โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดเลือกตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia*

Screening of biological control agents for controlling freshwater snails genus *Bithynia*

ชื่อนิสิต นายณัฐพงศ์ สุวรรณพงศ์ **เลขประจำตัว** 6032020523

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคัดเลือกตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia*
Screening of biological control agents for controlling freshwater snails genus *Bithynia*

นายณัฐพงศ์ สุวรรณพงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษา
อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การคัดเลือกตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia*
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นายณัฐพงศ์ สุวรรณพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

โรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthochiasis คือโรคที่มีการติดเชื้อจากการที่ท่อน้ำดีอักเสบเรื้อรัง หรืออุดตันจากไข่และตัวของพยาธิ มีสาเหตุมาจากพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ที่กระจายตัวอย่างมากในประเทศไทยและประเทศลาว โดยมีวงจรชีวิตเป็นปรสิตที่จำเพาะกับหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia* ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางชนิดแรก การควบคุมประชากรโฮสต์ตัวกลางของพยาธิ โดยใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพแทนการควบคุมโดยสารเคมี จึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยและลดโอกาสเสี่ยงการติดโรคในมนุษย์ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือเพื่อคัดเลือกตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีแนวโน้มในการก่อโรคและควบคุมปริมาณหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia* โดยเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวน้ำจืด *B. siamensis siamensis* จากแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต นำมาเลี้ยงจนกระทั่งได้ไข่ โดยสิ่งมีชีวิตที่พบในซากหอยที่ตายคือโรติเฟอร์วงศ์ Philodinidae โดยสังเกตจากลักษณะ การมี corona ที่มี cilia 2 แผ่น และซิลิเอตสกุล *Tetrahymena* โดยสังเกตจาก ร่องปาก (cytostome) อยู่ค่อนมาทางหน้าของเซลล์ จึงทำการแยกให้เหลือสายพันธุ์เดียว (monoculture) และทดสอบอาหารที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิต โดยเลี้ยงในน้ำต้มฟางที่ใส่ยีสต์ รวมไปถึงแยกสาหร่ายที่เป็นอาหารของโรติเฟอร์ โดยวิธีการ streak บน BG-11 agar medium และ เลี้ยงเพิ่มจำนวนด้วย BG-11 liquid medium ก่อนนำไป streak บน BG-11 agar medium ผลการศึกษาพบว่าพบว่าในน้ำต้มฟางโรติเฟอร์ และซิลิเอตเจริญได้ดีในน้ำต้มฟาง แต่โรติเฟอร์ไม่เจริญในสาหร่าย จากการวิเคราะห์ผลของ Kruskal Wallis test พบว่าทั้งโรติเฟอร์ และซิลิเอตในแต่ละความเข้มข้นให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม และจากการวิเคราะห์ผลของ log rank test พบว่าเฉพาะโรติเฟอร์ชุดความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร ที่มีอัตราการรอดของหอยแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ซิลิเอตแต่ละความเข้มข้นให้ผลที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยนอกจากจะใช้ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นฐานข้อมูลตัวควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมประชากรของหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia* และยังอาจจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์น้ำต่อไปได้

คำสำคัญ: ตัวควบคุมทางชีวภาพ, โรคพยาธิใบไม้ตับ, *Bithynia* sp.,

Research Title : Screening of biological control agents for controlling freshwater snails genus *Bithynia*
Student name : Mister Natthapong Suwannapong
Advisor : Dr.Krieng Kanchanawatee
Department of : Biology

Abstract

Opisthorchiasis is caused by liver fluke *Opisthorchis viverrini* lead to cholangiocarcinoma, a malignant cancer of the bile ducts *O. viverrini* is highly prevalent in Thailand and Laos. *O. viverrini* use a freshwater snail (*Bithynia goniompharus, B. funiculata* and *B. siamensis*) as the first intermediate host. The objective of this research is to screen for biological control agents which are likely to control the snail population and must be safe to use. Adult *B. siamensis siamensis* were collected from the pond in Thammasat University, Pathumthani province. The snails were cultured in laboratory until the egg masses were collected. Then the dead snails were observed for possible biocontrol agents. Rotifers (Family: Philodinidae) that have a pair of ciliated corona and ciliates (Genus: *Tetrahymena*) that have cytostome close to the anterior end were obtained from the egg masses and the shell of juvenile snail, respectively. The monocultures of the rotifers and ciliates were generated and fed by hay medium with baking yeast. Algae which are the rotifer's food was also isolated from the rotifer culture by streaking the culture directly on BG-11 agar medium or propagating the algae in BG-11 liquid medium before streaking. Results showed that in hay medium with yeast, both rotifers and ciliates were able to multiply but with algae, rotifers were not. By using the biocontrol agents for quantitative testing ability to control snails. The Kruskal Wallis test showed that both rotifers and ciliates were not significantly different among treatments. The log rank test showed that in rotifers, only 100 individuals/ml treatment significantly different form other groups while in ciliates all treatments were not significantly different. In addition to the use of this study as a database of biocontrol agents for controlling population of *Bithynia* snails, these biocontrol agents could be used as an alternative food source for aquaculture.

