarina Scallop (*Argopecten ventricosus*) (Sainz, *et al.*, 1998)

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง (2550) ได้ทำการศึกษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำที่มีอาการป่วย เช่น ปลานิล กบ ปลาสลิดและหอยเป๋าฮื้อไทย จำนวน 69 ราย พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคมากที่สุด ได้แก่ โรค Aeromonad Septicaemia ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila, A. sobria* รองลงมาคือ โรค Streptococcosis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Aerococus viidans* และอันดับสามคือ โรค vibriosis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยผลการทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพ 2 ชนิด คือ ออกซีเตตร้าไซคลินและซัลฟาไตรเมธโธพริม พบว่า เชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพ ทั้ง 2 ชนิดนี้

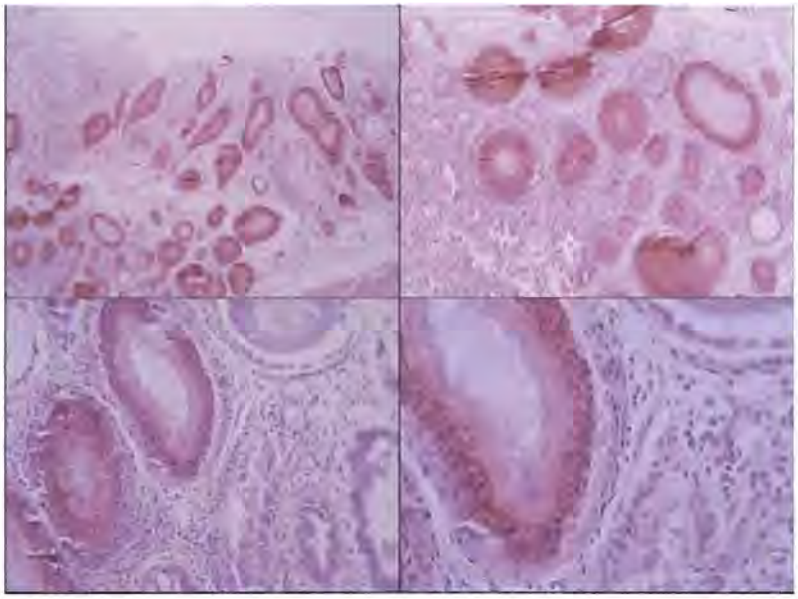
จากรายงานการทดลองของ นันทริกา ชันซื่อ (2543) พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่พบในหอยเป๋าฮื้อบ่อยที่สุด คือ เชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) และเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญและเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคท้องบวมน้ำในหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งมีหลายชนิด เช่น *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ซึ่งสอดคล้องกับเอนกโสภณ และคณะ (2550) พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่พบในหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วยที่เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนแบบกึ่งปิดมีหลายชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. anguillarum* I และ II, *Klebsilla pneumoniae, K. oxytoca, A. hydrophila, Pseudomonas paucimobilis* และ *Escherichia coli*

<u>โรคติดเชื้อวิบริโอ (Vibriosis)</u>

โรคติดเชื้อวิบริโอพบได้ทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้ง เกิดจากเชื้อวิบริโอ (Vibrio) เช่น *V. parahaemolyticus, V. harveyi, V.vulnificus* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่รูปร่างแท่ง ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (>10 ppt = >1%) จึงเรียกว่า "halophilic" เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ และเชื้อวิบริโอนี้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ง่ายมาก

ลักษณะอาการ พบเนื้อตายในเฮปปาโตแพนเครียสเกิดจากการติดเชื้อวิบริโอ เชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งปกติ จึงคาดว่าการติดเชื้อน่าจะผ่านทางทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ เชื้อนี้ก่อโรคได้ในกุ้งทุกระยะตั้งแต่ไข่จนถึงกุ้งโตเต็มวัย อาจพบโรคนี้ได้ในโรงเพาะฟัก เชื้ออาจเป็นสาเหตุโดยตรงของโรคหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งต้องอาศัยสิ่งโน้มนำอื่น เช่น การติดเชื้อไวรัส หรือความเครียด เชื้อวิบริโออาจทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โรคตามระบบ (systemic infection) หรือโรคบริเวณเปลือกกุ้ง ซึ่งอาจแสดงอาการต่างๆ กัน เช่น อัตราการตายสูง การกินอาหารลดลง สังเกตได้จากกุ้งไม่มีอุจจาระและลอกคราบช้าลง อาการและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่อาจใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น ได้แก่ ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) หรือเลือดเข็งตัวช้า แบคทีเรียในฮีโมลิมฟ์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ แผ่นคราบแบคทีเรีย (bacterial plaques) บนคิวติเคิล จุดดำโนดูลในเนื้อเยื่อ (melanized hemocytic nodules) มีแบคทีเรียตรงกลางโนดูล ไขมันในเฮปปาโตแพนเครียสต่ำ และ/หรือ melanized tubules การเรืองแสง

ของตัวกุ้ง (luminescence) การพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีเขียวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS)



ภาพที่ 2 อาการเนื้อตายในเฮปปาโตแพนเครียสเกิดจากการติดเชื้อวิบริโอ (Vibriosis)

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาทำให้แยกการติดเชื้อวิบริโอได้เป็น 3 แบบ ได้แก่

1) โรคติดเชื้อวิบริโอภายนอก พบกลุ่มแบคทีเรียที่คิวติเคิลจำนวนมาก

2) โรคติดเชื้อวิบริโอในทางเดินอาหาร พบกลุ่มแบคทีเรียที่คิวติเคิลภายใน (internal cuticle) เช่น บริเวณปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร การลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุเฮปปาโตแพนเครียสและลำไส้ส่วนกลาง การอักเสบชนิด hemocytic inflammation (การอักเสบชนิดหนึ่งที่มีเซลล์ฮีโมไซต์แทรกตามเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบ) และ melanization (การอักเสบชนิดหนึ่ง มีสีดำเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์) ดังภาพที่ 2

3) โรคติดเชื้อวิบริโอตามระบบ (systemic infection) พบ septicemia hemocytic nodules กล้ามเนื้อฝ่อ (muscle atrophy) หรือ septic hepatopancreatic necrosis การติดเชื้อวิบริโอเป็นสาเหตุของโรคมากมาย เช่น hatchery vibriosis, sea gull syndrome, septic hepatopancreatic necrosis (SHPN), luminescent vibriosis, swollen hidgut syndrome, shell disease, appendage necrosis (rot), splinters (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, 2551)

<u>ยาต้านจุลชีพกับการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ</u>

โรคสัตว์น้ำ หมายถึง อาการเจ็บป่วยหรือก่อให้เกิดอาการผิดปกติของเนื้อเยื่อ อวัยวะ ทำให้รูปร่างอวัยวะมีสภาพผิดไปจากปกติ หรือก่อให้เกิดการขัดต่อการทำหน้าที่ตามปกติของอวัยวะต่างๆ อาการ

ดังกล่าวอาจเกิดขึ้นเพียงชั่วระยะเวลาหนึ่งหรือตลอดเวลาโรคสัตว์น้ำ สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (infectious disease) เป็นการเกิดโรคที่มีสาเหตุหลักจากเชื้อจุลชีพต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต เชื้อรา เป็นต้น ตัวอย่างโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ เช่น Actinetobacter disease, Bacterial kidney disease, Columnaris เป็นต้น

2. โรคที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ (non-infectious disease) เป็นการเกิดโรคที่ไม่ได้มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อจุลชีพ แต่มีสาเหตุจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำเสื่อมโทรม การจัดการที่ไม่ดี อาหารไม่ได้คุณภาพและการได้รับอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น การเกิดโรคในลักษณะนี้มักทำให้สัตว์น้ำมีความอ่อนแอและอาจเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในลักษณะที่ 1 ได้ ตัวอย่างโรคที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ เช่น Bubble disease, Blue disease การเกิดกระดูกคดงอในสัตว์น้ำ เป็นต้น

<u>ประเภทของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ</u>

คำจำกัดความของยาตามพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2522 ของประเทศไทย ให้ความหมายไว้ดังนี้

1) วัตถุที่รองรับไว้ในตำราที่รัฐมนตรีประกาศ

2) วัตถุที่มุ่งหมายสำหรับในการวิเคราะห์ บำบัด บรรเทา รักษาหรือป้องกันโรค หรือความเจ็บป่วยของมนุษย์หรือสัตว์

3) วัตถุที่เป็นเภสัช เคมีภัณฑ์หรือเภสัชภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป

4) วัตถุที่มุ่งหมายสำหรับให้เกิดผลแก่สุขภาพ โครงสร้างหรือการกระทำหน้าที่ใด ๆ ของร่างกายมนุษย์หรือสัตว์จากคำจำกัดความข้างต้น สามารถสรุปความหมายของยาได้ คือ สารเคมีทุกชนิด ยกเว้นอาหาร ซึ่งใช้ในการบำรุงป้องกันหรือรักษาสุขภาพของคนและสัตว์

ยาที่ใช้ในการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะองค์ประกอบของการผลิตยา ดังนี้

1) ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial drugs) หมายถึง สารประกอบเคมีที่ได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ ซึ่งมีผลต่อต้านหรือทำลายเชื้อจุลชีพอื่น ๆ ได้แก่ ยาซัลฟา penicillin G เป็นต้น

2) ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) หมายถึง สารประกอบเคมีที่ได้จากเชื้อจุลชีพบางชนิด เช่น bacteria, fungi หรือ actinomycete ซึ่งมีผลยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลชีพอื่นๆ เมื่อใช้ในขนาดความเข้มข้นต่ำ ได้แก่ penicillin G, tetracycline เป็นต้น นั่นคือ ยาปฏิชีวนะจัดเป็นยาต้านจุลชีพด้วย

3) ยาต้านจุลชีพกึ่งสังเคราะห์ (Semi-synthetic antimicrobial drugs) หมายถึง ยาต้านจุลชีพที่มีบางส่วนของโมเลกุลแยกได้จากเชื้อจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่ง และส่วนที่เหลือของโมเลกุลที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ampicillin เป็นต้น

การจัดจำแนกประเภทของยาต้านจุลชีพ

1) การจัดจำแนกตามฤทธิ์ต่อเชื้อจุลชีพ (Classification on antibacterial action) สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะการมีผลทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่

1.1) ยาที่มีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic antimicrobial drugs) ได้แก่ ยาซัลฟา tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, novobiocin, lincomycin เป็นต้น

1.2) ยาที่มีผลไปทำลายหรือฆ่าเชื้อเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal antimicrobial drugs) ได้แก่ ยากลุ่ม penicillins, ยากลุ่ม aminoglycosides, vancomycin, polymyxin B เป็นต้น

2) การจัดจำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ (Classification on antimicrobial spectrum) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

2.1) ออกฤทธิ์วงแคบ (narrow spectrum) เป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อเชื้อแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิด โดยจะออกฤทธิ์เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น penicillin G จะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ polymyxin B จะออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นต้น

2.2) ออกฤทธิ์ระดับปานกลาง (mediumspectrum) เป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ ยาซัลฟา และยากลุ่ม penicillins กึ่งสังเคราะห์ เป็นต้น

2.3) ออกฤทธิ์วงกว้าง (broad spectrum) เป็นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด คือ สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อ rickettsiae เชื้อไวรัสขนาดใหญ่ โปรโตซัว และพยาธิบางชนิด ได้แก่ chloramphenicol, oxytetracycline hydrochloride เป็นต้น

3) การจัดจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ (Classification on mechanism of action) สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

3.1) ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ได้แก่ ยากลุ่ม penicillins, vancomycin, bacitracin เป็นต้น

3.2) ออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ polymyxin B, colistin เป็นต้น

3.3) ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้าง nucleicacid ได้แก่ nitofuran, novobiocin ยากลุ่ม quinolones เป็นต้น

3.4) ขัดขวางหรือยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ ยากลุ่ม tetracyclines, chloramphenicol ยากลุ่ม aminoglycosides เป็นต้น

3.5) ออกฤทธิ์แบบแข่งขัน (competitive antagonism) หรือขัดขวางการสร้าง metabolite ที่จำเป็นต่อเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ ยาซัลฟา sulfonamide, trimethoprim เป็นต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กลไกการออกฤทธิ์และผลต่อเชื้อแบคทีเรียของยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial)	กลไกการออกฤทธิ์ (mechanism of action)	ผลต่อเชื้อแบคทีเรีย (effect on bacteria)
Penicillins	การสร้างผนังเซลล์	Bactericidal
Vancomycin	การสร้างผนังเซลล์	Bactericidal
Bacitracin	การสร้างผนังเซลล์	Bactericidal
Polymyxin B	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์	Bactericidal
Nocobiocin	การสร้าง nucleic acid	Bactericidal
Tetracyclins	การสร้างโปรตีน	Bacteriostatic
Chloramphenicol	การสร้างโปรตีน	Bacteriostatic
Aminoglycosides	การสร้างโปรตีน	Bacteriostatic

ที่มา ; ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2549

สำหรับการเลือกว่าจะใช้ยาชนิดใดมาทำการรักษาโรคสัตว์น้ำนั้น โดยทั่วไปแล้วก่อนเลือกชนิดยาที่จะนำมารักษานั้น จำเป็นจะต้องมีการแยกพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย (isolation and classification) และหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพก่อน เพื่อเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม แต่ขั้นตอนดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ซึ่งอาจทำให้เชื้อเกิดการแพร่กระจายและเกิดความเสียหายอย่างรุนแรงได้ ดังนั้นในบางครั้งจึงจำเป็นต้องทำการรักษาไปก่อน โดยเลือกยาที่เหมาะสมและเคยให้ผลดีต่อการติดเชื้อนั้นมาก่อน ดังนั้นจึงได้รวบรวมรายชื่อยาต้านจุลชีพที่มักใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำไว้ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ยาต้านจุลชีพที่มักจะใช้รักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย	ยาต้านจุลชีพที่ใช้
Actinetobacter disease	Oxytetracycline
Bacterial kidney disease	Chloramphenicol, Clindamycin, Kitamycin, Sulfisoxazole, Erythromycin, Penicillin G
Columnaris	Chloramphenicol, Chlortetracycline, Furanance, Oxolinic acid, Oxytetracycline, Tetracycline
Edwardsiellosis	Oxytetracycline
Enteric redmouth	Chloramphenicol, Tiamulin, Sulfonamides, Oxolinic acid, Oxytetracycline, Sulfamerazine
Enteric septicaemia	Oxytetracycline

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย	ยาต้านจุลชีพที่ใช้
Fin rot	Chloramphenicol, Oxytetracycline, Furanance, Kanamycin,
Flavobacteriosi	Iodophores
Furunculosis	Chloramphenicol, Furazolidone, Furanance, Oxolinic acid, Tetracycline, Oxytetracycline, Sulfamerazine Sulfonamide, Sulfisoxazole,
Gill disease	Furanace, Oxytetracycline
Haemorrhagic septicaemia	Chloramphenicol, Kanamycin, Furanance, Oxolinic acid, Streptomycin, Oxytetracycline, Sulfamerazine
Mycobacteriosis	Kanamycin, Penicillin, Streptomycin, Sulfisoxazol, Tetracycline,
Nocardiosis	Doxycycline
Pasteurellosis	Sulfonamide
Saltwater columnaris	Chloramphenicol
Streptococcicosis	Chlortetracycline, oxytetracycline
Vibriosis	Ampicillin, Erythromycin, Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline, Chloramphenicol, Oxolinic acid, Oxytetracyclin, Sulfamerazine Furanace, Kanamycin,

ที่มา ; ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2549 ดัดแปลงจาก Austin and Austin, 1987

ยาต้านจุลชีพสำหรับสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนในประเทศไทย

ปัจจุบันการขึ้นทะเบียนยาสัตว์น้ำอยู่ภายใต้การควบคุมของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งปัจจุบันได้มียาสัตว์น้ำที่ขึ้นทะเบียนถูกต้องอยู่ 13 ตัวยา (กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2550) ด้วยกัน และในแต่ละตัวยาจะมีข้อบ่งใช้กับสัตว์น้ำที่แตกต่างกันตามชนิดของยา ซึ่งยาต้านจุลชีพสำหรับใช้ในสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้แก่

1. เอนโรโฟลซาซิน (Enrofloxacin)
2. ซาราโฟลซาซิน (Sarafloxacin)
3 ออกโซลินิค แอซิด (Oxolinic acid)
4. ออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline)
5. เตตราซัยคลิน (Tetracycline)
6. ซัลฟาไดเมททอกซีน-ออร์เมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Ormethoprim)

7. ซัลฟาไดเมททอกซีน-ไตรเมทโธพริม (Sulfadimethoxin-Trimethoprim)
8. ซัลฟาไดเมททอกซีน (Sulfadimethoxin)
9. ซัลฟาโมโนเมททอกซีน (Sulfamonomethoxine)
10. ซัลฟาไดอาซีน (Sulfadiazine)
11. ไตรเมทโธพริม (Trimethoprim)
12. ออร์เมทโธพริม (Ormethoprim)
13. โทลทราซูริล (Toltrazuril)

<u>ขนาด (Dose) ยาต้านจุลชีพหรือยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคสัตว์น้ำ</u>

ยาต้านจุลชีพหรือยาปฏิชีวนะเป็นกลุ่มยาที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากหาซื้อง่ายและราคาถูกกว่ายาชนิดอื่น ได้แก่ ออกซีเททราไซคลิน (Oxytetracycline) คลอเททราไซคลินและเททราไซคลิน (Tetracycline) ยาชนิดอื่นที่ใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ ออกโซลินิคแอซิค (Oxolinic acid) นาลิดิกซิก แอซิค (Nalidixic acid) ซัลฟาเมทท็อกซิน/ออเมโทรพริม (Sulfamethoxazole/trimethoprim) โดยมีขนาดการใช้ ดังนี้

Oxytetracycline ความเข้มข้น 10-30 ppm แช่ตลอด หรือใช้ผสมอาหารปริมาณ 10-50 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และต้องมีระยะหยุดยาก่อนจับ 50 วัน (อเมริกา)

Tetracycline ใช้ผสมอาหารปริมาณ 55-110 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และต้องมีระยะหยุดยาก่อนจับ 10 วัน (อเมริกา)

Oxolinic acid ใช้ผสมอาหารปริมาณ 5-20 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และต้องมีระยะหยุดยาก่อนจับ 5 วัน (อเมริกา)

Enrofloxacin ใช้ผสมอาหารปริมาณ 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และต้องมีระยะหยุดยาก่อนจับ 21 วัน (ไทย)

Sulfadimethoxin/ormethoprim ใช้ผสมอาหารปริมาณ 50-100 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และต้องมีระยะหยุดยาก่อนจับ 21 วัน (ไทย)

Sulfadimethoxin/trimethoprim ใช้ผสมอาหารปริมาณ 50-100 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และต้องมีระยะหยุดยาก่อนจับ 21 วัน (ไทย)

Nalidixic acid ใช้ผสมอาหารปริมาณ 1-3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

ข้อควรระวัง ไม่ควรใช้ยาตั้งแต่ 2 ชนิดพร้อมกัน เช่น ใช้เกลือร่วมกับยากลุ่มเททราไซคลิน (Tetracycline) เพราะจะทำให้ยาเสื่อมฤทธิ์ลงได้ ควรใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลา 5, 7, 10, 14 หรือ 20 วัน แล้วแต่ชนิดยา และในกรณีเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการบริโภคควรหยุดยาก่อนการจับอย่างน้อย 21 วันเพื่อมิให้เกิดการตกค้างของยาในสัตว์น้ำ (สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, 2545; 2551)

ปัจจัยที่จะทำให้ผู้ประกอบการธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้รับผลผลิตและกำไรที่สูงสุดนั้นมีหลายประการ นอกจากจะต้องคำนึงถึงเทคนิคการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดต้นทุนให้ได้มากที่สุดแล้ว การป้องกันรักษาโรคในสัตว์น้ำก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ โดยทั่วไปเมื่อสัตว์น้ำเกิดโรค เกษตรกรหรือผู้ประกอบการมักนึกถึงการใช้ยาต้านจุลชีพเพื่อการรักษาโรคนั้นๆ หากเกษตรกรไม่มีความรู้ความชำนาญในการใช้ยาต้านจุลชีพก็จะเกิดผลลบมากกว่าผลบวก ซึ่งหลักเกณฑ์กว้างๆในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพนั้น คือ ต้องคำนึงถึงคุณภาพของผู้ผลิต องค์ประกอบของสินค้า (ยาต้านจุลชีพ) ที่จะเลือกใช้ คุณสมบัติและประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพที่จะนำมาใช้กับโรคที่เกิดขึ้น และสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงสำหรับการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาโรคสัตว์น้ำที่ใช้บริโภคนั้นคือ ยาต้านจุลชีพชนิดนั้นต้องดูดซึมเข้าตัวสัตว์น้ำและขับถ่ายออกจากตัวสัตว์น้ำได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพื่อป้องกันการตกค้างในเนื้อสัตว์ นอกจากนี้เกษตรกรจำเป็นต้องมีระยะเวลาหยุดยาหลังการใช้ (withdrawal period) ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดนั้นๆก่อนที่จะส่งขายในท้องตลาด เพื่อให้ส่วนที่ตกค้างของสารออกฤทธิ์ และสารที่เกิดจากการแตกตัวได้ถูกขับถ่ายออกให้หมด จะได้ไม่มีอันตรายหรือผลเสียต่อผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตาม การรักษาโรคสัตว์น้ำไม่ใช่วิธีการที่ดี เพราะการรักษานั้นทำได้ยาก และในขณะที่ทำการรักษาจำเป็นต้องคำนึงถึงการปรับปรุงสภาพแวดล้อม นั่นก็คือคุณภาพน้ำให้ดีด้วย ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดโรคในสัตว์น้ำจึงถือได้ว่าเป็นมาตรการการควบคุมโรคที่ดีที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นหรือเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเชิงลึกในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ได้ และสามารถนำความรู้ที่ได้ถ่ายทอดไปสู่เกษตรกรและผู้ที่สนใจต่อไป
- ทราบถึงประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ได้ผลในวงการเพาะเลี้ยงกุ้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในหอยเป๋าฮื้อไทย เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับสารสกัดจากธรรมชาติต่อไป
- ทราบชนิดของยาต้านจุลชีพ ตลอดจนทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาต้านจุลชีพที่หาซื้อได้ง่ายในการป้องกันการเกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยได้
- ทราบถึงอัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในหอยเป๋าฮื้อได้