Keywords: Opisthorchiasis, *Bithynia* sp., biological control

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบของพระคุณอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวตี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการให้ความรู้ และการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็วลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชาโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอกราบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ ทำให้ผู้เขียนสามารถนำความรู้เหล่านั้นมาประยุกต์ใช้ในการทำโครงการครั้งนี้ได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระชัย ทิตภากร, อาจารย์ ดร.นายสัตวแพทย์ ศาสตราชัย ประสพดี และคณะแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการถ่ายทอดความรู้ในการทำโครงการครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการใน ครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ .... ก

ABSTRACT .... ข

กิตติกรรมประกาศ .... ค

สารบัญตาราง .... ช

สารบัญภาพ 1

บทที่ 1 บทนำ 2

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 2

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 3

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 4

2.1. โรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchiasis 4

2.2. พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* 4

2.3. วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* 5

2.4. หอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia* 6

2.5. การควบคุมประชากรหอย 6

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 7

3.1. การเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวน้ำจืด *B. siamensis siamensis* 7

3.2. เลี้ยงหอยในห้องปฏิบัติการ 8

3.3. คัดเลือกศัตรูทางธรรมชาติ 9

3.3.1. Rotifer 9

3.3.2. Ciliate 9

3.4. ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของศัตรูทางธรรมชาติ 9

3.4.1. Rotifer 10

3.4.2. Ciliate 10

3.5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 10

บทที่ 4 ผลการศึกษา 11

4.1. การคัดเลือกศัตรูทางธรรมชาติ 11

4.2. การเลี้ยงเพิ่มจำนวนศัตรูทางธรรมชาติ 12

4.2.1. Rotifer 12

4.2.2. Ciliate 13
4.3. ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของศัตรูทางธรรมชาติ 13
4.3.1. Rotifer 13
4.3.2. Ciliate 15
4.4. ผลทางสถิติ 17
4.4.1. Rotifer 17
4.4.2. Ciliate 19
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 22
5.1. ศัตรูทางธรรมชาติที่พบ 22
5.2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค 22
5.2.1. Kruskal Wallis test 23
5.2.2. Log rank test 23
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 25
6.1. สรุปผลการศึกษา 25
6.2. ข้อเสนอแนะ 25
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ 25
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต 25
เอกสารอ้างอิง 26
ภาษาไทย 26
ภาษาอังกฤษ 26
ภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์การทดลองของโรติเฟอร์โดยวิธี Kruskal-Wallis test 30
ภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์การทดลองของซิลิเอต โดยวิธี Kruskal-Wallis test 32
ภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์การทดลองของโรติเฟอร์ โดยวิธี Log rank test 34
ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 10 ตัวต่อมิลลิลิตร 34
ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 50 ตัวต่อมิลลิลิตร 37
ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร 40
ชุด 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 50 ตัวต่อมิลลิลิตร 43
ชุด 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร 46
ชุด 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร 49
ภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์การทดลองของซิลิเอต โดยวิธี Log rank test 52
ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร 52

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร......55
ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร......58
ชุด 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร......61
ชุด 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร......64
ชุด 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร......67

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 4-1 ผลของจำนวนหอยที่รอดต่อจำนวนโรติเฟอร์ที่ใช้ 14

ตาราง 4-2 ผลของจำนวนหอยที่รอดต่อจำนวนซิลิเอตที่ใช้.. 16

ตาราง 4-3 Kruskal Wallis test ของโรติเฟอร์... 18

ตาราง 4-4 Log rank test เปรียบเทียบระหว่างชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์ 19

ตาราง 4-5 ค่ามัธยฐาน (median) ของชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์ 19

ตาราง 4-6 Kruskal Wallis test ของซิลิเอต 20

ตาราง 4-7 Log rank test เปรียบเทียบระหว่างชุดความเข้มข้นของซิลิเอต 21

ตาราง 4-8 ค่ามัธยฐาน (median) ของชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์ 21

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 วงจรชีวิตของ *O. viverrini* 5

ภาพที่ 3-1 แผนที่มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต และแหล่งเก็บตัวอย่าง *B. siamensis siamensis* 7