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

- จัดทำบทความเผยแพร่ประชาสัมพันธ์สู่สาธารณะ
- จัดทำบทความวิชาการ (manuscript) ที่เตรียมตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ พร้อมทั้งรายงานฉบับสมบูรณ์

วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี และศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

การเตรียมหอยเป๋าฮื้อไทย

นำหอยเป๋าฮื้อไทยขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย 2.27±0.02 เซนติเมตร ความกว้างเปลือกเฉลี่ย 1.25±0.01 เซนติเมตรและมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 2.77±0.06 กรัม อายุประมาณ 6 เดือน (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นหอยเป๋าฮื้อที่เพาะได้จากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี มาเลี้ยงไว้ในกระบะพลาสติกขนาดความจุน้ำทะเล 20 ลิตร (ภาพที่ 4) น้ำทะเลมีความเค็ม 30 psu. เลี้ยงไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน เพื่อให้หอยเป๋าฮื้อไทยคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมและอาหารในห้องทดลอง ใช้หัวทรายให้อากาศตลอดการทดลอง ให้หอยเป๋าฮื้อกินอาหารกุ้งขาวสำเร็จรูปเบอร์ 3 (ภาคผนวก ก.) ปริมาณ 1% ของน้ำหนักตัว วันละ 1 มื้อเวลา 18.00 น. ก่อนการทดลองจะงดให้อาหาร 1 วัน

ภาพที่ 3 หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ทดลอง

ภาพที่ 4 หอยเป๋าฮื้อเลี้ยงในกระบะพลาสติกก่อนทดลอง

การเพาะแยกเชื้อและบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อไทยที่มีอาการป่วย เช่น อาการกล้ามเนื้อเท้าเป็นวงขาว กล้ามเนื้อเท้าขาดแหว่งและเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายในฉีกขาด (ภาพที่ 5 ก.-ค.) จากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จำนวน 40 ตัวอย่าง ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 4.51±0.54 กรัม และความยาว

เปลือกเฉลี่ย 3.11±0.11 เซนติเมตร มาทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. จากอวัยวะทั้ง 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตับ/ตับอ่อน (Hepatopancreas) อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) น้ำเลือด (Hemolymph) กล้ามเนื้อเท้า (Foot Muscle) และเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายใน นำเชื้อมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar (TCBS, OXOID) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จะนำไปเพาะเลี้ยงบน Tryptic Soy Agar (TSA, OXOID) ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% (จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, 2547) จากนั้นจึงนำไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ก่อนนำไปพิสูจน์เชื้อเพื่อแยกชนิด (Identification) โดยการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การย้อมติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย (Gram's stain and morphology) ความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆทั้ง 20 ชนิด โดยใช้ API 20E Test kit (Biomerieux, France) ได้แก่ β-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, sulfide production, urease, tryptophane deaminase, indole production, Voges-Proskauer reaction, gelatin liquefaction, glucose fermentation, mannitol fermentation, inositol fermentation, sorbitol fermentation, rhamnose fermentation, sucrose fermentation, melibiose fermentation, amygdalin fermentation และ arabinose fermentation (ภาพที่ 6 ก.-ง., ภาคผนวก ข.) เพื่อพิสูจน์และยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ต้องการ โดยเทียบผลกับตารางที่แนบมาพร้อมกับชุดทดสอบ

จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียแบบ 10 เท่า โดยใช้น้ำเกลือ (NaCl) 1.5% ทั้งหมด 5 ระดับความเข้มข้น แล้วดูดสารละลายเชื้อจากแต่ละหลอดมา 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+1.5% NaCl ด้วยวิธี Spread plate technique นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อทำการนับจำนวนเชื้อทั้งหมดเป็นหน่วย Colony forming unit/ml. (CFU/ml) พร้อมกับการวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหากราฟมาตรฐาน

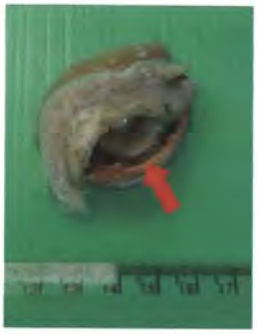
โดยสมการของกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 species มีค่าดังนี้

V. cholerae	:	$y = 0.579x - 3.139,$	$R^2 = 0.906$
V. fluvialis	:	$y = 0.507x - 2.948,$	$R^2 = 0.913$
V. vulnificus	:	$y = 0.579x - 3.315,$	$R^2 = 0.912$

โดยที่ค่า X หมายถึง ค่า log ของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย และค่า Y หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ซึ่งสามารถใช้สมการของกราฟมาตรฐานดังกล่าวมาในการคำนวณความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ในแต่ละการทดลองได้ (ภาคผนวก ค.) (วีณา เคยพุดซา และคณะ, 2549)

ก.

ข.

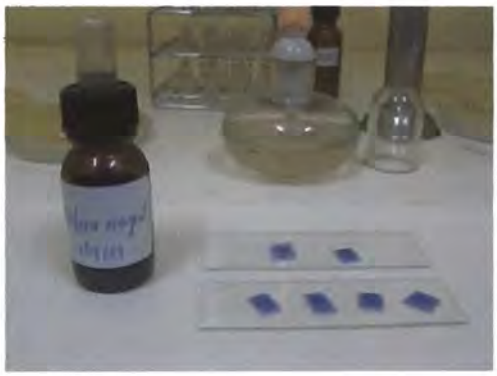


ค.

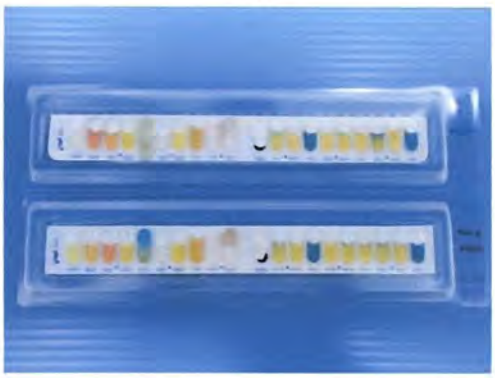
ภาพที่ 5 อาการหอยเป๋าฮื้อที่ป่วย ก.กล้ามเนื้อเท้าเป็นวงขาว ข.กล้ามเนื้อเท้าขาดแหว่ง
ค. เนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายในฉีกขาด

ก.

ข.



ค.



ง.

ภาพที่ 6 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อทำการแยกชนิด

ก. ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) ของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

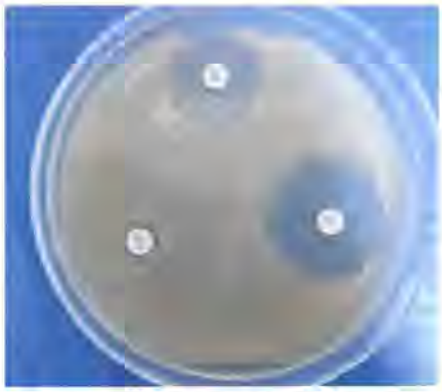
ข. ขั้นตอนการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อดูการติดสีของผนังเซลล์และลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย

ค. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่หยดสาร Oxidase reagent เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

ง. ชุดทดสอบ API 20E Test kit เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆทั้ง 20 ชนิด

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 13 ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp.

นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิด ที่แยกได้จากหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วย มาเจือจางในน้ำเกลือ (NaCl) 1.5% ให้ได้สารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้น 8.65×10^{10} CFU/ml. เกลี่ยเชื้อ (spread) ให้กระจายสม่ำเสมอบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hilton Medium (MHM) (Oxoid, England) จากนั้นทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้วิธี Agar Disk Diffusion Method (ภาพที่ 7) ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Dixon และคณะ (1991) โดยนำ antibiotic disk (Oxoid, England) มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 13 ชนิด ได้แก่ Erythromycin 15 µg, Chloramphenicol 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Enrofloxacin 5 µg, Norfloxacin 10 µg, Oxytetracycline 30 µg, Tetracycline 30 µg, Novobiocin 30 µg, Furazolidone 15 µg, Nalidixic acid 30 µg, Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25 µg, Doxycycline hydrochloride 30 µg และ Oxolinic acid 2 µg จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และอ่านผลความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยดูจากเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone หรือ inhibition zone เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ Difco Manual 10^{Th} Edition (1984) (ตารางที่ 1 ในภาคผนวก ง.)



ภาพที่ 7 ลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ
โดยใช้วิธี Agar Disk Diffusion Method

การเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) และหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (50%) ภายใน 24 ชั่วโมง (Median Lethal Dose at 24 hr : LD_{50} at hr)

แบ่งหอยเป๋าฮื้อจำนวน 630 ตัว เป็น 7 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว แต่ละซ้ำจะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในถังพลาสติกขนาดความจุน้ำทะเล 1.5 ลิตร น้ำมีความเค็ม 30 psu. ทุกถังจะให้อากาศโดยผ่านหัวทรายตลอดการทดลอง (ภาพที่ 8) งดให้อาหารหอย 1 วัน ก่อนการทดลอง หอยเป๋าฮื้อที่ตายจากการทดลองจะนำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันผล หอยเป๋าฮื้อที่รอดจากการทดลองจะไม่นำมาใช้อีก

หอยเป๋าฮื้อในกลุ่มควบคุมทุกตัวจะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม 26G ยาว 0.5 นิ้ว ฉีดน้ำเกลือ (NaCl) 1.5% ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ส่วนกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม จะฉีดสารละลาย *V. cholerae* ที่ความ

เข้มข้นทั้ง 5 ระดับ ได้แก่ 1.04×10^5, 1.04×10^7, 1.04×10^9, 1.04×10^{11} และ 1.04×10^{13} CFU/ml. โดยจะฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อทุกตัว ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร บันทึกจำนวนหอยเป๋าฮื้อที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า LD_{50} โดยวิธี probit analysis (วีณา เดยพุดซา และคณะ, 2549) ทำการทดลองแบบเดียวกันนี้จนสามารถทดสอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ได้ครบทั้ง 3 ชนิด โดยฉีดสารละลาย *V. fluvialis* ที่ความเข้มข้นทั้ง 5 ระดับ ได้แก่ 1.87×10^5, 1.87×10^7, 1.87×10^9, 1.87×10^{11} และ 1.87×10^{13} CFU/ml. และฉีดสารละลาย *V. vulnificus* ที่ความเข้มข้นทั้ง 5 ระดับ ได้แก่ 2.87×10^5, 2.87×10^7, 2.87×10^9, 2.87×10^{11} และ 2.87×10^{13} CFU/ml.

จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่มีความรุนแรงมากที่สุด มาเพียง 1 ชนิดที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส และทดลองรักษาด้วยยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ได้ผลในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด

ภาพที่ 8 ชุดทดลองเพื่อหาค่า LD_{50} ภายใน 24 ชั่วโมงและการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส

การทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วย

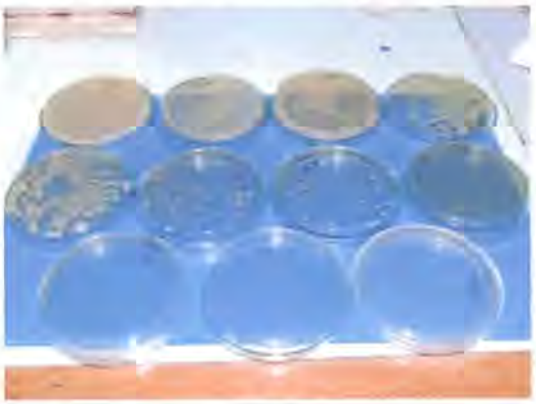
ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และหาความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) จะทำการทดสอบด้วยวิธี Broth Dilution Susceptibility Tests (NCCLS, 1991) โดยเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกชนิดได้ใน Mueller Hinton Broth (MHB) (Oxoid, England) ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% (จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, 2547) จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้เติมลงในหลอดที่มียาต้านจุลชีพที่ทำการเจือจางความเข้มข้นทั้ง 12 ระดับ ได้แก่ 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.50, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางยาต้านจุลชีพด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB

(Oxoid, England)) ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% ในลักษณะลดลงครั้งละ ½ เท่า (2-fold dilution) โดยเตรียมยาต้านจุลชีพความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และหยด *Vibrio* spp. ลงหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เชื้อเข้ากับยา ส่วนหลอดควบคุมจะใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (Oxoid, England) ที่มี 1.5% NaCl และไม่มียาต้านจุลชีพผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยดูความขุ่นใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 9) ถ้าพบว่าหลอดที่สารละลายขุ่น แสดงว่า *Vibrio* spp. นั้นยังสามารถเจริญได้ ส่วนหลอดที่สารละลายใส แสดงว่า *Vibrio* spp. นั้นถูกยับยั้งหรือไม่สามารถเจริญได้ และระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ คือ ค่า MIC

จากนั้นทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ด้วยวิธี Total plate count (ภาพที่ 10) ดัดแปลงตามวิธีของ Russell (1978) โดยนำหลอดทดลองที่ทำการตรวจสอบหาค่า MIC จากวิธีข้างต้น มาบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยเชื้อจากสารละลายในหลอดที่ใสทุกหลอด และหลอดสุดท้ายที่เริ่มขุ่นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA (Oxoid, England) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากพบว่าเชื้อยังเจริญได้ แสดงว่า ยาต้านจุลชีพที่ระดับความเข้มข้นนั้นไม่สามารถกำจัดหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อและระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญถือว่าเป็นค่า MBC

ภาพที่ 9 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความขุ่นใสต่างกัน เมื่อผ่านการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)



ภาพที่ 10 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

การศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดในการยับยั้งโรควิบริโอซิสในหอยเป๋าฮื้อ

ระบบที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย กระบะพลาสติกขนาด 30x45x15 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งภายในบรรจุแก้วพลาสติกขนาด 120 มิลลิลิตร จำนวน 30 ใบ โดยเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในแก้วพลาสติกใบละ 1 ตัว ใส่น้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตร/แก้ว น้ำทะเลมีความเค็มเฉลี่ย 30 psu ให้อากาศตลอดการทดลองโดยใช้สายยางพลาสติกใส่ลงในแก้วทุกใบ (ภาพที่ 11) และมีแผ่นพลาสติกปิดคลุมบนกระบะพลาสติกเพื่อเป็นการปิดบังแสงและกั้นไม่ให้หอยเป๋าฮื้อเดินออกไปนอกกระบะทดลอง งดให้อาหารหอย 1 วัน ก่อนการทดลอง ในการศึกษาใช้หอยเป๋าฮื้อจำนวน 630 ตัว แบ่งการทดลองเป็น 7 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว โดยกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่มนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกันทั้ง 5 ชนิด โดยจะคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่มีความรุนแรงมากที่สุดมาเพียง 1 ชนิดเพื่อจะเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส เมื่อทำการทดลองแล้วหอยเป๋าฮื้อที่ตายจะนำมาเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันผล หอยเป๋าฮื้อที่รอดจากการทดลองจะไม่นำมาใช้อีก

<u>กลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม</u> :

หอยเป๋าฮื้อทุกตัวในกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) จะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม 26G ยาว 0.5 นิ้ว ฉีดน้ำเกลือ (NaCl) 1.5% เข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และแช่ยาต้านจุลชีพจนครบ 7 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลและใส่ยาต้านจุลชีพใหม่ทุกวัน

หอยเป๋าฮื้อทุกตัวในกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) จะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม 26G ยาว 0.5 นิ้ว ฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ที่ LD_{50} ซึ่งเท่ากับ 3.71×10^{6} CFU/ml/ตัว โดยฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยตัวละ 0.1 มิลลิลิตร แต่ไม่ได้รับการรักษาโดยเลี้ยงในน้ำที่ไม่มียาต้านจุลชีพจนครบ 7 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลใหม่ทุกวัน

<u>กลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม</u> :

หอยเป๋าฮื้อทุกตัวในกลุ่มทดลอง (treatment) จะใช้ Tuberculin syringe ขนาดเข็ม 26G ยาว 0.5 นิ้ว ฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ที่ LD_{50} ซึ่งเท่ากับ 3.71×10^{6} CFU/ml/ตัว โดยฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อเท้าหอยตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ทำการเลี้ยงจนครบ 7 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทะเลและใส่ยาต้านจุลชีพใหม่ทุกวัน

ในการศึกษานี้จะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซิส โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ที่ LD_{50} เพื่อให้มีจำนวนหอยเป๋าฮื้อเหลือเพียงพอที่จะทำการศึกษาต่อเนื่องได้เป็นเวลา 7 วัน ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค 24 ชั่วโมงแล้ว จะทำการรักษาโดยการแช่ด้วยยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน โดยจะเปลี่ยนน้ำทะเลและเติมยาต้านจุลชีพใหม่ทุกวัน เพื่อรักษาความเข้มข้นของยาในระดับเดียวกัน โดยยาต้านจุลชีพที่เลือกมาทำการศึกษาทั้ง 5 ชนิดนั้นเป็นยาที่ใช้สำหรับสัตว์น้ำที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตำรับยาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ซึ่งในปัจจุบันมียาต้านจุลชีพขึ้นทะเบียนอยู่

เพียง 13 ชนิดและยังเป็นยาที่มักจะใช้รักษาโรควิบริโอซีสในสัตว์น้ำ โดยขนาดของยาที่ใช้ในการทดลองจะแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ ขนาดยาที่ได้จากการอ้างอิง ขนาดยาที่ต่ำกว่าและสูงกว่าขนาดยาอ้างอิง ซึ่งใช้ยาต้านจุลชีพดังต่อไปนี้

oxytetracycline

ในขนาด 20, 50 และ 80 ppm (Liao, *et al.*, 1992)

enrofloxacin

ในขนาด 5, 10 และ 15 ppm (Rodriguez, *et al.*, 2005)

sulfadimethoxine

ในขนาด 10, 20 และ 30 ppm (Lewbart sited by Carpenter, 2005)

tetracycline

ในขนาด 10, 30 และ 50 ppm (Vaseeharan, *et al.*, 2005)

oxolinic acid

ในขนาด 1, 4 และ 16 ppm (Naviner, *et al.*, 2007)

บันทึกจำนวนหอยเป๋าฮื้อที่รอดชีวิตในแต่ละวันจนสิ้นสุดการทดลอง เพื่อดูประสิทธิภาพของยา โดยนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการรอดชีวิต (Survival Rate: S.R.) ดังนี้ (วีณา เคยพุดซา และคณะ, 2549)

$$\%\ S.R. = \left[\frac{\text{จำนวนหอยเป๋าฮื้อที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนหอยเป๋าฮื้อที่รอดชีวิตภายหลังการฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง}} \right] x\ 100$$

ภาพที่ 11 กระบะและแก้วพลาสติกสำหรับเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ และระบบที่ใช้ทดลอง

<u>การยืนยันเชื้อแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส</u>

ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค 24 ชั่วโมง สังเกตอาการของหอยเป๋าฮื้อ นับจำนวนหอยเป๋าฮื้อที่รอดชีวิต และทำการแยกหอยเป๋าฮื้อที่ตายออกจากกระบะทดลอง ทำต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ในแต่ละวันเก็บหอยที่ตายทิ้ง สุ่มตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อที่ป่วยภายหลังการฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง และหอยเป๋าฮื้อที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา ไปทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เพื่อยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค คือ *Vibrio* spp. จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นำไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 20E test kit (Biomerieux, France) รวมทั้งทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การติดสีจากการย้อมสีแกรมและการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *V. cholerae*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus*

การหาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ก่อนและหลังการรักษาเป็นเวลา 7 วัน

สุ่มตัวอย่างของหอยเป๋าฮื้อที่ป่วย หอยตายและหอยปกติมาทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count) โดยวิธีการ aseptic technique นำตัวของหอยเป๋าฮื้อแยกออกจากเปลือก แล้วใช้กรรไกรตัดทั้งตัวให้ละเอียด จากนั้นตักหอยเป๋าฮื้อที่สับละเอียดและผสมจนเข้ากันดีมาชั่งให้ได้ 1 กรัม นำไปใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือ (NaCl) 1.5% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางลง 10 เท่า จนถึงหลอดที่ 5 ผสมให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดสารละลายในแต่ละหลอดมา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+1.5% NaCl จากนั้นทำการเพาะเชื้อด้วยวิธี spread plate technique (ภาพที่ 12) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการนับและคำนวณหาจำนวนเชื้อทั้งหมด มีหน่วยเป็น Colony forming unit/gram (CFU/gm)

ก. ข.

ภาพที่ 12 ขั้นตอนการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Total bacterial count)
ก. การเจือจางเชื้อแบบ 10 เท่า ข. การเพาะเชื้อด้วยวิธี spread plate technique

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ (Temperature) วิเคราะห์โดยใช้ Thermometer ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) โดยใช้ DO meter รุ่น YSI Model 55 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH meter ค่าความเค็ม (Salinity) โดยใช้ Hand Refractometer และตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) โดยวิธี Titration method ค่าแอมโมเนีย โดยวิธี Phenol hypochlorite method (Grasshoff, 1976) ค่าไนไตร์ท โดยวิธี NED Colorimetric method (Strickland & Parsons, 1972) ค่าไนเตรท โดยวิธี Cadmium reduction colorimetric method (Strickland & Parsons, 1972) และค่าฟอสเฟต โดยวิธี Ascorbic acid method (Grasshoff, 1976) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้ทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อทุกๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยจะนำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำภายในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อทางสถิติ โดยวิธีวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) ของแต่ละชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองที่แตกต่างกันโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS version 13.0 (อนันต์ชัย, 2542)

ผลการทดลอง

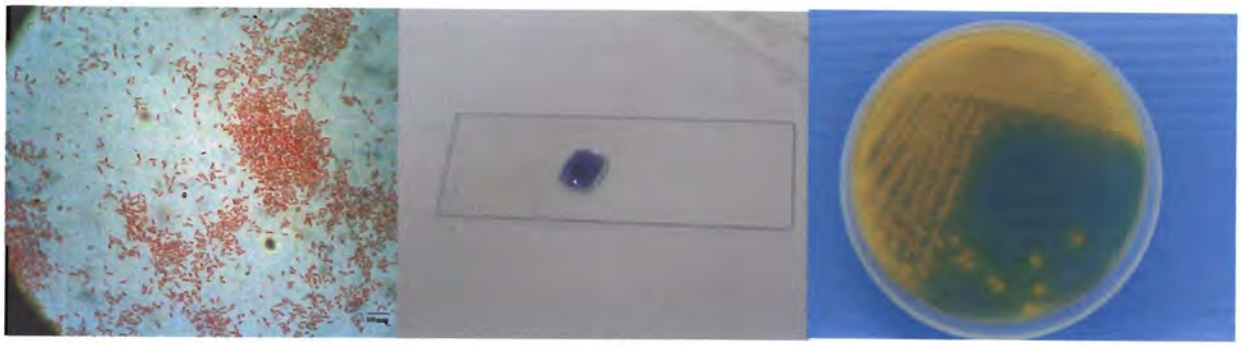
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในหอยเป๋าฮื้อไทย

ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. จากหอยเป๋าฮื้อไทยที่มีอาการป่วยจากสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากอวัยวะภายในต่างๆ ของหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วยทั้งที่มีอาการกล้ามเนื้อเท้าเป็นวงขาว กล้ามเนื้อเท้าขาดแหว่งและเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายในฉีกขาด โดยพบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ จัดอยู่ใน *Vibrio* spp. 3 ชนิด ได้แก่ *Vibrio cholerae* (3 สายพันธุ์) และ *V. fluvialis* (3 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโคโลนีสีเหลือง และ *V. vulnificus* (4 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีโคโลนีสีเขียว โดยรายละเอียดผลการทดสอบทางชีวเคมีในการแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถพบได้จากอวัยวะทั้ง 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตับ/ตับอ่อน (Hepatopancreas), อวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad), น้ำเลือด (Hemolymph), กล้ามเนื้อเท้า (Foot Muscle) และเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายในของหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วยทุกอาการ

เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่พบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การย้อมสีแกรมและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย (Gram's stain and morphology) การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) พบว่า เชื้อ *V. cholerae* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างท่อนสั้นโค้ง (curved rod หรือ comma shape) ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 13-ก.) สามารถเคลื่อนที่ได้และผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) ได้ (ภาพที่ 13-ข.) และเมื่อเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม มีสีเหลือง ขอบเรียบค่อนข้างแบน (ภาพที่ 13-ค.) เนื่องจากการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส

ส่วนเชื้อ *V. fluvialis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างเป็นท่อนสั้นโค้ง (curved rod หรือ comma shape) ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 14-ก.) สามารถเคลื่อนที่ได้และผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) ได้ (ภาพที่ 14-ข.) และเมื่อเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar พบว่า โคโลนีมีลักษณะโค้งนูน มีสีเหลือง ขอบเรียบ (ภาพที่ 14-ค.) เนื่องจากการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส

เชื้อ *V. vulnificus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curved rod) ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 15-ก.) สามารถเคลื่อนที่ได้และสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) ได้ (ภาพที่ 15-ข.) และเมื่อเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar พบว่า โคโลนีมีลักษณะโค้งนูน มีสีเขียว ผิวของโคโลนีแบนราบ (ภาพที่ 15-ค.) เนื่องจากไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้

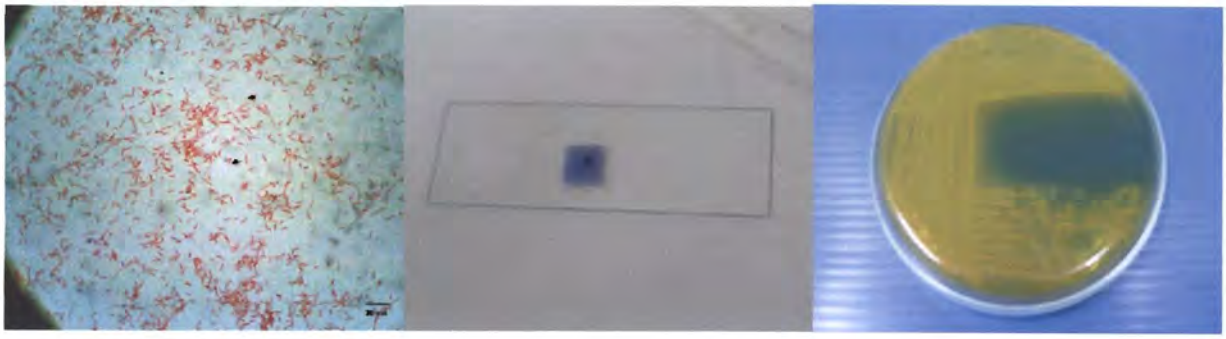


ก. ข. ค.

ภาพที่ 13 ผลการทดสอบคุณสมบัติของ *V. cholerae*

ก. รูปร่างและการติดสีย้อมแกรมของ *V. cholerae* ข. ผลทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส

ค. ลักษณะโคโลนีของ *V. cholerae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

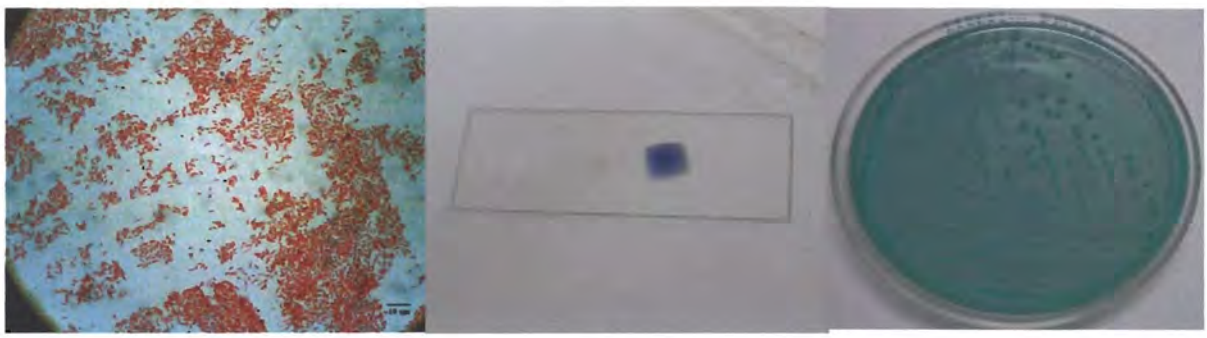


ก. ข. ค.

ภาพที่ 14 ผลการทดสอบคุณสมบัติของ *V. fluvialis*

ก. รูปร่างและการติดสีย้อมแกรมของ *V. fluvialis* ข. ผลทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส

ค. ลักษณะโคโลนีของ *V. fluvialis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS



ก. ข. ค.

ภาพที่ 15 ผลการทดสอบคุณสมบัติของ *V. vulnificus*

ก. รูปร่างและการติดสีย้อมแกรมของ *V. vulnificus* ข. ผลทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส

ค. ลักษณะโคโลนีของ *V. vulnificus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

ตารางที่ 3 ผลการแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในหอยเป๋าฮื้อ โดยทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20 E test kit

การทดสอบชีวเคมี	*V. cholerae*			*V. fluvialis*			*V. vulnificus*			
	VC. 1	VC. 2	VC. 3	VF. 1	VF. 2	VF. 3	VV.1	VV. 2	VV. 3	VV. 4
TCBS Agar	Y	Y	Y	Y	Y	Y	G	G	G	G
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH (Arginine Dihydolase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC (Lysine Decarboxylase)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
ODC (Ornithine Decarboxylase)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
CIT (Citrate utilization)	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
H_2S (Sulfide production)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE (Urea hydrolysis)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TDA (Trytophane Deaminase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND (Indole production)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP (Voges Proskauer)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GEL (Gelatin hydrolysis)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA (Arabinose Fermentation)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
GLU (Glucose Fermentation)	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
MAN (Mannitol Fermentation)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO (Inosital Fermentation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR (Sorbitol Fermentation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA (Rhamnose Fermentation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC (Sucrose Fermentation)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
MEL (Melibiose Fermentation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY (Amygdalin Fermenta-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
% Identification	99.3	92.1	99.9	99.4	94.7	99.2	98.9	99.7	98.7	98.6
Isolates	8	11	4	16	12	10	3	7	4	6

หมายเหตุ : Y = yellow colony, G = Green colony, + = Positive, - = Negative

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 13 ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. โดยวิธี Agar Disk Diffusion Method

ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี Agar Disk Diffusion Method ซึ่งผลการทดสอบด้วยยาต้านจุลชีพทั้ง 13 ชนิด พบว่า Chloramphenicol และ Nalidixic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae, V. fluvialis* และ *V. vulnificus* ได้ดีที่สุด (100%)

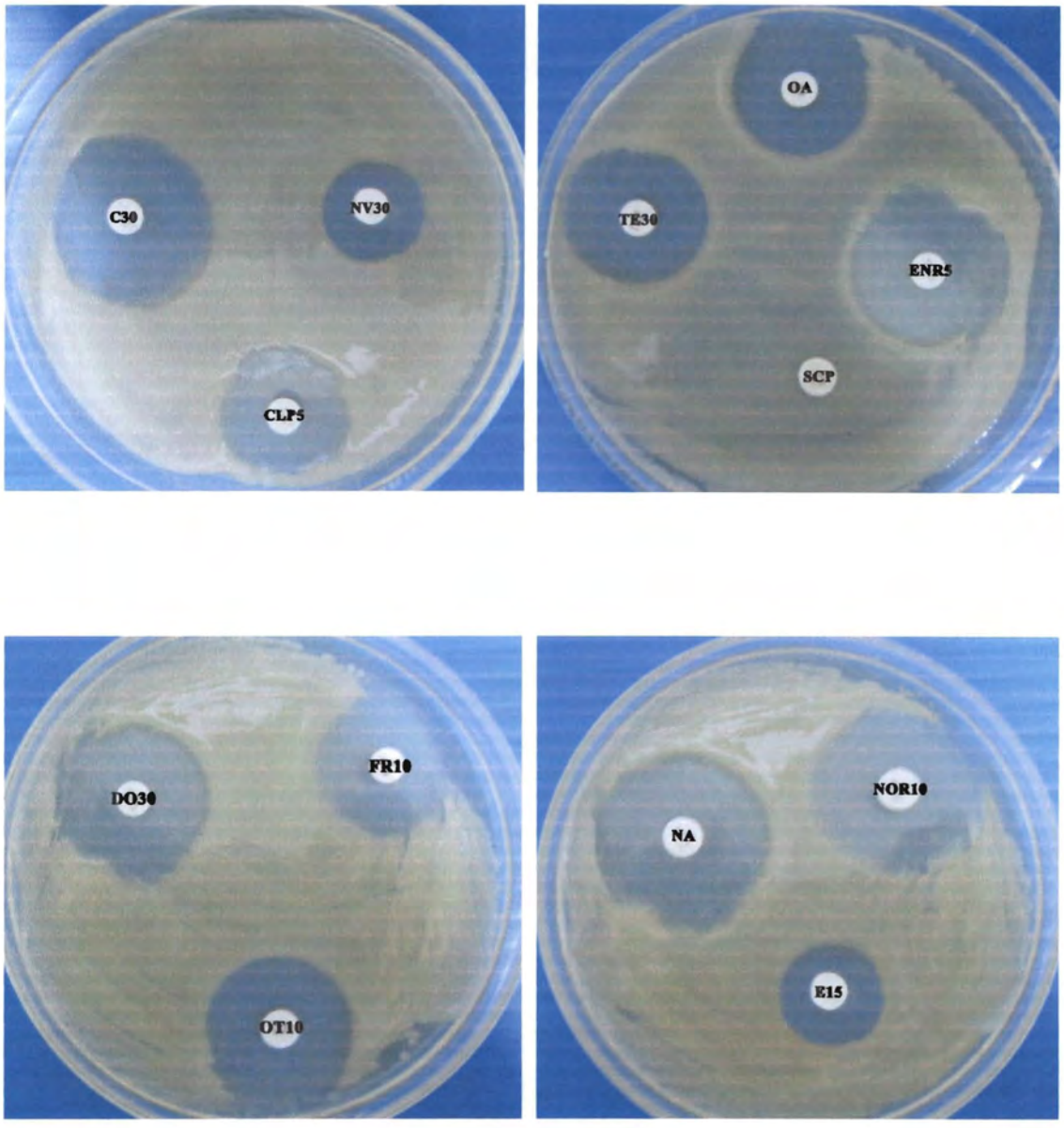
สำหรับยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 2 ชนิด คือ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* และ *V. fluvialis* ได้แก่ Doxycycline hydrochloride, Furazolidone, Norfloxacin และ Oxolinic acid สำหรับยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ได้เพียง 1 ชนิด คือ ยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* ได้แก่ Ciprofloxacin,Enrofloxacin,Oxytetracycline และ Tetracycline ส่วนยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. fluvialis* ได้แก่ Sulfamethoxazole /trimethoprim แต่ไม่มียาต้านจุลชีพชนิดใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *V. vulnificus* ได้เพียงชนิดเดียว

ส่วนยาต้านจุลชีพที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Erythromycin และ Novobiocin ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 16 ก.-ค.

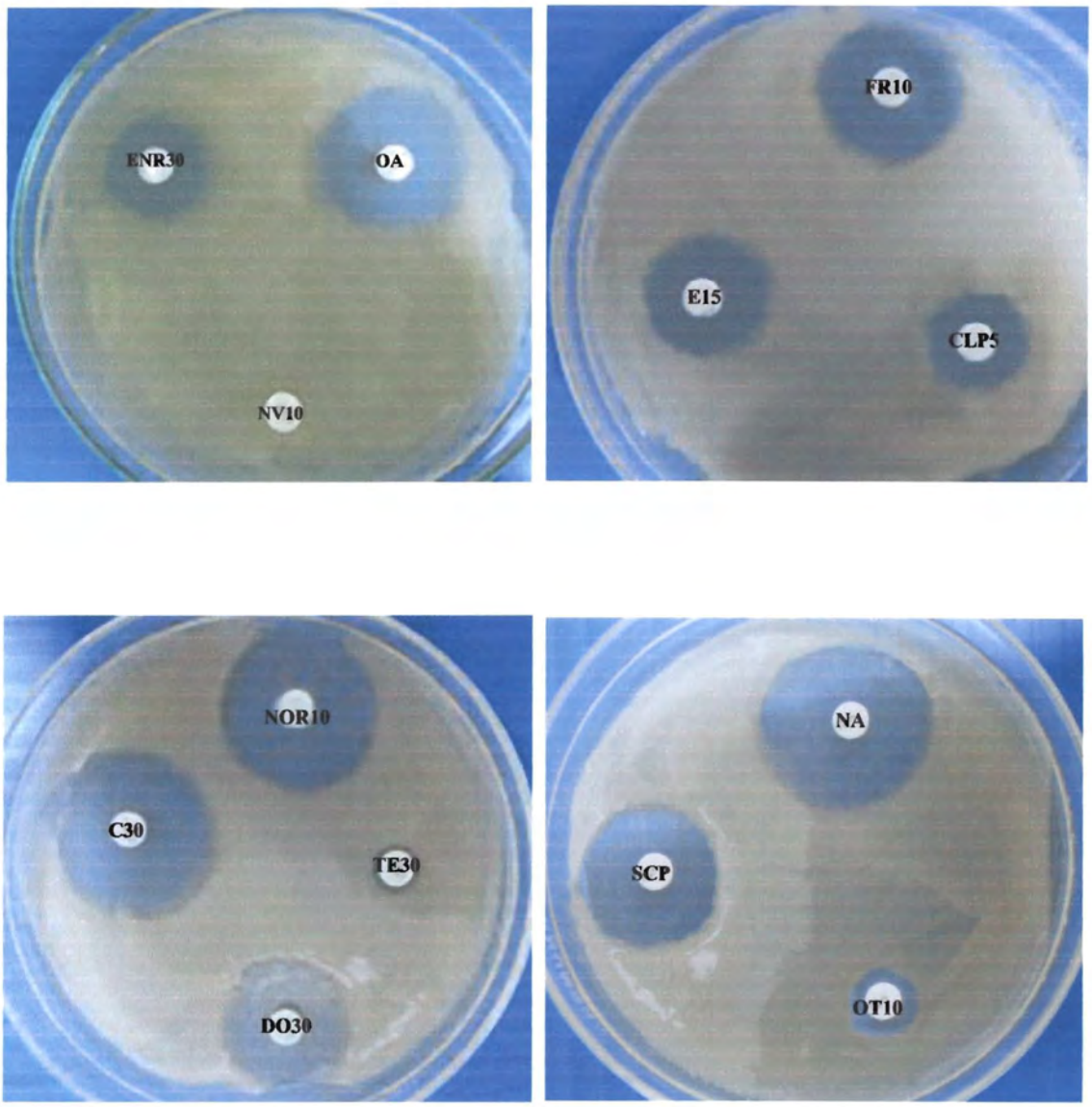
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 13 ชนิดกับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิด

ชื่อยาต้านจุลชีพ	ชื่อเชื้อวิบริโอที่พบ / ขนาด Clear zone หรือ Inhibition zone (มม.)		
	V. cholerae	*V. fluvialis*	*V. vulnificus*
1. Chloramphenicol	35 ± 0.87	34 ± 0.85	31 ± 0.75
2. Nalidixic acid	31 ± 0.75	36 ± 0.82	21 ± 0.48
3. Ciprofloxacin	23 ± 1.11	11 ± 1.89	0
4. Doxycycline hydrochloride	26 ± 1.11	31 ± 0.75	12 ± 0.41
5. Enrofloxacin	25 ± 0.48	17 ± 0.96	0
6. Erythromycin	18 ± 1.11	19 ± 0.48	16 ± 0.82
7. Furazolidone	22 ± 0.65	30 ± 0.41	8 ± 1.41
8. Norfloxacin	28 ± 0.85	34 ± 0.85	15 ± 1.04
9. Novobiocin	17 ± 1.38	0	0
10. Oxytetracycline	26 ± 0.75	6 ± 0.71	7 ± 0.75
11. Tetracycline	23 ± 1.25	0	9 ± 1.11
12. Sulfamethoxazole /trimethoprim	0	29 ± 0.48	0
13. Oxolinic acid	24 ± 1.31	33 ± 1.11	7 ± 048

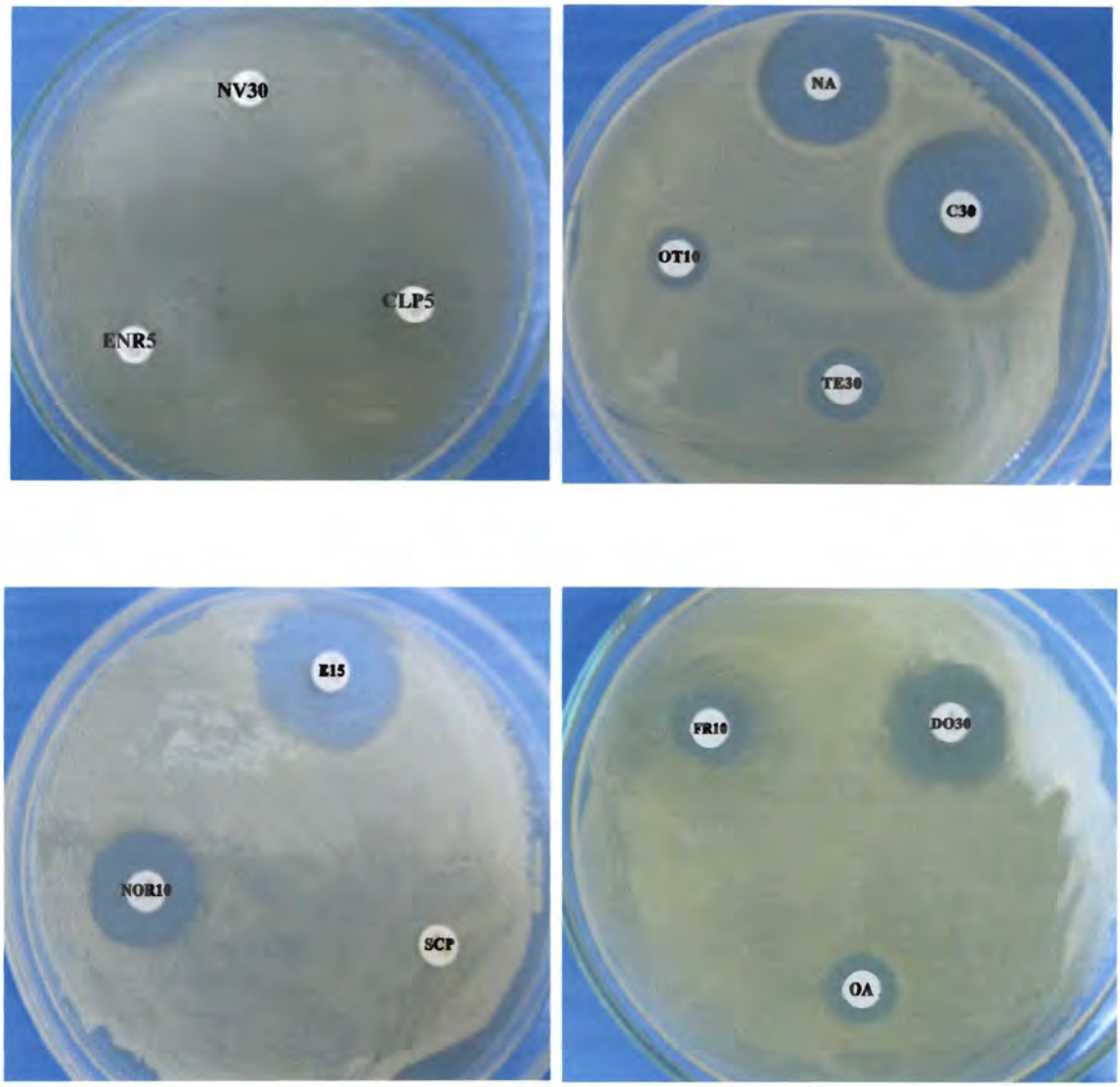
หมายเหตุ : อ่านผลความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ Difco Manual 10Th Edition (1984) ในตารางที่ 1 ภาคผนวก ง.