ภาพที่ 3-2 ลักษณะของ *B. siamensis siamensis* 8

ภาพที่ 3-3 การเลี้ยงหอยในห้องปฏิบัติการ 8

ภาพที่ 4-1 Rotifer วงศ์ Philodinidae 11

ภาพที่ 4-2 Ciliate สกุล *Tetrahymena* 11

ภาพที่ 4-3 การเลี้ยงโรติเฟอร์ในน้ำต้มฟาง 12

ภาพที่ 4-4 BG-11 agar plate และ BG-11 liquid medium 13

ภาพที่ 4-5 การเลี้ยงซิลิเอตในน้ำต้มฟาง 13

ภาพที่ 4-6 ผลของจำนวนหอยที่รอดเฉลี่ยต่อตัวจำนวนโรติเฟอร์ที่ใช้ 15

ภาพที่ 4-7 ผลของจำนวนหอยที่รอดเฉลี่ยต่อตัวจำนวนซิลิเอตที่ใช้ 17

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

โรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchiasis คือโรคที่มีการติดเชื้อจากการที่ท่อน้ำดีเกิดการอักเสบเรื้อรัง หรืออุดตันจากไข่และตัวของพยาธิ มีสาเหตุมาจากพยาธิใบไม้ตับหลายชนิด อาทิ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งอยู่ในไฟลัม Platyhelminthes หรือหนอนตัวแบน พยาธิชนิดนี้พบการแพร่กระจายสูงในประเทศไทยและประเทศลาว โดยในประเทศไทยมักกระจายตัวในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับเริ่มต้นจากไข่ของพยาธิในอุจจาระของคนที่เป็นโรค เมื่อถูกชำระลงแหล่งน้ำ จะถูกกินเข้าไปโดยโฮสต์ตัวกลางชนิดแรก คือหอยน้ำจืด หลังจากนั้นตัวอ่อนจะพัฒนาและเข้าไปเป็นปรสิตในโฮสต์ตัวกลางชนิดที่สอง คือปลาน้ำจืด โดยโรคนี้มักเกิดจากการที่มนุษย์รับประทานปลาโดยไม่ผ่านกระบวนการทำให้สุก เช่น ปลาส้ม ปลาร้า และ ก้อยปลา (Kaewpitoon et al., 2008) การควบคุมปริมาณโฮสต์ตัวกลางของพยาธิ จึงเป็นการลดโอกาสเสี่ยงในการติดโรคในมนุษย์นั่นเอง

ในประเทศไทยพบว่า *O. viverrini* มีความจำเพาะกับหอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* (Kulsantiwong et al., 2015) ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางชนิดแรก หอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* มีรายงานพบในประเทศไทย 12 ชนิด โดยมีหอย 3 ชนิดเป็นโฮสต์ตัวกลางของ *O. viverrini* คือ *B. funiculata, B. siamensis siamensis* และ *B. siamensis goniomphalos* (Piratae, 2015) สัณฐานภายนอกของหอยน้ำจืดสกุลนี้คือ เปลือกจะมีสีเขียวมะกอกจนถึงสีน้ำตาล ตัวมีขนาดเล็ก โดย *B. funiculata* จะมีขนาดใหญ่กว่า *B. s. siamensis* และ *B. s. goniomphalos* หอยน้ำจืดสกุลนี้สามารถพบได้ตามเขื่อน คลอง หรือทุ่งนา โดยในประเทศไทย *B. funiculata* จะพบการกระจายตัวในภาคเหนือ *B. s. siamensis* จะพบการกระจายตัวในภาคกลางและภาคใต้ *B. s. goniomphalos* จะพบการกระจายตัวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Suwannatrai, et al., 2020) มีรายงานว่าอัตราการติดเชื้อของหอยน้ำจืดชนิดนี้อยู่ที่ 5.4% หรือในหอย 100 ตัว มีหอยที่มีพยาธิประมาณ 5 ตัว (Ngern-klun, et al., 2006) และมักจะพบการติดเชื้อในหอยน้ำจืดเพศผู้มากกว่าหอยน้ำจืดเพศเมียอีกด้วย (Kulsantiwong, 2017)

ศัตรูทางธรรมชาติ คือสิ่งมีชีวิตที่ช่วยควบคุมประชากรหรือลดความสามารถในการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุของความเสียหายทางเศรษฐกิจหรือส่งผลเสียต่อสุขภาพ ซึ่งประกอบไปด้วยศัตรูทางธรรมชาติที่เป็นผู้ล่า (Predator) หรือปรสิต (Parasite) โดยในสัตว์จำพวกหอยฝาเดียว (Gastropods) มักเจอศัตรูทางธรรมชาติที่เป็นปรสิตในกลุ่ม Nematode, Trematode และ Protist จากการศึกษาของ Okabe และ Shiraishi (1971) พบว่าหนอนตัวกลมชนิด *Rhabditis*

oncomelaniae สามารถก่อโรคในหอยน้ำจืดชนิด *Oncomelania nosophora* ได้ ซึ่งหอยน้ำจืดชนิดนี้เป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้เลือดและยังมีการใช้หนอนตัวแบน *Ribeiroia quadeloupensis* เป็นตัวควบคุมหอยน้ำจืดที่เป็นโฮสต์ของพยาธิใบไม้เลือดเช่นกัน (Pointier and Jourdane, 2000) รวมไปถึงการใช้โรติเฟอร์ *Rotaria rotatoria* สามารถควบคุมประชากรของหอยฝาเดียว *Biomphalaria alexandrina* ระยะไข่ ที่เป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิ *Schistosoma spindale* ที่ก่อโรคพยาธิใบไม้ในเลือด (Schistosomiasis) (Mohamed et al., 2002) นอกจากนั้นในทากบก *Deroceras reticulatum* ยังพบการก่อโรคโดย Ciliate สกุล *Tetrahymena* โดยมีแหล่งอาศัยในดินหรือแหล่งน้ำ และยังถูกใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในหอยบกอีกด้วย (Watt et al., 2019)