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 16 ลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 13 ชนิดของ *Vibrio* spp.

ก. *V. cholerae* ข. *V. fluvialis* ค. *V. vulnificus*

หมายเหตุ: 1. Chloramphenicol (C30) 2. Nalidixic acid (NA)

1. Ciprofloxacin (CLP5) 4. Doxycycline hydrochloride (DO30)

5. Enrofloxacin (ENR5) 6. Erythromycin (E15)

7. Furazolidone (FR10) 8. Norfloxacin (NOR10)

9. Novobiocin (NV30) 10. Oxytetracycline (OT10)

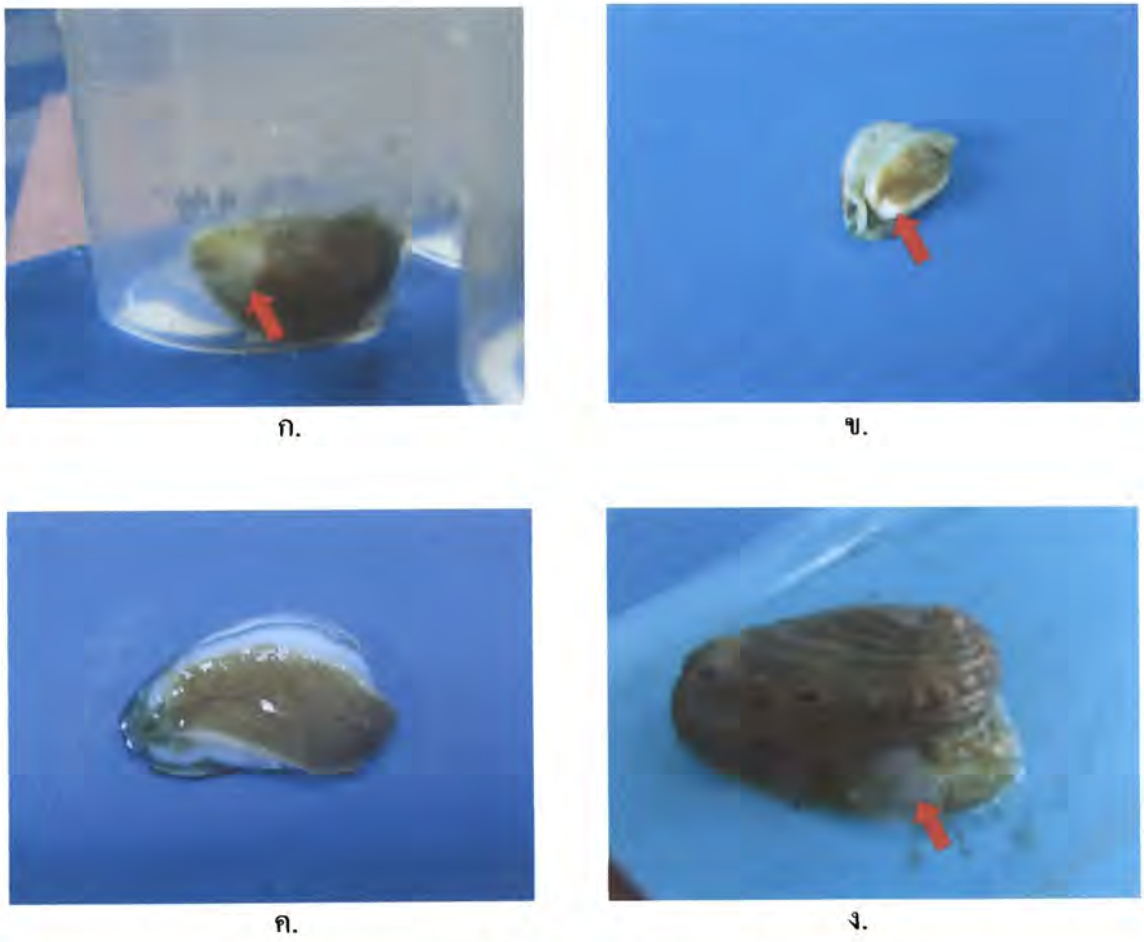
11. Tetracycline (TE30) 12. Sulfamethoxazole/Trimethoprim (SCP)

13. Oxolinic acid (OA)

การเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) และหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (50%) ภายใน 24 ชั่วโมง (Median Lethal Dose at 24 hr : LD_{50} at hr)

เมื่อฉีดสารละลาย *V. cholerae, V. fluvialis* และ *V. vulnificus* เข้ากล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อที่ 24 ชั่วโมง พบว่า หอยเป๋าฮื้อจะมีอาการป่วยและตายจากโรควิบริโอซีส โดยจะแสดงรอยโรคส่วนใหญ่ที่บริเวณกล้ามเนื้อเท้าและบริเวณโดยรอบ มีลักษณะเป็นวงสีขาว เป็นแผลเปื่อยและขาดแหว่ง ตัวแข็งเกร็งและไม่เคลื่อนที่หลบแสง (ภาพที่ 17 ก.-ง.) และหอยเป๋าฮื้อที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิดนี้จะแสดงอาการป่วยได้หลายอาการ

ผลการศึกษาขนาด (dose) ของยาต้านจุลชีพที่ทำให้หอยเป๋าฮื้อตายไปครึ่งหนึ่ง (50 %) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่า LD_{50} ของ *V. cholerae, V. fluvialis* และ *V. vulnificus* ต่อหอยเป๋าฮื้อนั้นเท่ากับ 1.04×10^7, 1.87×10^7 และ 2.87×10^9 CFU/ml. ตามลำดับ (ตารางที่ 1-3 ในภาคผนวก จ.)



ก. ข. ค. ง.

ภาพที่ 17 ลักษณะอาการของหอยเป๋าฮื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส

ก. กล้ามเนื้อเท้าและบริเวณโดยรอบเป็นวงสีขาว ข. กล้ามเนื้อเท้าขาดแหว่ง

ค. ตัวแข็งเกร็งหดตัว ง. กล้ามเนื้อเท้าเป็นแผลเปื่อย

การทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 3 ชนิด โดยการหาค่า MIC/MBC

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ 5 ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้ง 3 ชนิด พบว่า Oxolinic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. cholerae* สูงสุด รองลงมา คือ Oxytetracycline, Enrofloxacin, Tetracycline และ Sulfadimethoxine ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ ≥ 0.125, ≥ 0.50, ≥ 1, ≥ 1 และ ≥ 128 ppm ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ ≥ 16, ≥ 16, ≥ 16, ≥ 32 และ ≥ 256 ppm ตามลำดับ

ยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. fluvialis* คือ Oxolinic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงสุด รองลงมา คือ Tetracycline, Oxytetracycline, Sulfadimethoxine และ Enrofloxacin ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ ≥ 0.125, ≥ 0.125, ≥ 0.50, ≥ 0.125 และ ≥ 0.125 ppm ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ ≥ 8, ≥ 64, ≥ 64, ≥ 256 และ ≥ 256 ppm ตามลำดับ

ส่วนยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. vulnificus* คือ Enrofloxacin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงสุด รองลงมา คือ Tetracycline, Oxolinic acid, Oxytetracycline และ Sulfadimethoxine ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ ≥ 0.50, ≥ 16, ≥ 1, ≥ 32 และ ≥ 128 ppm ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ ≥ 32, ≥ 32, ≥ 128, ≥ 256 และ ≥ 256 ppm ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า MIC และ MBC ของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิด ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 3 ชนิด

Antimicrobial drugs	*V. cholerae*		*V. fluvialis*		*V. vulnificus*	
	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
Oxytetracycline	≥ 0.50	≥ 16	≥ 0.50	≥ 64	≥ 32	≥ 256
Sulfadimethoxine	≥ 128	≥ 256	≥ 0.125	≥ 256	≥ 128	≥ 256
Enrofloxacin	≥ 1	≥ 16	≥ 0.125	≥ 256	≥ 0.50	≥ 32
Tetracycline	≥ 1	≥ 32	≥ 0.125	≥ 64	≥ 16	≥ 32
Oxolinic acid	≥ 0.125	≥ 16	≥ 0.125	≥ 8	≥ 1	≥ 128

<u>การศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ 5 ชนิดในการยับยั้งโรควิบริโอซิสในหอยเป๋าฮื้อ</u>

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ 5 ชนิด ได้แก่ Oxytetracycline, Sulfadimethoxine, Enrofloxacin, Tetracycline และ Oxolinic acid ในขนาดต่างๆกัน เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อ เมื่อให้ยา Oxytetracycline ในขนาด 20, 50 และ 80 ppm มีค่าเท่ากับ

46.67±6.67%, 66.67±6.67% และ 63.33±6.67% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 33.33±8.82% ซึ่งพบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Oxytetracycline ในขนาด 50 และ 80 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกับชุดควบคุมบวกและลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาขนาด 50 ppm จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ารักษาด้วยยาขนาด 80 ppm ส่วนหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาขนาด 20 ppm นั้นพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกับชุดควบคุมบวก ($P>0.05$) (ตารางที่ 6 และภาพที่ 18)

อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อ เมื่อรักษาด้วยยา Sulfadimethoxine ในขนาด 10, 20 และ 30 ppm มีค่าเท่ากับ 26.67±3.33%, 46.67±3.33% และ 36.67±3.33% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 20.00±0.00% ซึ่งพบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Sulfadimethoxine ในขนาด 10 ppm มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกับชุดควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Sulfadimethoxine ทั้ง 3 ขนาดนั้นมีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันและแตกต่างกับชุดควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาขนาด 20 ppm จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด ($P<0.05$) (ตารางที่ 7 และภาพที่ 19)

อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อ เมื่อรักษาด้วยยา Enrofloxacin ในขนาด 5, 10 และ 15 ppm มีค่าเท่ากับ 53.33±3.33%, 56.67±3.33% และ 53.55±3.33% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 36.67±3.33% ซึ่งพบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Enrofloxacin ในขนาดยา 5, 10 และ 15 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกับชุดควบคุมบวกและลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Enrofloxacin ทั้ง 3 ขนาดนั้นมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาขนาด 10 ppm จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (ตารางที่ 8 และภาพที่ 20)

อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อ เมื่อรักษาด้วยยา Tetracycline ในขนาด 10, 30 และ 50 ppm มีค่าเท่ากับ 43.33±3.33%, 43.33±6.67% และ 50.00±10.00% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 23.33±3.33% ซึ่งพบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Tetracycline ในขนาดยา 10, 30 และ 50 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกับชุดควบคุมบวกและลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Tetracycline ทั้ง 3 ขนาดนั้นมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาขนาด 50 ppm จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (ตารางที่ 9 และภาพที่ 21)

อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อ เมื่อรักษาด้วยยา Oxolinic acid ในขนาด 1, 4 และ 16 ppm มีค่าเท่ากับ 43.33±3.33%, 40.00±0.00% และ 40.00±0.00% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มควบคุมบวกมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 30.00±0.00% ซึ่งพบว่าหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วย Oxolinic acid ในขนาดยา 5, 10 และ 15 ppm มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกับชุดควบคุมบวกและลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Oxolinic acid ทั้ง 3 ขนาดนั้นมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่พบว่า

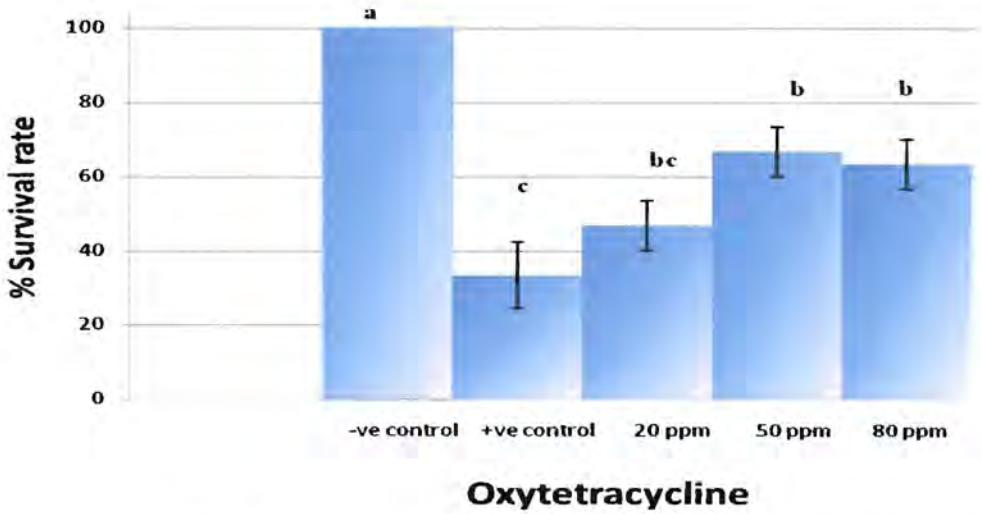
หอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยาขนาด 1 ppm จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (ตารางที่ 10 และภาพที่ 22) ส่วนอัตราการรอดชีวิตในกลุ่มควบคุมลบมีค่าเท่ากับ 100±0.00% ในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 1-5 ในภาคผนวก ฉ.)

นอกจากนี้ ได้มีการสังเกตอัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อหลังจากการรักษาวันสุดท้ายต่อไปอีก 7 วัน รวมเป็นระยะเวลาทั้งหมด 14 วันหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส พบว่าอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากวันที่ 7 ของการทดลองรักษาด้วยยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิด

ตารางที่ 6 ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา oxytetracycline

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (7วัน)	อัตราการรอดชีวิต (%)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
Negative control	1	10	10	100.00	100.00±0.00[a]
	2	10	10	100.00	
	3	10	10	100.00	
Positive control	1	10	3	30.00	33.33±8.82[c]
	2	10	2	20.00	
	3	10	5	50.00	
20	1	10	6	60.00	46.67±6.67[bc]
	2	10	4	40.00	
	3	10	4	40.00	
50	1	10	8	80.00	66.67±6.67[b]
	2	10	6	60.00	
	3	10	6	60.00	
80	1	10	7	70.00	63.33±6.67[b]
	2	10	7	70.00	
	3	10	5	50.00	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

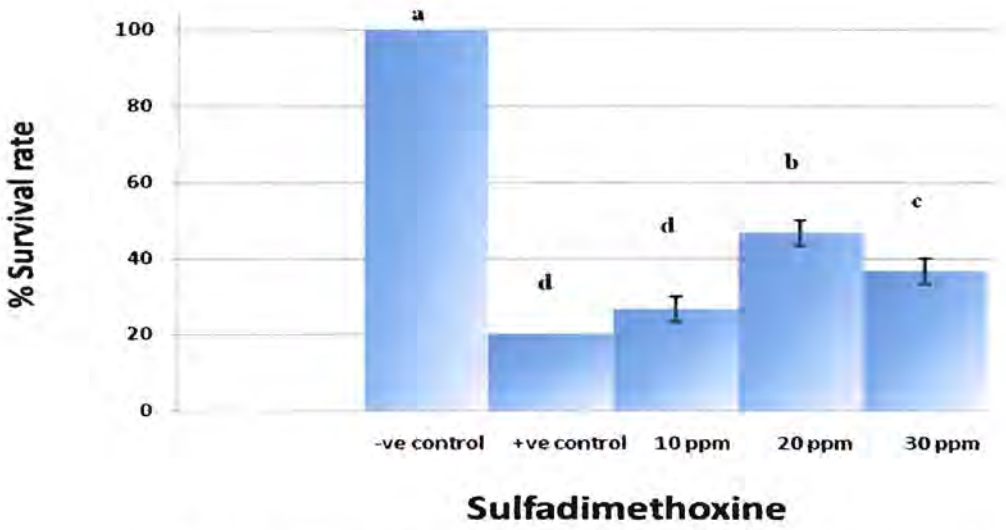


ภาพที่ 18 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา oxytetracycline

ตารางที่ 7 ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา sulfadimethoxine

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (7วัน)	อัตราการรอดชีวิต (%)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
Negative control	1	10	10	100.00	100.00±0.00[a]
	2	10	10	100.00	
	3	10	10	100.00	
Positive control	1	10	2	20.00	20.00±0.00[d]
	2	10	2	20.00	
	3	10	2	20.00	
10	1	10	2	20.00	26.67±3.33[d]
	2	10	3	30.00	
	3	10	3	30.00	
20	1	10	4	40.00	46.67±3.33[b]
	2	10	5	50.00	
	3	10	5	50.00	
30	1	10	4	40.00	36.67±3.33[c]
	2	10	3	30.00	
	3	10	4	40.00	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b, c และ d ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

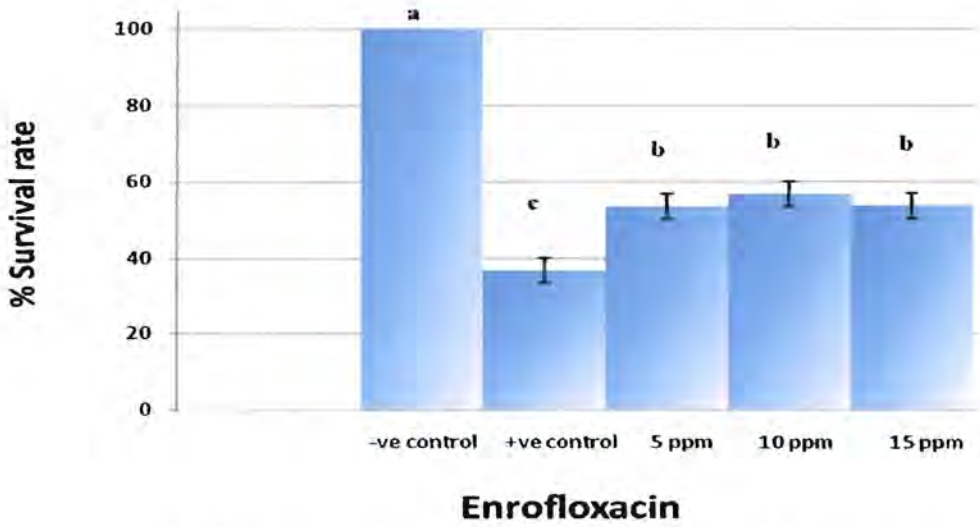


ภาพที่ 19 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา sulfadimethoxine

ตารางที่ 8 ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา enrofloxacin

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (7วัน)	อัตราการรอดชีวิต (%)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
Negative control	1	10	10	100.00	100.00±0.00[a]
	2	10	10	100.00	
	3	10	10	100.00	
Positive control	1	10	3	30.00	36.67±3.33[c]
	2	10	4	40.00	
	3	10	4	40.00	
5	1	10	5	50.00	53.33±3.33[b]
	2	10	6	60.00	
	3	10	5	50.00	
10	1	10	6	60.00	56.67±3.33[b]
	2	10	6	60.00	
	3	10	5	50.00	
15	1	10	6	60.00	53.55±3.33[b]
	2	10	5	50.00	
	3	10	5	50.00	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