จากข้อมูลข้างต้น ผู้ดำเนินโครงการมีความประสงค์ในการศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคในหอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* ซึ่งเป็นโฮสต์ชนิดแรกของพยาธิใบไม้ตับ โดยใช้ศัตรูทางธรรมชาติที่มีแนวโน้มในการก่อโรคในหอยฝาเดียว โดยการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินการจัดการและควบคุมประชากรหอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* ต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- คัดเลือกตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีแนวโน้มในการก่อโรคและควบคุมปริมาณหอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางชนิดแรกของพยาธิใบไม้ตับ

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. โรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchiasis

อาการของผู้ที่ติดโรคพยาธิใบไม้ตับ มีตั้งแต่ไม่มีอาการอะไรเลย ซึ่งอาจเป็นเพราะมีจำนวนพยาธิไม่มากนัก หรืออาจมีอาการท้องอืดท้องเฟ้อเป็นครั้งคราว อาการร้อนท้อง อาการต่อมาที่พบคืออาการเบื่ออาหาร ท้องอืดมาก ตับโต และกดเจ็บบริเวณตับ (บริเวณชายโครงขวา) อาการที่รุนแรงมักพบมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง มีไข้ต่ำๆ หรือไข้สูงจนมีอาการหนาวสั่น ซึ่งมักเกิดจากอาการแทรกซ้อน เช่น ท่อทางเดินน้ำดีอุดตันจากตัวพยาธิไปอุด การอักเสบติดเชื้อของท่อทางเดินน้ำดีหรือถุงน้ำดี หรือมะเร็งของท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงที่สุด

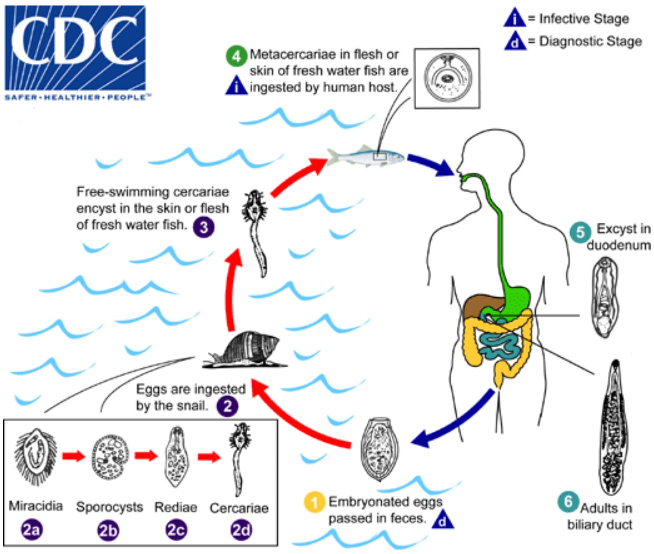
2.2. พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

พยาธิใบไม้ตับยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประมาณการว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคพยาธิใบไม้ตับไม่น้อยกว่า 6 ล้านคน นอกจากนี้แล้วยังพบว่าพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย พยาธิใบไม้ตับของคนที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ *Clonorchis sinensis* พลระบาดแถบจีน ญี่ปุ่น ฮ่องกง เกาหลี ไต้หวันและเวียดนาม *Opisthorchis felineus* พบระบาดแถบยุโรปตะวันออก เช่นไซบีเรีย และ *Opisthorchis viverrini* พบระบาดแถบประเทศไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม (IARC, 1994) ในประเทศไทยมีรายงานพบครั้งแรกโดย Leiper ในปี พ.ศ. 2454 ซึ่งได้ตรวจศพที่จังหวัดเชียงใหม่และวินิจฉัยว่าเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับชนิด *O. felineus* ต่อมาในปี พ.ศ. 2470 รายงานว่าพบพยาธิใบไม้ตับกว่า 1,000 ตัว ในท่อน้ำดีของศพชายไทย อายุ 17 ปี ซึ่งเป็นชาวจังหวัดร้อยเอ็ด (Prommas C., 1927) และให้การวินิจฉัยว่าเป็นพยาธิใบไม้ตับชนิด *O. felineus* เช่นเดียวกัน ระหว่างปี 2497-2499 Sadun ได้ทำการศึกษาและให้ข้อสรุปว่าพยาธิใบไม้ตับที่พบในประเทศไทยไม่ใช่ชนิด *O. felineus* แต่เป็น *O. viverrini* และได้รับการยืนยันอีกครั้งโดย Wykoff และคณะในปี พ.ศ. 2509 วีกิจ วีรานุวัตติ์ และจำลอง หะริณสุต ได้รายงานการสำรวจพยาธิใบไม้ตับในปี พ.ศ. 2501 พบว่าเป็นพยาธิใบไม้ตับทั่วประเทศ 22.1% โดยมีภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากที่สุด รองลงมาคือภาคเหนือ และภาคกลางคิดเป็นร้อยละ 29.8, 10.3 และ 0.3 ตามลำดับ ข้อมูลล่าสุดทั้งประเทศพบอัตราความชุกเท่ากับ 5.4% (Ngern-klun, et al., 2006) ปัจจุบันนี้มีรายงานการศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมากทั้งด้านการระบาดวิทยา พยาธิชีววิทยา ชีวโมเลกุลเกี่ยวกับพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งมีข้อมูลที่สามารถสนับสนุนและสรุปได้ว่าพยาธิใบไม้ตับเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ถึงแม้ว่าระดับอัตราความชุกของพยาธิ

ใบไม้ตับจะลดลงแต่ก็ยังพบระบาดในพื้นที่เดิมๆ และพบอัตราการป่วยด้วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงเช่นเดิม จึงถือได้ว่าพยาธิชนิดนี้มีความสำคัญและเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของไทยอย่างยิ่ง

2.3. วงจรชีวิตของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini*

ตัวเต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับ *O.viverrini* อาศัยอยู่ในท่อน้ำดีในตับของโฮสต์เฉพาะ เช่น คน สุนัข แมว นอกจากนี้ยังอาจอาศัยอยู่ในถุงน้ำดีหรือตับอ่อนได้ ไข่จะปนออกมากับน้ำดี เข้าสู่ลำไส้เล็กและปนออกมากับอุจจาระ ถ้าไข่ตกลงสู่แหล่งน้ำ หอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางลำดับที่หนึ่งกินไข่พยาธิเข้าไป ไขข่จะฟักตัวออกมาเป็นไมราซิเดียม (miracidium) แล้วเจริญต่อไปเป็นเซอร์คาเรีย (cercaria) เซอร์คาเรียจะว่ายน้ำออกจากหอยไปฝังตัวในปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางลำดับที่สอง เช่น ปลาแม่สะแด้ง ปลาตะเพียนทราย ปลาสร้อยนกเขา ปลาสูตร ปลากะมัง เป็นต้น พยาธิเจริญต่อไปเป็นระยะติดต่อคือ เมตาเซอร์คาเรีย (metacercaria) ฝังตัวในรูปซีสต์ เมื่อคนและสัตว์กินที่ปลาที่มีระยะนี้แบบสุกๆ ดิบๆ เช่น ก้อยปลา ปลาส้ม ปลาร้า เมตาเซอร์คาเรียจะแตกออกจากซีสต์มาอยู่ในลำไส้ส่วนดูโอดีนัม แล้วเดินทางผ่านเข้าสู่ท่อน้ำดีใหญ่ เดินทางต่อไปถึงท่อน้ำดีเล็กแล้วฝังตัวเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (ภาพที่ 2-1) ระยะเวลาตั้งแต่คนกินตัวอ่อนระยะติดต่อเข้าไปจนเจริญเป็นตัวเต็มวัย และตรวจพบไข่ในอุจจาระใช้เวลาประมาณ 4-8 สัปดาห์ (Wykoff et al., 1965)



ภาพที่ 2-1 วงจรชีวิตของ *O. viverrini* **ประกอบไปด้วย** ระยะไข่จากอุจจาระของมนุษย์ (1) ระยะที่อยู่ภายในหอย ***Bithynia sp.*** **(2) ระยะเซอร์คาเรียซึ่งสามารถว่ายน้ำได้ (3) ระยะเมตาเซอร์คาเรียที่อยู่ภายในตัวของปลาน้ำจืดวงศ์ Cyprinidae (4)** ระยะฝังตัวทางลำไส้เล็ก (5) และระยะตัวเต็มวัยที่อยู่ในท่อน้ำดี (6) (https://www.cdc.gov/dpdx/opisthorchiasis/index.html)

2.4. หอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia*

โดยทั่วไปแล้วหอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia* จะมีขนาดตัวที่เล็ก มีเปลือกคล้ายรูปกรวย หรือรูปไข่ มีสีน้ำตาล หรือสีมะกอก (Brandt, 1974) หอยน้ำจืดสกุล *Bithynia* มีรายงานพบในประเทศไทย 12 ชนิด โดยมีหอย 3 ชนิดเป็นโฮสต์ตัวกลางของ *O. viverrini* คือ *B. funiculata*, *B. siamensis siamensis* และ *B. siamensis goniomphalos* (Piratae, 2015)