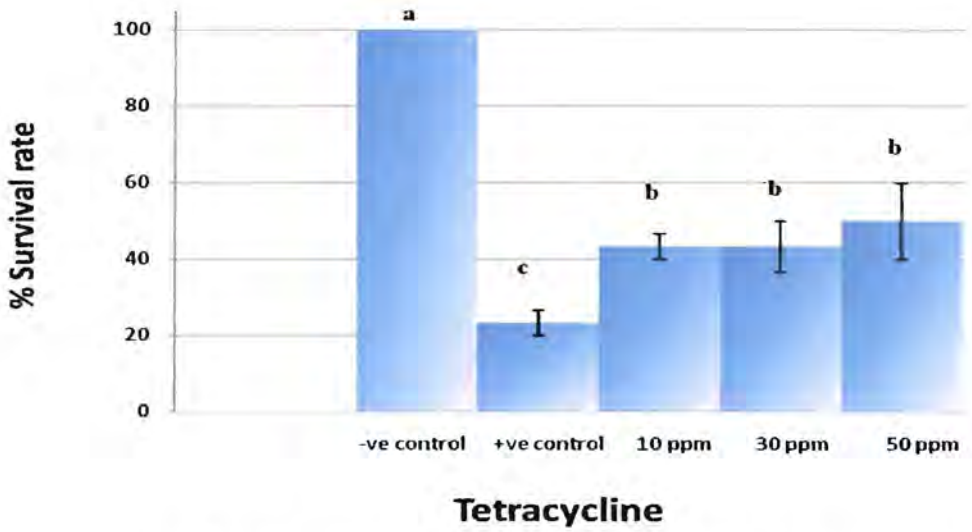


ภาพที่ 20 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา enrofloxacin

ตารางที่ 9 ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา tetracycline

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (7วัน)	อัตราการรอดชีวิต (%)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
Negative control	1	10	10	100.00	100.00±0.00[a]
	2	10	10	100.00	
	3	10	10	100.00	
Positive control	1	10	2	20.00	23.33±3.33[c]
	2	10	2	20.00	
	3	10	3	30.00	
10	1	10	4	40.00	43.33±3.33[b]
	2	10	5	50.00	
	3	10	4	40.00	
30	1	10	3	30.00	43.33±6.67[b]
	2	10	5	50.00	
	3	10	5	50.00	
50	1	10	3	30.00	50.00±10.00[b]
	2	10	6	60.00	
	3	10	6	60.00	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

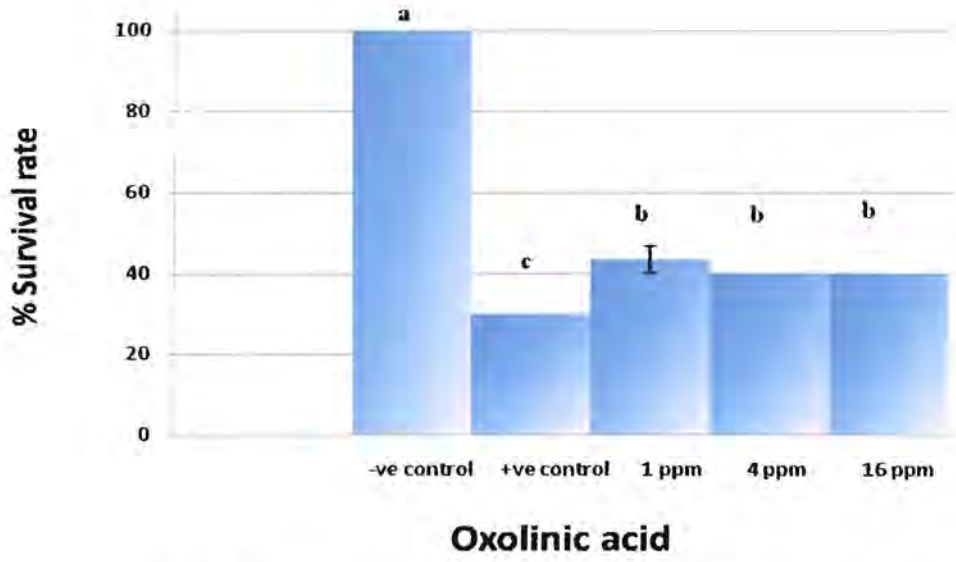


ภาพที่ 21 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา tetracycline

ตารางที่ 10 ผลการรักษาโรควิบริโอซีส โดยการใช้ยา oxolinic acid

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (7วัน)	อัตราการรอดชีวิต (%)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
Negative control	1	10	10	100	100.00±0.00[a]
	2	10	10	100	
	3	10	10	100	
Positive control	1	10	3	30	30.00±0.00[c]
	2	10	3	30	
	3	10	3	30	
1	1	10	4	40	43.33±3.33[b]
	2	10	4	40	
	3	10	5	50	
4	1	10	4	40	40.00±0.00[b]
	2	10	4	40	
	3	10	4	40	
16	1	10	4	40	40.00±0.00[b]
	2	10	4	40	
	3	10	4	40	

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 22 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อป่วยที่รักษาด้วยยา oxolinic acid

<u>การยืนยันเชื้อแบคทีเรียหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีสและการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อนและหลังการรักษาเป็นเวลา 7 วัน</u>

ผลจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากหอยเป๋าฮื้อที่ตายหลังจากการทดลอง พบว่า ในทุกตัวอย่างที่สุ่มมาทำการเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA และ TCBS ผลการทดลองทางชีวเคมีที่ได้จากชุดทดสอบ API 20E (BIOMERIEUX®) และผลการทดสอบการย้อมแกรม, ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) และปฏิกิริยา Oxidase test พบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae, V. fluvialis* และ *V. vulnificus* ซึ่งให้ผลตรงกับผลทดสอบการเพาะเชื้อและพิสูจน์แยกเชื้อแบคทีเรียก่อนทำการทดลอง

ผลการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria count) โดยการสุ่มตัวอย่างหอยป่วย หอยตายและหอยปกติ โดยจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในหอยปกติเท่ากับ 1.5 x 10^2 CFU/ml. หอยที่ตายภายหลังจากการฉีดเชื้อที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 5.4 x 10^8 CFU/ml. หอยที่ป่วยภายหลังจากการฉีดเชื้อที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 7.4 x 10^7 CFU/ml. และหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 7.6 x 10^4 CFU/ml.

<u>การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ</u>

ผลการตรวจคุณภาพน้ำดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่า การวัดคุณภาพน้ำในกระบะทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ มีค่า pH เฉลี่ยทุกชุดการทดลองเท่ากับ 8.0±0.01 และมีอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ย 27.58±0.02 องศาเซลเซียส โดยจะมีค่าลดลงเมื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกๆ 3 วัน ส่วนค่าความเค็มเฉลี่ยทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 30±0.15 psu ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นด่างของน้ำทะเล (Alkalinity) มีค่าเฉลี่ย 5.78±0.02 และ 113±0.84 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร เช่น แอมโมเนีย (Ammonia), ไนไตร์ท (Nitrite), ไนเตรท (Nitrate) และฟอสเฟต (Phosphate) ใน

น้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยเป๋าฮื้อตลอดการทดลอง 7 วันมีค่าเพิ่มสูงขึ้น โดยมีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตร์ทและไนเตรทเฉลี่ยทุกชุดการทดลองเท่ากับ 3.041±0.10, 0.463±0.02 และ 9.833±0.12 µg at N/L ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟอสเฟตเฉลี่ยทุกชุดการทดลองเท่ากับ 4.405±0.15 µg at P/L (ตารางที่ 1 ในภาคผนวก ช.) ซึ่งพบว่าแต่ละพารามิเตอร์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 11 ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ต่างๆ ตลอดการทดลอง

พารามิเตอร์ (หน่วย)	ค่าเฉลี่ยที่ตรวจวัดได้ในแต่ละชุดการทดลอง				
	Oxytetracycline	**Sulfadimethoxine**	**Enrofloxacin**	**Tetracycline**	**Oxolinic acid**
1. อุณหภูมิน้ำ (°C)	27.57±0.27[a]	27.55±0.32[a]	27.57±0.29[a]	27.57±0.26[a]	27.63±0.27[a]
2. ความเค็ม (psu)	30±0.33[a]	30±0.17[a]	30±0.17[a]	30±0.44[a]	30±0.17[a]
3. pH	8.0±0.09[a]	8.1±0.06[a]	8.1±0.05[a]	8.0±0.02[a]	8.1±0.05[a]
4. DO (mg/l)	5.76±0.17[a]	5.84±0.16[a]	5.79±0.13[a]	5.74±0.14[a]	5.78±0.15[a]
5. Alkalinity (mg/l)	112±3.21[a]	112±2.54[a]	113±2.44[a]	111±2.14[a]	115±2.84[a]
6. Nitrite (µg at N/L)	0.445±0.17[a]	0.441±0.17[a]	0.491±0.17[a]	0.510±0.18[a]	0.430±0.17[a]
7. Nitrate (µg at N/L)	9.627±2.63[a]	9.855±2.49[a]	9.617±2.70[a]	10.123±2.53[a]	9.833±2.53[a]
8.Ammonia (µg at N/L)	2.814±1.93[a]	2.935±1.91[a]	3.192±2.10[a]	3.199±2.23[a]	3.066±2.09[a]
9.Phosphate (µg at P/L)	4.160±1.99[a]	4.275±1.99[a]	4.258±1.94[a]	4.781±2.00[a]	4.552±2.09[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองเพาะเชื้อ *Vibrio* spp. จากหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วย พบเชื้อวิบริโอทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *V. cholerae, V. fluvialis* และ *V. vulnificus* โดยเชื้อที่พบทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ย้อมติดสีแดงและมีรูปร่างท่อนสั้น และเชื้อวิบริโอที่พบทั้ง 3 ชนิดนี้ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้เป็นปกติในน้ำทะเลอยู่แล้ว (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, 2528) ซึ่งถือเป็น Normal microflora จากการศึกษาของนันทริกา ชันซื่อ (2543) พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่พบในหอยเป๋าฮื้อบ่อยที่สุด คือ เชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) และเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญและเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคท้องบวมน้ำในหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งมีหลายชนิด เช่น *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของเอนก โสภณ และคณะ (2550) พบว่า เชื้อวิบริโอที่พบในหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วยที่เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนแบบกึ่งปิดมีหลายชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. anguillarum* I และ II เช่นเดียวกับการศึกษาของวิศรา โชคดีทวีอนันต์ และคณะ (2541) พบว่า หอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ที่มีอาการป่วยและปกติจะพบเชื้อวิบริโอที่คล้ายคลึงกัน โดยส่วนใหญ่พบเชื้อ *V. cholerae* และ *V. vulnificus* และเชื้อเหล่านี้จะสามารถเข้าสู่ระบบเลือดของหอยเป๋าฮื้อได้ในสภาวะที่หอยเป๋าฮื้อเกิดความเครียด โดยอาจเนื่องมาจากการจัดการ เช่น ระดับความเค็มของน้ำทะเล, ปริมาณออกซิเจนในน้ำ ค่า pH ตะกอนที่อยู่ก้นบ่อและปัจจัยอื่นๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะปกติ จึงทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของหอยเป๋าฮื้อเสียหน้าที่ไป (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2536)

เมื่อเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อเท้าหอยเป๋าฮื้อ พบว่าค่า LD_{50} ของเชื้อ *V. cholerae* มีค่าต่ำกว่าเชื้อ *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* ซึ่งแสดงว่าเชื้อ *V. cholerae* มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุด จึงได้เลือกเชื้อ *V. cholerae* มาเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส (vibriosis) ในหอยเป๋าฮื้อเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดต่อไป และเมื่อฉีดสารละลายเชื้อวิบริโอทั้ง 3 ชนิดนี้เข้าสู่กล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อ พบว่า หอยเป๋าฮื้อจะตายและป่วยด้วยอาการในลักษณะเช่นเดียวกัน ซึ่งไม่สามารถระบุชี้ชัดได้ว่าเชื้อวิบริโอชนิดใดก่อให้เกิดรอยโรคแบบใดแน่นอน โดยหอยเป๋าฮื้อที่ป่วยเป็นโรควิบริโอซีสนั้นจะแสดงรอยโรคส่วนใหญ่บริเวณกล้ามเนื้อเท้าเป็นแผลวงสีขาว แผลเปื่อยหรือขาดแหว่ง ตัวแข็งเกร็งและเนื้อเยื่อปิดอวัยวะภายในฉีกขาด เป็นต้น

หลังจากนั้นได้ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 13 ชนิด พบว่า ยาต้านจุลชีพที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อวิบริโอทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Chloramphenicol และ Nalidixic acid รองลงมา ได้แก่ Doxycycline hydrochloride, Furazolidone, Norfloxacin, Oxolinic acid, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Oxytetracycline, Tetracycline และ Sulfadimethoxine ตามลำดับ ส่วน Erythromycin และ Novobiocin นั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวิบริโอทั้ง 3 ชนิด โดยในการทดลองขั้นต่อไปนั้นได้พิจารณาเลือกใช้ยาต้านจุลชีพเพียง 5 ชนิด ได้แก่ Oxytetracycline, Sulfadimethoxine, Enrofloxacin, Tetracycline และ Oxolinic acid เนื่องจากเป็นยาต้านจุลชีพที่ได้ขึ้นทะเบียนยาสำหรับสัตว์น้ำเรียบร้อยแล้ว ซึ่งปัจจุบันได้มียาสัตว์น้ำขึ้นทะเบียน

ถูกต้องอยู่ 13 ตัวยา และอยู่ภายใต้การควบคุมของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข (กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2550) อีกทั้งยังมีรายงานการใช้มาแล้วในสัตว์น้ำประเภทอื่น เช่น กุ้ง, ปลาและหอยบางชนิด (วิศรา โชคดีทวีอนันต์ และคณะ, 2541) และยังเป็นยาต้านจุลชีพที่มักใช้ในการรักษาโรควิบริโอซีสในสัตว์น้ำ (ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2549)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดในการยับยั้งและกำจัดเชื้อ *V. cholerae, V. fluvialis* และ *V. vulnificus* โดยวิธี Broth dilution พบว่า Oxolinic acid มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อ *V. cholerae* และ *V. fluvialis* สูงสุด (MIC $\geq$ 0.125, MBC $\geq$ 16 ppm และ MIC $\geq$ 0.125, MBC $\geq$ 16 ppm ตามลำดับ) ส่วน Enrofloxacin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อ *V. vulnificus* สูงสุด (MIC $\geq$ 0.50, MBC $\geq$ 32 ppm) ส่วน Sulfadimethoxine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและกำจัดเชื้อวิบริโอทั้ง 3 ชนิดต่ำสุด

ในการศึกษานี้ พบว่ายาต้านจุลชีพทั้ง 5 ชนิดให้ผลต่ออัตรารอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่แตกต่างกันโดยระดับความเข้มข้นของ Oxytetracycline ที่มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ ขนาด 50 ppm และพบว่าหอยเป๋าฮื้อมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกับการรักษาด้วยยาขนาด 80 ppm. ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ที่ขนาด 50 ppm เพื่อป้องกันมิให้สัตว์น้ำเกิดอาการดื้อยา อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Liao และคณะ (1992) ที่ใช้ขนาดยาเท่ากับ 40-60 ppm ในการรักษาเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำโดยวิธีการแช่ และ Oxytetracycline ยังเป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์วงกว้าง (broad spectrum) (ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2549) เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะเข้าไปขัดขวางการเจริญเติบโตหรือการขยายตัวของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งการใช้ยาในกลุ่มนี้จะไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับยากลุ่มซัลฟา เมื่อใช้ Oxytetracycline กับสัตว์น้ำแล้วควรจะมีระยะเวลาหยุดยาก่อนจับประมาณ 50 วัน (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551) ส่วน Sulfadimethoxine ขนาดที่มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดในการศึกษานี้ คือ ขนาด 20 ppm ซึ่งก็มีความสอดคล้องกับขนาดที่แนะนำเท่ากับ 20-50 ppm ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา ซึ่งให้ยาโดยวิธีการแช่เช่นกัน (Carpenter, 2005) โดย Sulfadimethoxine เป็นยาต้านจุลชีพที่ใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะเข้าไปขัดขวางการเจริญเติบโตหรือการขยายตัวของเชื้อแบคทีเรีย การใช้ยากลุ่มซัลฟาไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับกลุ่มยาเตตร้าซัยคลิน และเมื่อใช้ Sulfadimethoxine กับสัตว์น้ำแล้วควรจะมีระยะเวลาหยุดยาก่อนจับประมาณ 21 วัน (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551) สำหรับ Enrofloxacin ขนาดที่มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ ขนาด 10 ppm แต่อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อไม่แตกต่างกับการรักษาด้วยยาขนาด 5 และ 15 ppm. ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ที่ขนาด 5 ppm เพื่อป้องกันมิให้สัตว์น้ำเกิดอาการดื้อยา ซึ่ง Enrofloxacin เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์วงกว้าง และออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถฆ่าเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (เฟื่องฟ้า โสภณพงศ์พิพัฒน์ และคณะ, 2549) เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะไปขัดขวางการสังเคราะห์นิวคลีอิกแอซิดของเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA-gyrase ภายใน

นิวเคลียสซึ่งเป็นการรบกวนสายเกลียวของ DBA ปกติ (Bahri sited by Roque, *et al.*, 2001) นับเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่ไม่เหมือนกับยาต้านเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มอื่น และยาตัวนี้ยังสามารถแพร่กระจายไปในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆได้กว้างและคงอยู่ได้นาน (Stoffregen, *et al.*, 1997 อ้างโดย เฟื่องฟ้า โสภณพงศ์พิพัฒน์ และคณะ, 2549) การใช้ยากลุ่มนี้จะไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับยากลุ่มเตตร้าซัยคลิน เนื่องจากจะลบล้างฤทธิ์ซึ่งกันและกัน และเมื่อใช้ Enrofloxacin กับสัตว์น้ำแล้วควรจะมีระยะเวลาหยุดยาก่อนจับประมาณ 21 วัน (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551) สำหรับ Tetracycline ขนาดที่มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ ขนาด 50 ppm แต่อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อไม่แตกต่างกับการรักษาด้วยยาขนาด 10 และ 30 ppm. ซึ่งพบว่าที่ขนาดยา 50 ppm นั้นมีค่าค่อนข้างสูงกว่าขนาดยาที่แนะนำให้ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. และ *Aeromonas* spp. ในกุ้งกุลาดำที่ได้แนะนำให้ใช้ขนาด 1-30 ppm ดังนั้นจึงขอแนะนำให้ใช้ยาที่ขนาด 10 ppm เนื่องจากให้ผลต่ออัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อไม่แตกต่างกันและเพื่อป้องกันสัตว์น้ำเกิดอาการดื้อยา เมื่อ Tetracycline เข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำจะเข้าไปยับยั้งการสร้างโปรตีนและขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การใช้ยากลุ่มเตตร้าซัยคลินไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับยาต้านจุลชีพหลายตัว เช่น กลุ่มยาซัลฟาและสารประเภทเกลือแคลเซียม โซเดียมคาร์บอเนต เป็นต้น และเมื่อใช้ Tetracycline กับสัตว์น้ำแล้วควรจะมีระยะเวลาหยุดยาก่อนจับประมาณ 10 วัน (ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2549; สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551) ส่วน Oxolinic acid ขนาดที่มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ ขนาด 1 ppm แต่อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อไม่แตกต่างกับการรักษาด้วยยาขนาด 4 และ 16 ppm. ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ที่ขนาด 1 ppm เพื่อป้องกันมิให้สัตว์น้ำเกิดอาการดื้อยา อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Naviner และคณะ (2007) ที่ใช้ขนาดยาเท่ากับ 0.25-8 ppm ในการรักษาเชื้อ *Aeromonas* spp. ในปลาเทราท์ และ Oxolinic acid ยังเป็นยาในกลุ่มควิโนโลนเช่นเดียวกับ Enrofloxacin เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำแล้วจะเข้าไปขัดขวางการสังเคราะห์นิวคลีอิกแอซิดของเชื้อแบคทีเรีย และทำให้เซลล์เชื้อแบคทีเรียถูกทำลาย การใช้ยากลุ่มควิโนโลนนี้ไม่แนะนำให้ใช้ร่วมกับยากลุ่มเตตร้าซัยคลิน เนื่องจากจะลบล้างฤทธิ์ซึ่งกันและกัน และเมื่อใช้ Oxolinic acid กับสัตว์น้ำแล้วควรจะมีระยะเวลาหยุดยาก่อนจับประมาณ 5 วัน (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551)

อย่างไรก็ตามการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสมทั้งในชนิด ความเข้มข้นและระยะเวลาของการให้ยาต้านจุลชีพ ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิดอุบัติการณ์ของการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำได้ (Aarestrup, 2004) สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาพบการดื้อต่อสารต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น สเตรปโตมัยซิน ออกซีเตตราซัยคลินของ *Streptococcus suis* (อุไม บิลหมัด และคณะ, 2005) อีกทั้งการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่ถูกต้องจะก่อให้เกิดผลเสียอื่นๆ ตามมาอย่างมหาศาล อาทิ การเกิดเชื้อโรคสายพันธุ์ใหม่ที่ดื้อยา การทำลายความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในบริเวณนั้น หรือการตกค้างของยาหรือสารเคมีในเนื้อสัตว์น้ำ เป็นต้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงไม่ขอแนะนำเกษตรกรให้ใช้สารต้านจุลชีพในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าคำแนะนำและใช้โดยไม่จำเป็น เพราะปัญหาการป่วยของสัตว์น้ำนั้นมีสาเหตุมาจากหลายประการด้วยกัน เช่น คุณภาพน้ำในบ่อ คุณภาพอาหารหรือการเปลี่ยนแปลงของ

สิ่งแวดล้อม เป็นต้น การที่เกษตรกรจะตัดสินใจใช้ยาต้านจุลชีพในการบำบัดโรค ควรใช้ในกรณีที่สัตว์น้ำป่วย เนื่องจากมีการติดเชื้อแบคทีเรีย ปรสิตหรือเชื้อรา เป็นต้น นอกจากนั้นเกษตรกรยังต้องศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องอีกด้วย (สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551)

ส่วนคุณภาพน้ำในกระบะทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ มีค่า pH และอุณหภูมิของน้ำลดลงเมื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำหลังจากทดลองไปแล้วทุกๆ 3 วัน ส่วนค่าความเค็มอยู่ในช่วง 29-30 psu ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) มีค่าเฉลี่ย 5.78±0.02 และ 113±0.84 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และปริมาณธาตุอาหาร เช่น แอมโมเนีย (Ammonia), ไนไตร์ท (Nitrite), ไนเตรท (Nitrate) และ ฟอสเฟต (Phosphate) ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงหอยเป๋าฮื้อตลอดการทดลอง 7 วันมีค่าเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 1 ในภาคผนวก ช.) แต่ค่าคุณภาพน้ำที่วัดได้ในแต่ละพารามิเตอร์นั้นยังมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (กรมควบคุมมลพิษ) (ตารางที่ 2 ในภาคผนวก ช.)