2.5. การควบคุมประชากรหอย

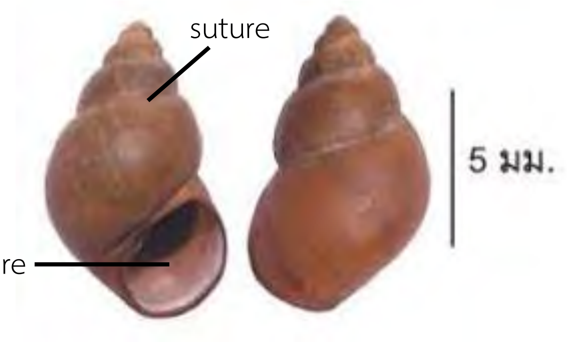
สารเคมีที่ใช้ควบคุมประชากรหอย หรือ molluscicides ถูกใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน จุดประสงค์หลักคือการตัดวงจรชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยหอยเหล่านี้เป็นโฮสต์ตัวกลาง และสามารถก่อโรคร้ายแรงในมนุษย์ได้ ซึ่งการใช้สารเคมี แม้ว่าจะส่งผลดีอย่างมากในการควบคุมประชากรหอย แต่ก็ยังมีข้อเสียในเรื่องของค่าใช้จ่ายที่สูง รวมถึงสารเคมีตกค้างที่สามารถฆ่าสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ภายในแหล่งน้ำหรือพื้นที่อาศัยเดียวกัน เช่น ปลา ที่อาจมีประโยชน์ต่อมนุษย์ จึงต้องมีการศึกษาอย่างมากในการใช้ตัวควบคุมทางธรรมชาติ (biological control agents) ที่จะส่งผลในการควบคุมประชากรเป้าหมายที่ต้องการได้มากที่สุด

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวน้ำจืด *B. siamensis siamensis*

หอยฝาเดียวน้ำจืดสกุล *Bithynia* มักอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำต่างๆ เช่น คลอง บ่อ สระน้ำ หรือนาข้าว ซึ่งจะพบอาศัยอยู่บนส่วนของใบ ลำต้นพืชน้ำ กิ่งไม้ เศษซากต่างๆ ที่อยู่ในน้ำ หรืออาจฝังตัวอยู่ไม่ลึกนักในหน้าดินที่อ่อนนุ่ม โดยได้เก็บตัวอย่างหอยฝาเดียวน้ำจืด *B. siamensis siamensis* จากแหล่งน้ำภายในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี (ภาพที่ 3-1) อาศัยการระบุชนิดจากการกระจายตัวเฉพาะในภาคกลาง และลักษณะที่เป็นหอยขนาดเล็ก โตเต็มที่ประมาณ 5 มิลลิเมตร เปลือกหอยรูปไข่ (oval) ซูเชอร์ (suture) หรือขดวนของเปลือกเป็นแบบลึก และปากเปลือก (aperture) เป็นแบบโฮโลสโตมาทัส (holostomatous) นั่นคือจะไม่มีส่วนที่ยื่นยาวเป็นช่องของไซฟอน (ชตพรรษ, 2556) (ภาพที่ 3-2) โดยเก็บตัวอย่างหอยจำนวน 300 ตัว ด้วยปากคีบ (forceps) หรือเก็บด้วยมือเปล่าโดยตรง ทำความสะอาดและนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการต่อไป

ภาพที่ 3-1 แผนที่มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต และแหล่งเก็บตัวอย่าง *B. siamensis siamensis* (จุดแดง)



ภาพที่ 3-2 ลักษณะของ *B. siamensis siamensis* เป็นหอยขนาดเล็ก โตเต็มที่ประมาณ 5 มิลลิเมตร เปลือกหอยรูปไข่ (oval) ซูเชอร์ (suture) หรือขดวนของเปลือกเป็นแบบลึก และปากเปลือก (aperture) เป็นแบบโฮโลสโตมาทัส (holostomatous) โดยไม่มีส่วนที่ยื่นยาวเป็นช่องของไซฟอน

3.2. เลี้ยงหอยในห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงหอยน้ำจืด *B. siamensis siamensis* ภายในกะละมังขนาด 40 ซม. โดยใช้น้ำ reverse osmosis (RO water) ปริมาตร 2.5 ลิตร ติดตั้งปั๊มต่อกับหัวทรายเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำ ที่อุณหภูมิประมาณ 27 °C และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารปลาเป็นแหล่งอาหารในทุกๆ 7 วัน และให้ชอร์กเป็นแหล่งแคลเซียม (ภาพที่ 3-3)

ภาพที่ 3-3 การเลี้ยงหอยในห้องปฏิบัติการ

3.3. คัดเลือกศัตรูทางธรรมชาติ

สังเกตหอยที่ตายในทุก ๆ วัน เป็นเวลา 10 วัน นำหอยที่ตายมาตรวจหาสาเหตุการตายว่าเกิดจากตัวควบคุมทางชีวภาพหรือสาเหตุอื่น โดยนำไปใส่ใน 24-wells plate ดูสิ่งมีชีวิตที่ออกมาจากซากหอยหลังจากผ่านไป 1, 2 และ 3 วัน นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงหรือกล้องจุลทรรศน์เสตอริโอ เพื่อระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในเบื้องต้น

3.3.1. Rotifer

นำมาผ่านกระบวนการ monoculture โดยแยกจากซากหอยที่ตาย จากนั้นใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 2 μl ในการแยกเพื่อให้ได้ rotifer เพียงตัวเดียว

Rotifer ที่ได้จะนำไปเลี้ยงใน hay medium (Littleford, 1960) ที่ใส่ยีสที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 มิลลิลิตร เตรียมได้จาก ฟาง 6 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ต้มจนกระทั่งน้ำเดือด หรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จากนั้นเตรียมน้ำต้มฟางที่ได้ผสมน้ำ RO อัตราส่วน 1:1 ใส่ยีสต์แล้วนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงใส่โรติเฟอร์ลงไป

แยกสาหร่ายที่เป็นอาหารของโรติเฟอร์ โดยวิธีการ streak บน BG-11 agar medium และเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่ายด้วย BG-11 liquid medium ก่อนนำไป streak บน BG-11 agar medium

เมื่อได้วิธีเลี้ยงที่เหมาะสมจะนำมา subculture เพื่อเพิ่มจำนวนในทุก 7 วัน

3.3.2. Ciliate

นำมาผ่านกระบวนการ monoculture โดยแยกจากซากหอยที่ตาย จากนั้นใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 2 μl ในการแยกเพื่อให้ได้ ciliate เพียงตัวเดียว

Ciliate ที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงในน้ำต้มฟาง หรือ hay medium (Littleford, 1960) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เตรียมได้จาก ฟาง 6 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ต้มจนกระทั่งน้ำเดือด หรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จากนั้นเตรียมน้ำต้มฟางที่ได้ผสมน้ำ RO อัตราส่วน 1:1 ใส่ยีสต์แล้วนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงใส่ซิลิเอตลงไป

เมื่อได้วิธีเลี้ยงที่เหมาะสมจะนำมา subculture เพื่อเพิ่มจำนวนในทุก 3 วัน

3.4. ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของศัตรูทางธรรมชาติ

ทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของศัตรูทางธรรมชาติที่พบโดยแบ่งหอยน้ำจืด 10 ตัวต่อ 1 หลุมใน 24-wells plate ทั้งหมด 4 หลุม นำศัตรูทางธรรมชาติที่ได้แบ่งเป็น 3 ความเข้มข้น

3.4.1. Rotifer

ทดสอบความสามารถในการควบคุมหอยระยะตัวอ่อนขนาดเล็ก (juvenile) อายุ 1-3 วันหลังฟัก โดย rotifer จะแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้นประกอบด้วย 100 ตัวต่อมิลลิลิตร, 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และ 10 ตัวต่อมิลลิลิตร นำไปใส่ในแต่ละหลุม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยมี 1 หลุมใช้เป็นชุดควบคุม (control) ทำการทดลองโดยไม่มีการให้อาหารแก่หอย นับจำนวนหอยที่ตายทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ชุด

3.4.2. Ciliate

ทดสอบความสามารถในการควรคุมหอยระยะตัวอ่อนขนาดเล็ก (juvenile) อายุ 1-3 วันหลังฟัก โดย ciliate จะแบ่งเป็น 3 ความเข้มข้นประกอบด้วย 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร, 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และ 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร นำไปใส่ในแต่ละหลุม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยมี 1 หลุมใช้เป็นชุดควบคุม (control) ทำการทดลองโดยไม่มีการให้อาหารแก่หอย นับจำนวนหอยที่ตายทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ชุด

3.5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 เพื่อตรวจสอบการกระจายของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk test ในกรณีข้อมูลมีการกระจายปกติ เลือกวิเคราะห์แบบ parametric test โดยใช้ one-way ANOVA เพื่อวิเคราะห์ผลของจำนวนหอยที่รอดต่อตัวควบคุมทางธรรมชาติที่ใช้ โดยวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม มีความเข้มข้นของตัวควบคุมทางธรรมชาติที่ใช้เป็นตัวแปรต้นและจำนวนหอยที่ตายเป็นตัวแปรตาม ในกรณีข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติ เลือกวิเคราะห์แบบ non-paramatric test โดยใช้ Kruskal-Wallis test เพื่อวิเคราะห์ผลของจำนวนหอยที่รอดต่อตัวควบคุมทางธรรมชาติที่ใช้ โดยวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มทดลองมากกว่า 2 กลุ่มในช่วงระยะเวลาการทดลอง และใช้ log rank test ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของหอยระหว่างชุดการทดลอง

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1. การคัดเลือกศัตรูทางธรรมชาติ

จากการนำหอยที่ตายใส่ใน 24-wells plate และดูสิ่งมีชีวิตที่ออกมาจากซากหอยหลังจากผ่านไป 1, 2 และ 3 วัน พบว่า ได้สิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มคือ Rotifer วงศ์ Philodinidae ระบุโดยใช้ลักษณะการมี corona ที่มี cilia 2 แผ่น (ภาพที่ 4-1) และ Ciliate สกุล *Tetrahymena* ระบุโดยใช้ลักษณะรูปทรงที่คล้ายหยดน้ำ และร่องปาก (cytostome) อยู่ค่อนมาทางหน้าของตัว (ภาพที่ 4-2) จากนั้นจึงทำการ monoculture และนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไป