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบขั้นตอนต่างๆ เช่น ความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อวิบริโอทั้ง 3 ชนิด การเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีส การหาค่า LD_{50}, MIC และ MBC ต้องใช้เชื้อวิบริโอที่ทำการแยกภายในครั้งเดียวกัน และต้องใช้เชื้อนั้นตลอดการทดลอง โดยทำการเก็บรักษาเชื้อ (stock) ไว้
2. การเก็บรักษาเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C (เก็บไว้ได้ประมาณ 1-2 ปี) หรือ -80 °C (เก็บไว้ได้ประมาณ 3 ปี) ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพราะจะทำให้โปรตีนเสียสภาพไปได้
3. ยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดลอง ควรจะใช้แบบ Chemical grade ต้องมีเลขทะเบียนยาที่แน่นอนและต้องเป็นยาที่ขึ้นทะเบียนอนุญาตให้ใช้กับสัตว์น้ำ
4. ควรระบุช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อ สถานที่ อายุและขนาดของตัวหอยลงในรายงานโดยละเอียด เนื่องจากหอยที่มาจากแหล่งเลี้ยงและช่วงเวลาที่แตกต่างกันก็อาจส่งผลให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน
5. น้ำทะเลที่นำมาใช้ในงานทดลอง ต้องเป็นน้ำทะเลจากแหล่งเดียวกัน และเตรียมน้ำพร้อมกันในทุกชุดการทดลอง เพื่อลดปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบต่อการทดลองได้

บรรณานุกรม

กัมปนาท สุคนธนิตย์, 2544. คัมภีร์การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ. รายงานการเรียนวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2544 มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 19 หน้า.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2536. โรคที่สำคัญในหอย. วารสารโรคสัตว์น้ำ 14(3) หน้า 9-12.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ และวีณา เคยพุดซา, 2541. การใช้ Oxytetracycline, Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin และ Trimethroprim & Sulfadiazine ในการป้องกันโรคในลูกกุ้งกุลาดำ. การประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4 ประจำปี 2541 ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า. 5-7 สิงหาคม 2541. หน้า 124-131.

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, 2547. ประสิทธิภาพของเอ็นโรฟลอกซาซินที่มีต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2547. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง.

เฟื่องฟ้า โสภณพงศ์พิพัฒน์, จุฑามาศ จัตุชัย และมณฑาทิพย์ ใจวัง, 2549. ผลของยาต้านเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด: ออกซีเตตร้าซัยคลิน, ฟลอเฟนนิคอล, เอนโรฟลอกซาซิน, ซัลฟาเมททอกซาโซล-ไตรเมทโตพริมและอีริโทรมัยซินในการรักษาโรควิบริโอซิสจากเชื้อวิบริโอ แอลจิโนไลติคัสในหอยหวาน. โครงการพิเศษ 2549 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณัฏฐา วิศิษฏ์วิทยากร, 2549. ยาต้านจุลชีพกับการป้องกันรักษาโรคสัตว์น้ำ. วารสารศูนย์บริการวิชาการ ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 ม.ค.-มี.ค. 2549. หน้า 45-53.

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, 2551. คู่มือการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล (ออนไลน์). ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์น้ำ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. สืบค้นจาก www.dld.go.th/niah, V3 N2 [12 December 2009]

ธานินทร สิงหะไกรวรรณ และ มาซาโนริ โดอิ, 2536. การทดลองเพาะเลี้ยงหอยโข่งทะเลพันธุ์พื้นเมืองของไทย (*Haliotis asinina* Linne). ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กองประมงทะเล กรมประมง กรุงเทพฯ.

นันทริกา ชันซื่อ, 2539. เชื้อแบคทีเรียวิทยาในปลา. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทริกา ชันซื่อ, 2543. โรคของหอยเป๋าฮื้อ. ศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 27, 2549. กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่มที่ 124 ตอนที่ 11 ง ลงวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2550.

ลิลา เรืองแป้น, ยาใจ เจริญวิทยะกุล และเยาวนิตย์ ดนยดล, 2528. โรคและพยาธิในกุ้งทะเลของไทย. ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิศรา โชคดีทวีอนันต์, ชนพันธ์ รัตนสิงห์ และพงศ์ธวัช สุรเกียรติ, 2541. การศึกษาแนวทางการรักษาหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง (*Haliotis asinina*) ที่แสดงวิการอันเนื่องมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย. รายงานของวิชา Clinncal Conference. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีณา เคยพุดซา, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และมาลินี กิตกำธร, 2549. โครงการวิจัย เรื่องการศึกษาโรคและพาราสิตของหอยหวานระยะต่างๆ รวมถึงสาเหตุของการเกิดโรคและวิธีการรักษาป้องกัน (โครงการต่อเนื่องปีที่ 2). สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

วัชรินทร์ มะลัยทอง, วัลยาณี โซ่เจริญธรรม, วิชาญ ใสยชาติ และวีณา เคยพุดซา, 2549. การเหนี่ยวนำให้เกิดโรควิบริโอซีสด้วยเชื้อแบคทีเรีย วิบริโอ อัลจิโนไลติคัส ทางห้องปฏิบัติการในหอยหวาน. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันทนา อยู่สุข, 2541. หอยทะเล. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 131 หน้า.

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2550. บทคัดย่อ การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2550. กรมประมงและศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ณ ห้องประชุมกรมประมง บางเขน วันที่ 3-5 กรกฎาคม พ.ศ. 2550.

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, 2545. ยาและสารเคมีเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ. 18 หน้า.

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง, 2551. ยาและสารเคมีเพื่อการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 23 หน้า.

สารานุกรมไทยฉบับเยาวชนฯ เล่ม 26, 2545. หอยเป๋าฮื้อ (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK26/chapter9/chap9.htm [12 กรกฎาคม 2553].

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551. การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน : วงศ์วิบริโอนาซีอี. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. 79 หน้า.

สุพิศ ทองรอด ชูชาติ ชัยรัตน์ มนทกานต์ ท้ามติ้น และอนันต์ ตันสุตะพานิช, 2545. ผลของสาหร่ายผมนาง (Gracilaria fisheri) และ สาหร่ายหนาม (Acanthophora specifera) ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina* Linne). วารสารการประมง 55(5) หน้า 423-429.

อนันต์ชัย เชื่อนธรรม, 2542. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 348 หน้า.

อนุวัฒน์ นทีวัฒนา และยอห์น ฮิลลิแบร์, 2529. การสำรวจชนิดหอยโข่งทะเลบริเวณเกาะภูเก็ตและความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงหอยโข่งทะเลในประเทศไทย. วารสารการประมง 39(2) หน้า 177-190.

เอนก โสภณ, สมภพ รุ่งสุภา และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2550. โครงการวิจัย เรื่องการสำรวจชนิดและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบการเพาะและอนุบาลหอยเป๋าฮื้อไทยแบบกึ่งปิด. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

อุไม บิลหมัด, กมลสิริ คอยเกษม และอัญญรัตน์ ทิพย์ธารา, 2548. การติดเชื้อ *Streptococcus* spp. ในสุกร และความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพในภาคใต้ของประเทศไทย. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช. (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.dld.go.th/niah/Research/research.htm [2 มีนาคม 2553].

Aarestrup, F.M., A.M. Seyfarth and Angen, 2004. Antimicrobial susceptibility of *Heamophilus parasuis* and *Histophilus somnui* from pigs and cattle in Denmark. Vet Microbiol. 101: 143-146.

Cai, J., H. Han, Z. Song, C. Li and J. Zhou, 2006. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor* supertexta (Liscke). Aquaculture Research 37: 1222-1226.

Carpenter, J.W., 2005. Antimicrobial and antifungal agents used in fish. In: Exotic anomal formulary. 3rd ed. Elsevier Inc. USA. 10.

Chen, J.H., 1996. Hemolymph Collection in abalone (*Haliotis diversicolor*). ACTA Zoologica Taiwanica 7(1): 61-71.

Cheng, W., C. Li and J. Chen. 2004. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Aquculture 232: 103-115.

Dixon, M.G., Hecht, T. and Brandt, C.T. 1991. Identification and treatment of a Clostridium and Vibrio infection in South African abalone, *Haliotis midael*. Journal of fish disease. 14: 393-395.

Grasshoff, K., 1976. Method of Seawater Analysis. Verlag Chemic, Germany. 314 pp.

Gomez-Leon, J., L. Villamil, M.L. Lemos, B. Novoa and A. Figueras. 2005. Isolation of Vibrio alginoluticus and V. splendidus from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussates*) lavae associated with mass motalities. Applied and Environmental Microbiology. 71: 98-104.

Hahn, K.O., 1989. Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods, CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida, USA.

Jarayabhand, P., M. New., P. Menasveta and S. Choonhabandit, 1994. Gametogenic cycle of abalone *Haliotis ovina* Gmelin at Khangkao Island. Thai J. of Aqua. Sci 1(1): 34-42.

Jarayabhand, P., Kojima, H. and Menasveta, P. (1995). Embryonic and larval development, and early and early growth of hatchery-produced abalone (*Haliotis ovina* Gmelin.*1791)* seed. Thai J. Aqua. Sci., 1(12): 194-202.

Liao, I.C., M.S. Su and C.F. Chang, 1992. The use of chemicals in Aquaculture in Taiwan, Province of China. In: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals In Aquculture in Asia. Arthur, J.R., Lavilla-Pitogo, C.R. and Subasinghe, R.P. (eds.) Southeast Asian Fisheries Development Center Aquculture Department. Philippines.

Moriarty, D.J.W., 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture. 151: 333-349.

Naviner, M., E. Giraud, C. Thorin, H.L. Bris, H. Pouliquen and J.P. Ganiere, 2007. Effects of three dosages of oral oxolinic acid treatment on the selectin of antibiotic-resistant Aeromonas: Experimental approach in farmed trout. Aquaculture 269: 31-40.

NCCLS. 1991. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically: Second Edition NCCLS Document M7-A2.10 (8): 31.

Poomthong, T., S. Sahawatcharin and C. Sanguanngam, 1997. Induced spawning, feed production and juvenile growth of the donkey's ear abalone *Haliotis asinina* Linne. Phuket marine biological center special publication 17(1): 229-235.

Ripabelli, G., M.L. Sammarco, G.M. Grasso, I. Fanelli, A. Caprioli and I. Luzzi. 1999. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. International Journal of Food Microbiology. 49: 43-48.

Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture. 172: 125-145.

Rodriguez, S.S., M. Armenta, and B. Gomez-Gil, 2005. Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterialpopulation in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litipeneaus vannami*. Aquaculture. Article In Press.

Roque, A., A. Molina-aja, C. Bolán-Mejí and B. Gomez-Gil, 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. International Journal of Antimicrobial Agents. 17: 383-203.

Russell, A.D. 1978. Minimal bactericidal concentration. J. Antimicrob. Agent Chem. 4: 91-92.

Sainz, J.C., A.N. Maeda-Martinez and F. Ascencio. 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina Scallop (*Argopecten ventricosus circularis* Sowerby II 1842). Microbiology Ecology. 35: 188-192.

Singhagraiwan, T. 1989. The Experiment on Breeding and Nursing of Donkey's Ear Abalone (*Haliotis asinina* Linne). Technical Paper No. 21. Eastern Marine Fisheries Development Center, Marine Fisheries Division, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.

Vaseeharan, B., P. Ramasamy, T. Murugan and J.C. Chen, 2005. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. And *Aeromonas* spp. Isolated from *Penaeus monodon* hateries and ponds. International Journal of Antimicrobial Agents 26: 285-291.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

<u>อาหารกุ้งขาว อาหารสำเร็จรูปเบอร์ 3 บลังก้า 7703</u>

<u>ส่วนประกอบ</u>

ปลาป่น ปลาหมึกป่น กากถั่วเหลือง แป้งสาลี หวีทกลูเท่น ฟิชไฮโดรไลเซท ตับหมึกป่น เลซิติน วิตามิน เกลือแร่ และสานถนอมคุณภาพอาหารสัตว์

<u>คุณค่าทางอาหาร</u>

โปรตีน ไม่น้อยกว่า 34%	ไขมัน ไม่น้อยกว่า 5%
ความชื้น ไม่มากกว่า 11%	กากา ไม่มากกว่า 4%

<u>วิธีใช้</u>

ขนาด 1.0-2.0 กรัม ให้อาหารในปริมาณ 10%ของน้ำหนักตัว

ขนาด 2.0-3.0 กรัม ให้อาหารในปริมาณ 8% ของน้ำหนักตัว

ทะเบียนอาหารสัตว์เลขที่ ป.01 01 45 0232

บริษัท โภคภัณฑ์อะควอเท็ค จำกัด

99 หมู่ 9 ถ.บ้านบึง-แกลง ต.หนองอิรุณ อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี 20220

โทร. (038) 297-500-9 โทรสาร (038) 297-491-2

ภาคผนวก ข.

ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test)

1. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์
2. หยด sterile water 1หยด บนแผ่นกระจกสไลด์
3. นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเขี่ยลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover glass
4. ตรวจดูการเคลื่อนที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ขั้นตอนการย้อมสีแกรม (Gram's strain)

1. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์
2. หยด sterile water 1หยด บนแผ่นกระจก
3. นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ Smear ให้ทั่วสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง
4. ทำการฟิก (fix) เชื้อโดยการผ่านความร้อนเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนการย้อมสี
5. หยดสี crystal violet ลงให้ท่วมบนแผ่นกระจกเป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วpoheltvkf
6. หยดสี gram's iodine ให้ท่วมแผ่นกระจกเป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
7. หยด decolorizer ให้ท่วมแผ่นกระจกเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
8. หยดสี saffranin ให้ท่วมแผ่นกระจกเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด
9. เช็ดเบาๆด้วยกระดาษชำระ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดสอบความสามารถในการสร้างน้ำย่อยออกซิเดส (Oxidase test) (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551)

Oxidase test เป็นการทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรีย ตามปกติแล้วแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) จะมีการหายใจโดยใช้กระบวนการ Oxidative phospholation ซึ่งอาศัยไซโทโครม (Cytochrome) ต่างๆ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ทำให้ได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสจะต้องใช้สารรีเอเจนต์ที่ไม่มีสี คือ Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride หรือ Dimethyl- *p*-phenylene diamine dihydrochloride ถ้าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส จะทำให้สารทั้งสองชนิดนี้ถูกออกซิไดส์กลายเป็นสารประกอบที่มีสีม่วง เรียกว่า Indophenol แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส

การเตรียมรีเอเจนต์

N, N, N, N- Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride ($C_{10}H_{18}Cl_2N_2$)	1.0	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลายสารนี้ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชา (ห้ามถูกแสง)

การทดสอบ

1. เช็ดแผ่นกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์
2. นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นแผ่นเล็กๆ วางลงบนสไลด์
3. ใช้ loob ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนกระดาษกรอง
4. หยดน้ำยา Oxidase reagent (N, N, N, N- Tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride) 1 หยด ลงบนเชื้อที่อยู่บนแผ่นกระดาษกรองให้ท่วมแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที บันทึกผลของสีที่เปลี่ยนไป

การอ่านผล

ผลบวก โคโลนีจะค่อยเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม

ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี

ขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

1. ทำการเจือจางเชื้อที่ต้องการทดสอบก่อนในน้ำเกลือ 1.5% NaCl ทำให้ได้สารละลายที่ระดับความเข้มข้น McFarland No.5
2. เติมสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลุมชุดทดสอบ API 20E Test kit (Biomerieux, France) โดยการเติมสารละลายจะมี

ONPG, TDA, IND	ใส่สารละลายแค่ขอบ	
ADH, LDC, ODC	ใส่สารละลายเต็มขอบ	แล้วเติม mineral oil ให้เต็มหลุม
CIT , VP , GEL	ใส่สารละลายเต็มหลุม	

3. หลังจากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จึงนำสารละลายมาหยดลงในหลุมต่างๆ ดังนี้

TDA	หยดสารละลาย TDA 1หยด ดูสีทันที
IND	หยดสารละลาย JAMES 1หยด ดูสีทันที
VP	หยดสารละลาย VP1 1หยด ตามด้วย VP2 1หยด ทิ้งไว้ 10 นาที ดูสี

การตรวจและอ่านผลของ API 20 E หลังจาก 18-24 ช.ม (นันทริกา ซันซื่อ, 2539)

หลอด	ผลบวก (positive)	ผลลบ (negative)	ผลที่ได้จากการทดสอบ
ONPG	สีเหลือง	ไม่มีสี	สีค่อนไปทางเหลืองเป็นบวก ใช้หลอด VP ก่อนเติม reagent เป็น negative control
ADH	สีแดงหรือสีส้ม	สีเหลือง	สีส้ม 36-48 ช.ม. เป็นลบ
LDC	สีแดงหรือสีส้ม	สีเหลือง	สีส้มในเวลา 24 ช.ม. เป็นบวก
ODC	สีแดงหรือสีส้ม	สีเหลือง	สีส้ม 36-48 ช.ม. เป็นผลลบ
CIT	สีน้ำเงินเข้ม	สีเหลืองหรือเขียวอ่อน	เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียทั้งส่วน tube และ cupule, อ่านปฏิกิริยาในส่วน cupule (aerobic)
H_2S	ตะกอนสีดำ	ไม่มีตะกอนสีดำ	สีน้ำตาลของอาหารถือเป็นผลลบ
URE	สีแดงหรือสีส้ม	สีเหลือง	
TDA	เติม 1 หยด 10% Ferric chloride (TDA)		สังเกตผลทันที จุลินทรีย์ที่มี indole positive อาจจะได้สารละลายสีส้มทอง ถือว่าเป็นผลลบ
	สีน้ำตาลแดง	สีเหลือง	
IND	เติม 1 หยด Kovac's reagent (IND)		อ่านผลใน 2 นาทีหลังจากเติม Kovac's reagent
	วงแหวนสีแดงหรือชมพู	สีเหลือง	
VP	เติม 1 หยด 40% Potassium hydroxide (VP1) แล้ว 1 หยด alpha-naphtol (VP2)		รอ 10 นาทีก่อนตัดสินว่า ผลเป็นลบ สีชมพูอ่อนหลัง 10 นาทีเป็นลบ
	สีแดงหรือชมพู	ไม่มีสี	
GEL	การแพร่กระจายของสารสี	ไม่มีการแพร่กระจาย	ไม่ว่าจะมีการแพร่กระจายมากน้อย ถือเป็นบวก
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	สีเหลือง	สีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว	**Fermentation** Fermentation ของ carbohydrate เริ่มในส่วน anaerobic (ก้นหลอด) ดังนั้นให้อ่านผลจากส่วนท้ายไปบน **Oxidation** การ oxidize ของคาร์โบไฮเดรท เริ่มจากส่วน aerobic (ส่วนบนหลอด) ให้อ่านปฏิกิริยาจากบนลงล่าง

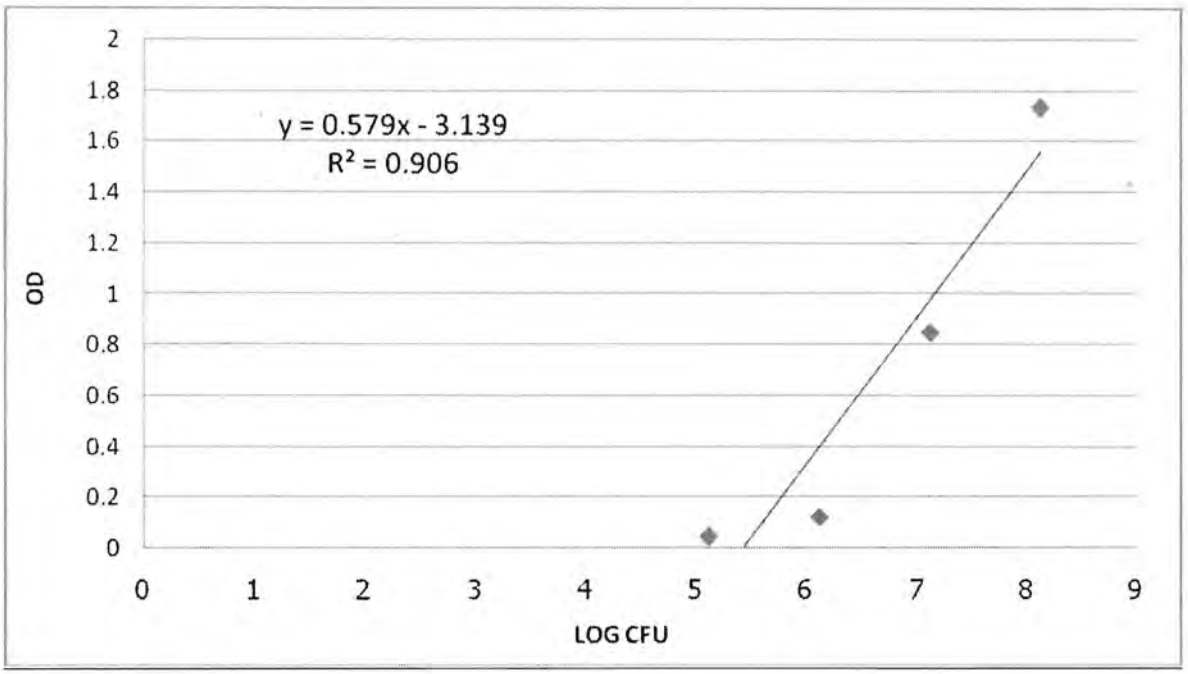
<table>
<tr><td rowspan="3">Nitrate reduction</td><td colspan="2">หลังจากอ่าน GLU แล้วให้เติม 2 หยด 0.8% sulfanilic acid (NIT1)
และ 2 หยด 0.5% N,N, dimethyl-alpha-naphthylamine (NIT2)</td><td rowspan="3">1) ก่อนเติม reagent ให้สังเกต GLU ว่ามีฟองอากาศหรือไม่ ฟองอากาศบ่งถึง reduction ของ nitrate เป็น N_2 gas
2) ผลบวกจะใช้เวลา 2-3 นาที จึงจะเห็นสีแดงเกิดขึ้น
3) ยืนยันว่าเป็นผลลบโดยการเติมผง zinc สีส้มชมพูหลัง 10 นาทีเป็นผลลบ สีเหลืองบ่งถึง reduction ของ nitrate เป็น N_2 gas</td></tr>
<tr><td>สีแดง
มีแกส
(สีเหลืองหลังเติม reagent และผง zinc)</td><td>สีเหลือง
(สีส้มหลังเติม reagent และผง zinc)</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td rowspan="2">catalase</td><td colspan="2">หลังจากอ่าน carbohydrate reaction แล้ว
ให้เติม 1 หยด 1.5% H_2O_2 ลงใน MAN, INO, SOR</td><td rowspan="2">สังเกตผลภายใน 1-2 นาที</td></tr>
<tr><td>ฟองอากาศ</td><td>ไม่เกิดฟองอากาศ</td></tr>
</table>

ภาคผนวก ค.

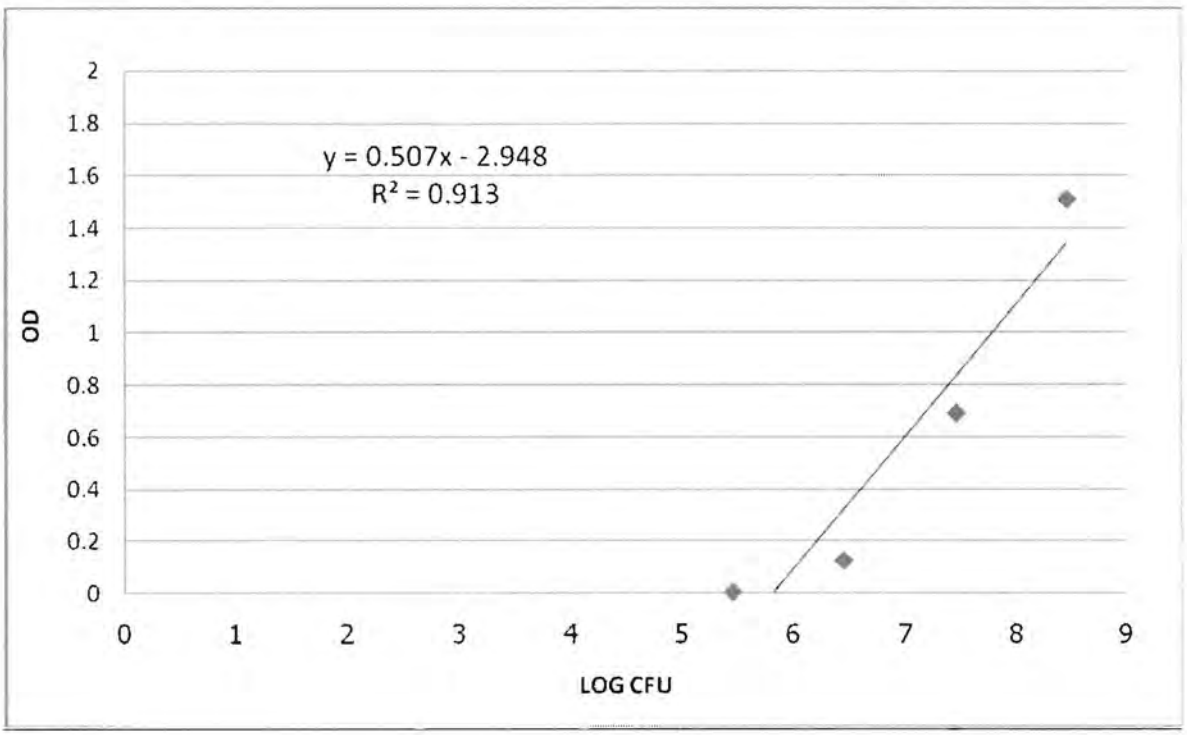
กราฟมาตรฐาน

OD = 600 นาโนเมตร

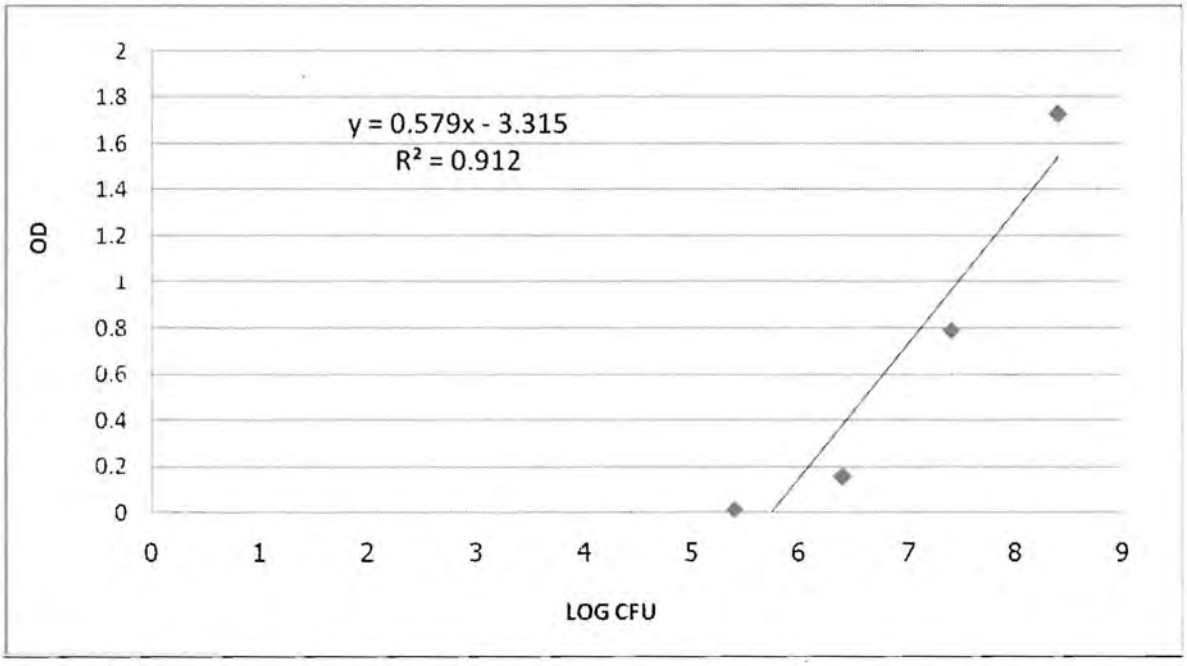
V. cholerae



V.fluvialis



V. vulnificus



ภาคผนวก ง.

ตารางที่ 1 ค่าความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวัดขนาด Inhibition Zone/Clear Zone (มิลลิเมตร)

ชื่อยา		R (Resistant)	I (Intermediate)	S (Sensitive)
Amikacin	AN 30	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxycillin	AML 10	≤ 13	14-17	18-20
Amoxycillin+clavulanic acid	AMC 30			
-*Staphylococci*		≤ 19	-	≥ 20
-*Other*		≤ 13	14-17	≥18
Apramycin	APR 15	≤ 11	12-14	≥ 15
Ampicillin	AM			
-*Gram Positive*		≤ 20	21-28	≥ 29
-*Gram Negative*		≤ 11	12-13	≥ 14
Acide oxalinque	OA	≤ 16	17-20	≥ 21
Aureomycin	A	≤ 14	15-18	≥ 19
Bacitracin	B 10	≤ 8	9-12	≥ 13
Ceftiofur	EFT 30			
Cattle				
-*P.haemolytica*		≤ 17	18-20	≥ 21
-*P.multocida*		≤ 17	18-20	≥ 21
-*H.somnus*		≤ 17	18-20	≥ 21
Swine				
-*P.multocida*		≤ 17	18-20	≥ 21
-*S.choleraesuis*		≤ 17	18-20	≥ 21
-*S.suis*		≤ 17	18-20	≥ 21
-*A.Pleuropuneumoniae* (APP)		≤ 17	18-20	≥ 21
Chickens				
-*E.coli*		-	-	≥ 23
Cephalothin	KF	≤ 14	15-17	≥ 18
Cephalexin	CL 30	-	-	≥ 24

Cloxacillin	OX	≤ 10	11-12	≥ 13
Ciprofloxacin	CLP 5			
-Haemophilus		-	-	≥ 21
-N.honorrhoeae		-	-	≥ 36
-Other		≤ 15	16-20	≥ 21
Chloramphenicol	C 30			
-Haemophilus		≤ 25	26-28	≥ 29
-S.pneumoniae		≤ 20	-	≥ 21
-Other		≤ 12	13-17	≥ 18
Colistin	CL 10	≤ 8	9-10	≥ 11
Cloxacillin	OB 5	≤		≥
Doxycycline hydrochloride	DO 30	≤ 12	13-15	≥ 16
Enrofloxacin	ENR 5	≤ 15	16-20	≥ 21
Erythromycin	E 15			
-S.pneumoniae		≤ 15	16-20	≥ 21
-Other		≤ 13	14-22	≥ 23
Flumequine	UB 30	≤		≥
Furazolidone	FR 10	≤ 14	15-18	≥ 19
Gentamicin	CN 10	≤ 12	13-14	≥ 15
Halquinol				
-E.coli		13	-	≥ 15
-Salmonella		13-14	-	≥ 16
Kanamycin	K 30	≤ 13	14-17	≥ 18
Lincimycin	MY 2	≤ 9	10-14	≥ 15
Linco-spectin	Lin-sp	≤		≥
Metronidazole	MYZ 10			
Nalidixic acid	NA	≤ 13	14-18	≥ 19
Neomycin	N 30	≤ 12	13-16	≥ 17
Norfloxacin	NOR 10	≤ 12	13-16	≥ 17
Nitrofurantion	F 300	≤ 14	15-16	≥ 17
Novobiocin	NV 30			

-on Mueller Hinton ager		≤ 17	18-21	≥ 22
-on Mueller Hinton ager with blood		≤ 14	15-16	≥ 17
Ofloxacin	OFX 5			
-Haemophilus		-	-	≥ 16
-N.gonorrhoeae		-	-	≥ 31
-S.pneumoniae		≤ 12	13-15	≥ 16
-Other		≤ 12	13-15	≥ 16
Oxyteracycline	OT 10	≤ 14	15-18	≥ 19
Penicillin G				
-Staphylococci		≤ 20	21-28	≥ 29
-Other		≤ 11	12-21	≥ 22
Polymyxin B	PB	≤ 8	9-11	≥ 12
Pefloxacin	PEF 5	≤ 15	16-21	≥ 22
Sulfachloropyridazine+trimethoprim	SCP	≤ 10	11-15	≥ 16
Sulfamethoxypyridazole	KY	≤		≥
Spirmycin	SP 100	≤		≥
Streptomycin	S 300	≤ 11	12-14	≥ 15
Sulphamethoxazole trimethoprim	SXT 25	≤ 12	13-16	≥ 17
Terramycin	T	≤ 14	15-18	≥ 19
Tobramycin	ToB	≤ 11	12-13	≥ 14
Triple sulfa	SSS	≤ 12	13-16	≥ 17
Tyrosin	TY			
Tetracycline	TE 30	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomycin	VA	≤ 9	10-11	≥ 12

แหล่งที่มา: Difco Manual 10Th Edition, 1984

ภาคผนวก จ.

ตารางที่ 1 ผลการหาค่า Lethal dose (LD_{50}) ของเชื้อ *V. cholerae* โดยการคำนวณด้วยวิธี probit analysis (SPSS version 13.0)

***** PROBIT ANALYSIS*****			
	95% Confidence Limits		
Prob	***V.cholerae* conc**	**Lower**	**Upper**
0.01	5.03231	3.42264	5.70875
0.02	5.26491	3.82541	5.87926
0.03	5.41248	4.07987	5.98853
0.04	5.5235	4.27058	6.07143
0.05	5.6138	4.42518	6.13941
0.06	5.69067	4.55632	6.1977
0.07	5.75806	4.67093	6.2492
0.08	5.8184	4.7732	6.29565
0.09	5.87328	4.86591	6.3382
0.10	5.9238	4.95096	6.37766
0.15	6.13295	5.29945	6.54466
0.20	6.29918	5.5709	6.68291
0.25	6.44179	5.79825	6.80704
0.30	6.56985	5.99658	6.92435
0.35	6.68852	6.17401	7.0394
0.40	6.80113	6.33542	7.15554
0.45	6.91008	6.48401	7.27547
0.50	7.01731	6.62216	7.40159
0.55	7.12453	6.75192	7.5361
0.60	7.23348	6.87533	7.68122
0.65	7.34609	6.99464	7.83945
0.70	7.46476	7.1125	8.01408

Prob	*V.cholerae* conc	Lower	Upper
0.75	7.59283	7.23223	8.20999
0.80	7.73544	7.35841	8.43529
0.85	7.90166	7.49841	8.70499
0.90	8.11081	7.66691	9.05198
0.91	8.16133	7.70665	9.13674
0.92	8.21621	7.74948	9.22917
0.93	8.27655	7.79621	9.33117
0.94	8.34395	7.84797	9.4455
0.95	8.42081	7.90655	9.57637
0.96	8.51111	7.9748	9.73068
0.97	8.62213	8.058	9.9211
0.98	8.76971	8.16759	10.17524
0.99	9.00231	8.33848	10.57763

ตารางที่ 2 ผลการหาค่า Lethal dose (LD_{50}) ของเชื้อ *V. fluvialis* โดยการคำนวณด้วยวิธี probit analysis (SPSS version 13.0)

***** PROBIT ANALYSIS *****			
	95% Confidence Limits		
Prob	***V. fluvialis* conc**	**Lower**	**Upper**
0.01	4.72912	3.3309	5.47678
0.02	5.02708	3.76547	5.71062
0.03	5.21612	4.04003	5.86014
0.04	5.35833	4.24583	5.97337
0.05	5.47401	4.41269	6.06601
0.06	5.57247	4.55426	6.14531
0.07	5.6588	4.67802	6.21522
0.08	5.7361	4.78849	6.27815
0.09	5.8064	4.88866	6.33569
0.10	5.87111	4.98059	6.38892
0.15	6.13904	5.35787	6.61267
0.20	6.35197	5.65282	6.7954
0.25	6.53465	5.90126	6.95677
0.30	6.6987	6.11975	7.1063
0.35	6.85072	6.31743	7.24964
0.40	6.99497	6.49997	7.3907
0.45	7.13454	6.67122	7.53253
0.50	7.27189	6.83406	7.6778
0.55	7.40924	6.99091	7.82908
0.60	7.54881	7.14402	7.98906
0.65	7.69306	7.29579	8.16089
0.70	7.84508	7.44909	8.34861
0.75	8.00913	7.60773	8.55798

Prob	*V. fluvialis* conc	Lower	Upper
0.80	8.19181	7.77736	8.79816
0.85	8.40475	7.96756	9.08564
0.90	8.67267	8.19818	9.45604
0.91	8.73738	8.25274	9.54665
0.92	8.80768	8.3116	9.64549
0.93	8.88498	8.37585	9.75464
0.94	8.97131	8.4471	9.87706
0.95	9.06977	8.52777	10.01727
0.96	9.18545	8.62183	10.18271
0.97	9.32766	8.73654	10.38702
0.98	9.51671	8.88772	10.65993
0.99	9.81467	9.12357	11.09248

ตารางที่ 3 ผลการหาค่า Lethal dose (LD_{50}) ของเชื้อ *V. vulnificus* โดยการคำนวณด้วยวิธี probit analysis (SPSS version 13.0)

***** PROBIT ANALYSIS *****			
	95% Confidence Limits		
Prob	***V. vulnificus* conc**	**Lower**	**Upper**
0.01	4.87425	2.82329	6.00748
0.02	5.41129	3.58682	6.4318
0.03	5.75203	4.06927	6.70299
0.04	6.00836	4.43091	6.9083
0.05	6.21686	4.72407	7.0763
0.06	6.39433	4.97278	7.22011
0.07	6.54993	5.19013	7.34693
0.08	6.68926	5.3841	7.46112
0.09	6.81597	5.55992	7.56556
0.10	6.93261	5.7212	7.66225
0.15	7.41552	6.38201	8.06954
0.20	7.79932	6.89648	8.40396
0.25	8.12858	7.32716	8.70156
0.30	8.42427	7.70279	8.97994
0.35	8.69828	8.03914	9.24963
0.40	8.95828	8.34604	9.5178
0.45	9.20983	8.63046	9.78977
0.50	9.4574	8.89796	10.06984
0.55	9.70497	9.15352	10.36185
0.60	9.95652	9.40203	10.66972
0.65	10.21652	9.64865	10.99818
0.70	10.49053	9.89919	11.35367
0.75	10.78622	10.16097	11.74591

Prob	*V. vulnificus* conc	Lower	Upper
0.80	11.11548	10.44437	12.19078
0.85	11.49929	10.76668	12.71736
0.90	11.98219	11.16348	13.38866
0.91	12.09883	11.25821	13.55191
0.92	12.22554	11.36072	13.72966
0.93	12.36487	11.47299	13.92554
0.94	12.52047	11.5979	14.1448
0.95	12.69794	11.7398	14.39543
0.96	12.90644	11.90584	14.69055
0.97	13.16277	12.1091	15.05423
0.98	13.50351	12.37806	15.53892
0.99	14.04056	12.7997	16.30512

ภาคผนวก ฉ.

ตารางที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Oxytetracycline ตลอดระยะเวลา 7 วัน

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (วันที่ 7)	อัตราการรอดชีวิต (%)	ค่าเฉลี่ย
-ve control	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	100.00
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
	3	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
+ve control	1	10	5	3	3	3	3	3	3	30.00	33.33
	2	10	5	2	2	2	2	2	2	20.00	
	3	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	
20	1	10	7	7	7	6	6	6	6	60.00	46.67
	2	10	4	4	4	4	4	4	4	40.00	
	3	10	4	4	4	4	4	4	4	40.00	
50	1	10	9	8	8	8	8	8	8	80.00	66.67
	2	10	7	6	6	6	6	6	6	60.00	
	3	10	6	6	6	6	6	6	6	60.00	
80	1	10	9	8	7	7	7	7	7	70.00	63.33
	2	10	8	7	7	7	7	7	7	70.00	
	3	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Sulfadimethoxine ตลอดระยะเวลา 7 วัน

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (วันที่ 7)	อัตราการรอดชีวิต (%)	ค่าเฉลี่ย
-ve control	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	100.00
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
	3	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
+ve control	1	10	6	4	3	2	2	2	2	20.00	20.00
	2	10	7	6	4	2	2	2	2	20.00	
	3	10	6	5	5	3	2	2	2	20.00	
10	1	10	5	5	3	3	2	2	2	20.00	26.67
	2	10	6	6	4	4	3	3	3	30.00	
	3	10	5	5	4	4	3	3	3	30.00	
20	1	10	5	5	5	4	4	4	4	40.00	46.67
	2	10	7	6	5	5	5	5	5	50.00	
	3	10	7	7	6	6	5	5	5	50.00	
30	1	10	5	5	4	4	4	4	4	40.00	36.67
	2	10	5	4	4	4	3	3	3	30.00	
	3	10	6	5	5	4	4	4	4	40.00	

ตารางที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Enrofloxacin ตลอดระยะเวลา 7 วัน

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (วันที่ 7)	อัตราการรอดชีวิต (%)	ค่าเฉลี่ย
-ve control	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	100.00
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
	3	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
+ve control	1	10	5	4	4	4	4	3	3	30.00	36.67
	2	10	8	8	7	6	4	4	4	40.00	
	3	10	7	6	6	5	4	4	4	40.00	
5	1	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	53.33
	2	10	6	6	6	6	6	6	6	60.00	
	3	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	
10	1	10	6	6	6	6	6	6	6	60.00	56.67
	2	10	7	6	6	6	6	6	6	60.00	
	3	10	6	6	5	5	5	5	5	50.00	
15	1	10	6	6	6	6	6	6	6	60.00	53.33
	2	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	
	3	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Tetracycline ตลอดระยะเวลา 7 วัน

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	จานวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (วันที่ 7)	อัตราการรอดชีวิต (%)	ค่าเฉลี่ย
-ve control	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	100.00
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
	3	10	10	10	10	10	10	10	10	100.00	
-ve control	1	10	4	2	2	2	2	2	2	20.00	23.33
	2	10	4	3	2	2	2	2	2	20.00	
	3	10	5	4	3	3	3	3	3	30.00	
10	1	10	4	4	4	4	4	4	4	40.00	43.33
	2	10	6	5	5	5	5	5	5	50.00	
	3	10	5	4	4	4	4	4	4	40.00	
30	1	10	5	3	3	3	3	3	3	30.00	43.33
	2	10	6	6	5	5	5	5	5	50.00	
	3	10	5	5	5	5	5	5	5	50.00	
50	1	10	4	3	3	3	3	3	3	30.00	50.00
	2	10	6	6	6	6	6	6	6	60.00	
	3	10	6	6	6	6	6	6	6	60.00	

ตารางที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของหอยเป๋าฮื้อที่รักษาด้วยยา Oxolinic acid ตลอดระยะเวลา 7 วัน

ขนาดยา (ppm)	ซ้ำที่	จำนวนหอยที่เลี้ยงเริ่มต้น	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	จำนวนหอยที่รอดชีวิตในวันที่สิ้นสุดการรักษา (วันที่ 7)	อัตราการรอดชีวิต (%)	ค่าเฉลี่ย
-ve control	1	10	10	10	10	10	10	10	10	100	100.00
	2	10	10	10	10	10	10	10	10	100	
	3	10	10	10	10	10	10	10	10	100	
+ve control	1	10	5	3	3	3	3	3	3	30	30.00
	2	10	4	3	3	3	3	3	3	30	
	3	10	5	5	4	3	3	3	3	30	
1	1	10	5	4	4	4	4	4	4	40	43.33
	2	10	4	4	4	4	4	4	4	40	
	3	10	5	5	5	5	5	5	5	50	
4	1	10	4	4	4	4	4	4	4	40	40.00
	2	10	4	4	4	4	4	4	4	40	
	3	10	5	5	5	5	4	4	4	40	
16	1	10	4	4	4	4	4	4	4	40	40.00
	2	10	4	4	4	4	4	4	4	40	
	3	10	4	4	4	4	4	4	4	40	

ภาคผนวก ช.