ภาพที่ 4-1 Rotifer วงศ์ Philodinidae โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 500 ไมโครเมตร และลักษณะการมี corona ที่มี cilia ไว้พัดโบกอาหาร 2 แผ่นทางด้านหัว และการมีเท้า (foot) ที่มีไว้เพื่อยึดเกาะพื้นผิว

ภาพที่ 4-2 Ciliate สกุล *Tetrahymena* โดยมีรูปทรงคล้ายหยดน้ำ มี cilia รอบตัว และร่องปาก (cytostome) อยู่ค่อนมาทางด้านหัว

4.2. การเลี้ยงเพิ่มจำนวนศัตรูทางธรรมชาติ

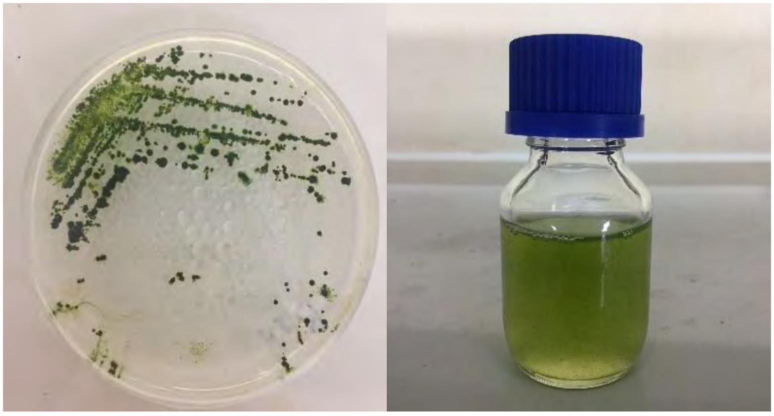
4.2.1. Rotifer

ทำการเลี้ยงโดยทดสอบ 2 วิธี

- จากการเลี้ยงโดยใช้น้ำต้มฟางที่ใส่ยีสต์ภายในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร พบว่าโรติเฟอร์สามารถเจริญได้ดี โดยจำนวนสูงสุดอยู่ที่ 200 ตัวต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-3)

ภาพที่ 4-3 การเลี้ยง rotifer ในน้ำต้มฟางปริมาตร 80 มิลลิลิตรที่ใส่ยีสต์ ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากอัตราส่วนน้ำต้มฟางต่อน้ำ RO 1:1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

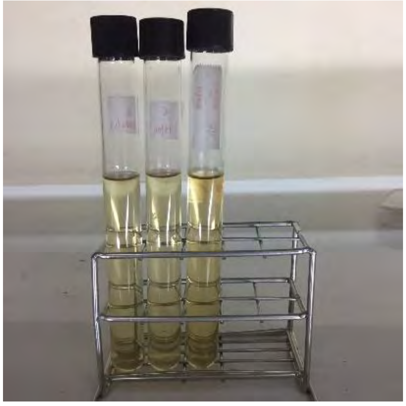
- จากการเลี้ยงโดยสาหร่ายที่เตรียมได้จากการนำน้ำที่เลี้ยงหอยไป streak บน BG-11 agar plate เพื่อแยก colony ของสาหร่าย จากนั้นจะนำไปเลี้ยงใน BG-11 liquid medium เพื่อเพิ่มจำนวน (ภาพที่ 4-4) เมื่อนำสาหร่ายที่ได้ไปใช้เพื่อเป็นอาหารโรติเฟอร์ พบว่าโรติเฟอร์มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงโดยใช้น้ำต้มฟาง



ภาพที่ 4-4 BG-11 agar plate (ซ้าย) ที่เห็นการแยกโคโลนีของสาหร่าย และ BG-11 liquid medium (ขวา) โดยเลี้ยงในขวดแก้วดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร

4.2.2. <u>Ciliate</u>

- จากการเลี้ยงโดยใช้น้ำต้มฟางที่ใส่ยีสต์ภายในหลอดทดลอง พบว่าซิลิเอตสามารถเพิ่มจำนวนได้ดี โดยจำนวนสูงสุดอยู่ที่ 20,000 ตัวต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4-5 การเลี้ยงซิลิเอตในน้ำต้มฟาง 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากอัตราส่วนน้ำต้มฟางต่อน้ำ RO 1:1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4.3. ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของศัตรูทางธรรมชาติ

4.3.1. <u>Rotifer</u>

การทดสอบครั้งที่ 1 ในชุดควบคุมมีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 9, 8, 8, 4 และ 2 ตัว ตามลำดับ ในความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 8, 7, 4 และ 1 ตัว ตามลำดับ ในความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 9, 9, 9, 3 และ 1 ตัว

ตามลำดับ และในความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในวันที่ 1, วันที่ 2, วันที่ 3 จำนวน 9, 6, และ 4 ตัวตามลำดับ และไม่เหลือหอยที่รอดในวันที่ 4