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำในพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ทำการสุ่มตรวจวัดตลอดระยะเวลาการทดลอง

พารามิเตอร์ (หน่วย)	ค่าเฉลี่ยที่ตรวจวัดได้ในแต่ละชุดการทดลอง														
	Oxytetracycline			Sulfadimethoxine			Enrofloxacin			Tetracycline			Oxolinic acid		
วันที่เก็บตัวอย่างน้ำ	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
1. อุณหภูมิน้ำ (°C)	28.05	27.55	27.10	28.15	27.45	27.05	28.10	27.50	27.10	28.05	27.50	27.15	28.15	27.50	27.25
2. ความเค็ม (psu)	29	30	30	30	30	31	30	31	31	30	30	31	30	30	31
3. pH	8.2	8.0	7.9	8.2	8.1	8.0	8.2	8.0	8.0	8.0	8.1	8.0	8.1	8.0	8.1
4. DO (mg/l)	5.44	5.83	6.02	5.54	5.91	6.07	5.54	5.84	6.00	5.49	5.74	5.99	5.50	5.84	6.00
5. Alkalinity (mg/l)	107	112	118	108	112	117	110	112	118	108	110	115	109	118	117
6. Nitrite (µg at N/L)	0.106	0.591	0.637	0.118	0.533	0.672	0.164	0.614	0.695	0.164	0.614	0.753	0.106	0.499	0.684
7. Nitrate (µg at N/L)	4.369	11.988	12.524	4.875	12.077	12.613	4.280	11.571	13.000	4.875	11.482	13.476	5.113	12.077	13.179
8.Ammonia (µg at N/L)	0.009	1.932	6.502	0.122	2.113	6.570	0.190	2.136	7.249	0.213	1.819	7.566	0.032	2.090	7.077
9.Phosphate (µg at P/L)	0.255	5.426	6.799	0.377	5.500	6.946	0.500	5.279	6.995	0.868	6.039	7.436	0.500	5.672	7.485

ตารางที่ 2 ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลตามประเภทการใช้ประโยชน์

พารามิเตอร์	หน่วย	วิธีการตรวจสอบ	ประเภทการใช้ประโยชน์					
			ประเภทที่ 1	ประเภทที่ 2	ประเภทที่ 3	ประเภทที่ 4	ประเภทที่ 5	ประเภทที่ 6
1.อุณหภูมิ (Temperature)	องศาเซลเซียส	1) Thermometer 2) Electrical Sensor Method	เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน 1	ไม่เปลี่ยนแปลง	เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน 1	เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นไม่เกิน 2		
2.ความเป็นกรดและด่าง (pH)	-	pH meter	7.0 - 8.5					
3.ความเค็ม (Salinity)		1) Argentometric 2) Electrical Conductivity Method 3) Density 4) Refractometer	เปลี่ยนแปลงได้ไม่เกินกว่า 10% ของค่าต่ำสุด					
4.ออกซิเจนละลาย (DO)	mg/l	1) Azide Modification Method 2) Membrane Electrode Method 3) Wrinkler Method	ไม่น้อยกว่า 4	ไม่น้อยกว่า 6	ไม่น้อยกว่า 4			
5.ไนเตรท-ไนโตรเจน (NO3-N)	ug - N/l	Cadmium Reduction Method เป็น NO2- แล้วใช้ Colorimetric Method	ไม่เกิน 20	ไม่เกิน 60				
6.ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส (PO4-P)	ug - P/l	Colorimetric Method	ไม่เกิน 15		ไม่เกิน 45	ไม่เกิน 15	ไม่เกิน 45	
7.แอมโมเนียไนโตรเจน (NH3-N)	ug - N/l	Phenol-Hypochlorite Method	ไม่เกิน 70		ไม่เกิน 100	ไม่เกิน 70		

แหล่งที่มา: ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 27 (พ.ศ. 2549) กรมควบคุมมลพิษ

ประวัตินักผู้วิจัยและคณะ

นักวิจัยหลัก :

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวทิพวรรณ ตัณฑวณิช
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Tippawan Tantawanich
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3 8199 00042 040
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** เจ้าหน้าที่บริการการศึกษา (วิจัย) P7
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)**

   สถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง 149 หมู่ 3 ตำบลท่าเทววงษ์ อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โทรศัพท์ 038-216-198 โทรสาร 038-216-350

   สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 3 ชั้น 9 แขวงวังใหม่ ถนนพญาไท เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-218-8160 โทรสาร 02-254-4259

   E-mail: tippawan.t@chula.ac.th, ttippawan.50@gmail.com
5. **ประวัติการศึกษา**

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
Asian Institute of Technology (AIT)	M.Sc.	Aquaculture and Aquatic Resources Management	2549
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วท.บ (ประมง)	ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	2545

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) สาขาวิชาการ** เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และนิเวศวิทยา
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย**

   ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   หัวหน้าโครงการวิจัย :

   โครงการวิจัย "Effect of stocking density and shelter surface area on growth and survival of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in a semi-flow through system"

   โครงการวิจัย "ประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ที่ทำให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อไทยชนิด *Haliotis asinina* LINNAEUS 1758"

   แหล่งทุน : คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบแผ่นดิน ประจำปี 2552

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

Tantawanich, T., Jongjareanjai, M. and Koeypudsa, W. 2009. Efficiency of Antibiotics Against *Vibrio* spp. Isolated from Diseased Tropical Abalone *Haliotis asinina* LINNAEAUS 1758. The 7th International Abalone Symposium 19-24 July, 2009. Napalai E room, Dusit Thani Pattaya, Chonburi, Thailand. Reference code number P-03, Proceeding page : 63.

W. Koeypudsa, M. Kitkamthorn, N. Chaitanawisuti, A. Kritsanapuntu, **T. Tantawanich** and J. Tangtrongptros. 2008. Natural Infection on Farmed Spotted Babylon (*Babylonia areolata* Link 1807). The 15th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations, FAVA & OIE Symposium 27-30 October 2008. Regency room, 4th floor, Sofitel Centara Grand & Bangkok Convention Center, Bangkok 10900, Thailand. Reference code number PC101, Proceeding pages : 137-138.

Tantawanich, T., Wenresti, G.G., Ikejima, K., Ganmanee, M. and Jarayabhand, P. 2007. Effect of stocking density and shelter surface area on growth and survival of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in a semi-flow through system. Journal of Fisheries Technology Research, Maejo University. 1(2); p 100-111.

โครงการวิจัย "ครุวิจัย-วิทยาศาสตร์ทางทะเล ปี 49-52"

แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โครงการวิจัย "การจัดทำกลยุทธ์และแนวทางการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและพืชน้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย"

แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โครงการวิจัย "ผลของความหนาแน่นและวัสดุหลบซ่อนที่มีต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเป๋าฮื้อไทย *Haliotis asinina* LINNAEUS 1758 ที่เลี้ยงในระบบการทำฟาร์มบนบกในระบบน้ำหมุนเวียนแบบกึ่งปิด"

แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

โครงการวิจัย "ครุวิจัย-วิทยาศาสตร์ทางทะเล ปี 52-53"

แหล่งทุน : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สถานภาพโครงการ : 40%

โครงการวิจัย "การศึกษาโครงสร้างประชากรของสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่ บริเวณหาดทรายเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี"

แหล่งทุน: คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบแผ่นดิน ประจำปี 2551 สถานภาพโครงการ: 95%

โครงการวิจัย "การวิจัยและพัฒนาระบบการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงพืชและสัตว์น้ำผสมผสานแบบบูรณาการบนพื้นฐานของเศรษฐกิจพอเพียงเพื่อเป็นอาชีพทางเลือกของเกษตรกรรายย่อย"

แหล่งทุน: คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบแผ่นดิน ประจำปี 2551 สถานภาพโครงการ: 80%

โครงการวิจัย "ความหลากหลายและการกระจายของฟองน้ำ เพรียงหัวหอมและปะการังอ่อน บริเวณเกาะสีชัง"

แหล่งทุน: คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบแผ่นดิน ประจำปี 2552 สถานภาพโครงการ: 80%

โครงการวิจัยย่อย "การศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของสัตว์ทะเลหน้าดินและสาหร่ายหน้าดินขนาดเล็กในบริเวณเกาะแสมสารและเกาะสีชัง" ภายใต้ชุดโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สนองพระราชดำริ

แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2553 สถานภาพโครงการ: 30%

ผู้ร่วมวิจัย :

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** ผศ.ดร.วีณา เคยพุดซา

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assist.Prof.Dr. Weena Koeypudsa

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 5200100004066

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ ระดับ 8

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)**

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn Univerisity, Bangkok 10330.

หมายเลขโทรศัพท์ 662-2518887, 662-2529575, 662-2189510, 662-2189412

หมายเลขโทรสาร 662-2518887, 662-2529575

E-mail: kweena@hotmail.com, kweena@chula.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา**

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ
Asian Institute of Technology (AIT)	D.Tech.Sc.	Aquaculture and Agriculture Resources Management	2548
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วท.ม (ประมง)	ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	2539
มหาวิทยาลัยบูรพา (มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ)	วท.บ	ชีววิทยา	2528

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

   สุขภาพสัตว์น้ำ, คุณภาพน้ำและดินในการเพาะเลี้ยง และPond dynamic

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย**

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

   วีณา เคยพุดซา, นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2532). การศึกษาคุณภาพของน้ำทะเลทางฟิสิกส์-เคมี เมื่อผ่านการเติมก๊าซโอโซนในระบบปิดแบบหมุนเวียน. ประมวลประชุมทางวิชาการเรื่องโรคใหม่ที่ทำความเสียหายในกุ้งกุลาดำ. 64-67.

วีณา เคยพุดซา และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2538). ประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อ (I_2 2.0 + PVP 0.5) ในการหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย. ข่าวสารริมบ่อ บริษัทไลฟ์สต๊อกอกรีคัลเจอรัล บิซิเนส อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ฉบับที่ 3. 2-5.

วีณา เคยพุดซา, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2539). การศึกษาการใช้วัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสในปลากะพงขาว. ประมวลประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ 23 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ 27-29 พฤศจิกายน 2539 โรงแรมเรดิสัน. 215-223.

วีณา เคยพุดซา, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (2542). การศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้ใหญ่ส่วนท้ายของตะพาบน้ำ. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 37 ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. 208-213.

วีณา เคยพุดซา. (2547). การศึกษาชนิดตะกอนดินและคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งและบ่อพักน้ำจากจังหวัดฉะเชิงเทรา. วารสารการประมง 57(3), 213-217.

Koeypudsa, Weena, Amararatne Yakupitiyage and Jirasak Tangtrongpiros. (2005). The fate of chlortetracycline residues in a simulated chicken-fish integrated farming system. Aquaculture Research, 36(6), 570-577.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

Tangtrongpiros, Jirasak and **Weena Koeypudsa**. (1989). The use of Flumiquine for treatment of bacterail infection in Giant Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) and Seabass (*Lates calcarifer*). Thai J. Vet. Med. 13(4); 181-193.

นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา**, วรพงษ์ วงษ์สำราญ, สุจิตรา แซ่ตัน และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2532). การศึกษาผลทางเชื้อแบคทีเรียของน้ำทะเลที่ผ่านก๊าซโอโซน: แนวทางการนำไปใช้ในฟาร์มเพาะฟักกุ้งกุลาดำ. ประมวลประชุมทางวิชาการ เรื่อง โรคใหม่ที่ทำความเสียหายในกุ้งกุลาดำ. 39-54.

นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา** และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2532). ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในการเพาะเลี้ยงโดยยระบบปิดผ่านก๊าซโอโซนแบบหมุนเวียน. ประมวลประชุมทางวิชาการเรื่องโรคใหม่ที่ทำความเสียหายในกุ้งกุลาดำ. 55-63.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, **วีณา เคยพุดซา**, อรัญญา พลพรพิสิฐ และ นราทิพย์ ม่วงแสง. (2534). โรคที่เกิดจากเชื้อไมโครสปอริเดียนในกุ้งกุลาดำ. รายงานวิจัยประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ 18 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ 4-6 พย. 34 โรงแรมเอเชีย. 191-198.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา** และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. (2534). ผลของเบซิเตซิน เมทิลีนไดซาลิไซเลท ซิงค์เบซิเตซิน (BMD) และแอสต้าแซนทีน (AS) ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. รายงานวิจัยประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ 18 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ 4-6 พย. 34 โรงแรมเอเชีย. 201-213

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, สมภพ รุ่งสุภา, **วีณา เคยพุดซา** และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. (2534). การเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาวโดยใช้วิธีป้องกันโรคด้วยวัคซีนต้านเชื้อแบคทีเรีย I: ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย. ประมวลประชุมวิชาการเรื่องทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำครั้งที่ 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 17-18 มค. 34. 447-453.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, สมภพ รุ่งสุภา, **วีณา เคยพุดซา** และ เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. (2534). การเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาวโดยใช้วิธีป้องกันโรคด้วยวัคซีนต้านเชื้อแบคทีเรีย II: การใช้วัคซีนป้องกันโรควิบริโอซีสในลูกปลากะพงขาว. ประมวลประชุมวิชาการเรื่องทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำครั้งที่ 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 17-18 มค. 34. 454-461.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา อิศรศักดิ์ ณ อยุธยา, **วีณา เคยพุดซา** และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. (2534). คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาของน้ำทะเลรอบเกาะภูเก็ต (2533-2534). ประมวลประชุมวิชาการเรื่องการจัดการสภาวะแวดล้อมในทศวรรษหน้า. สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 21-22 พฤศจิกายน 2534. อาคารปาฐศาลา. เอกสารหมายเลข24. หน้า 1-13.

Issarasak, Nantarika, Jirasak Tangtrongpiros, **Weena Koeypudsa** and Aranya Ponpornpisit. (1992) Bacterial flora in normal *Peneaus monodon* broodstock. Proc. of International Association for Aquatic Animal Medicine 1992 Conference. Ocean Park, Hong Kong; 54-59.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ **วีณา เคยพุดซา**. (2535). โรคขาแดงในกบ. ประมวลประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ 19 ประจำปี 2535. โรงแรม สยามซิตี. 88-89.

นันทริกา โพธิปักษ์, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, **วีณา เคยพุดซา** และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. (2535). การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการกลืนทำลาย (Phagocytosis) ระหว่างยีสต์เป็นและยีสต์ตายของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ (*Peneaus monodon*) ประมวลประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่19 ประจำปี 2535. โรงแรมสยามซิตี. 108-109.

อรัญญา พลพรพิสิฐ, **วีณา เคยพุดซา** และ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2535). ค่าโลหิตวิทยาเปรียบเทียบระหว่างปลาดุกปกติและปลาดุกตัวเหลือง. วารสารโรคสัตว์น้ำ 13(1); 9-14.

ระบิล รัตนพานี และ **วีณา เคยพุดซา**. (2536). จุลกายวิภาคของโรคที่เกิดจากเชื้อวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. วารสารโรคสัตว์น้ำ 14(1); 32-39.

Tangtrongpiros, Jirasak, **Weena Koeypudsa** and Mati Nitibhon. (1993). Vaccination of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* & *C. gariepinus*) against Aeromonas infection: preliminary results. Second Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. 25-29 Oct. 1993. 92.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, ระบิล รัตนพานี, นิคม ชัยศิริ, วรา พานิชเกรียงไกร, สุมลยา กาญจนพังคะ, สุพัตรา ศรีชัยรัตน์, นันทริกา ชันซื่อ, **วีณา เคยพุดซา**, อัจฉรา ธวัชสิน, ภาณุมาศ เรือนทองดี, สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และ สมภพ รุ่งสุภา. (2537). ผลของมลภาวะแวดล้อมต่อกุ้งและปลาทะเลที่เพาะเลี้ยงที่

สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย. เทคโนโลยีชีวภาพกับความหลากหลายทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ วันที่ 8-9 กย. 37. โรงแรมรอยัลออร์คิด เชอราตัน. 2-41.

Tangtrongppiros, Jirasak, Somkiat Piyatiratitivorakul, Rabin Rattanapphanee, Nikom Chaisiri, Vara Panichkriengkrai, Sumolya Kanchanapangka, Supatra Srichairat, Nantarika Chansue, Achara Tawatsin, **Weena Koeypudsa**, Panumas Ruantongdee and Sompop Rungsupa. (1997). Effects of Methyl Parathion on Shellfish Culture Important to Economy of Thailand. Shrimp Biotechnology in Thailand. BIOTEC Publication 2/2540. 229-244.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์,นันทริกา ชันซื่อ และ**วีณา เคยพุดซา**. (2541). การศึกษาผลของฟอร์มาลิน,คอปเปอร์ซัลเฟต และมาลาไคท์กรีนในระดับต่างๆกันต่อลูกกุ้งกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) อายุ 40 วัน. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และการประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4 ประจำปี 2541 ในวาระฉลอง 50 ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. 5-7 สิงหาคม 2541. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. 117-123.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์,นันทริกา ชันซื่อ และ**วีณา เคยพุดซา**. (2541). การใช้ Oxytetracycline, Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin และ Trimethroprim & Sulfadiazine ในการป้องกันโรคในลูกกุ้งกุลาดำ. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และ การประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4 ประจำปี 2541 ในวาระฉลอง 50 ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. 5-7 สิงหาคม 2541. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. 124-131.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์,นันทริกา ชันซื่อ และ**วีณา เคยพุดซา**. (2541). การตรวจหายาออกโซลินิกแอซิดและออกซีเตตร้าซัยคลีนในเนื้อกุ้งก้ามกราม กุ้งแชบ๊วย และกุ้งกุลาดำ. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และ การประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4 ประจำปี 2541 ในวาระฉลอง 50 ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. 5-7 สิงหาคม 2541. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. 132-140.

นันทริกา ชันซื่อ,จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ**วีณา เคยพุดซา**. (2541). ความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงและสารปราบศัตรูพืชที่มีผลต่ออัตราการตายของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. ประมวลการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 และ การประชุมวิชาการบำบัดโรคสัตว์เล็ก ครั้งที่ 4 ประจำปี 2541 ในวาระฉลอง 50 ปี สัตวแพทยสมาคมฯ. 5-7 สิงหาคม 2541. ณ บางกอกคอนเวนชั่นเซนเตอร์ โรงแรมเซนทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กทม. 146-152.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ**วีณา เคยพุดซา**. (2541). การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดง ดวงขาวในกุ้งกุลาดำ ประชุมวิชาการ ครั้งที่36 ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (CD)

Tangtrongppiros, Jirasak, Nantarika Chansue and **Weena Koeypudsa**. (1998) The effect of methyl parathion on Immune response of giant black tiger shrimp (*Peneas monodon*). The First Seminar

between Japan & Thailand in Fisheries Science: Special reference to fish diseases, 9-10 November 1998 Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 125-130p.

นันทริกา ชันซื่อ, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ **วีณา เคยพุดซา,** และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (2542). พยาธิวิทยาคลินิกของปลาทองที่มีอาการของโรคท้องบวม. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 37 ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. 119-203.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, นันทริกา ชันซื่อ, **วีณา เคยพุดซา,** และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (2542). อัตรารอดของกุ้งกุลาดำในน้ำที่มีความเค็มต่ำ. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 37 ณ อาคารอินทรีย์ จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. 204-207.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ**วีณา เคยพุดซา**. (2542). การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. ประชุมวิชาการ ครั้งที่ 37 ณ อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. 233-239.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

7.4.1 การใช้ใบหูกวาง(*Terminalia catappa)* เพื่อรักษาโรคในปลากัด*(Betta splendens)*และปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)

7.4.2 ค่าทางโลหิตวิทยาและจุลพยาธิวิทยาของปลาดุกเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนในน้ำต่ำ

7.4.3 ผลของคุณภาพน้ำที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อปลา

7.4.4 โครงการสร้างระบบการจัดการเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยกระบวนการเกษตรอินทรีย์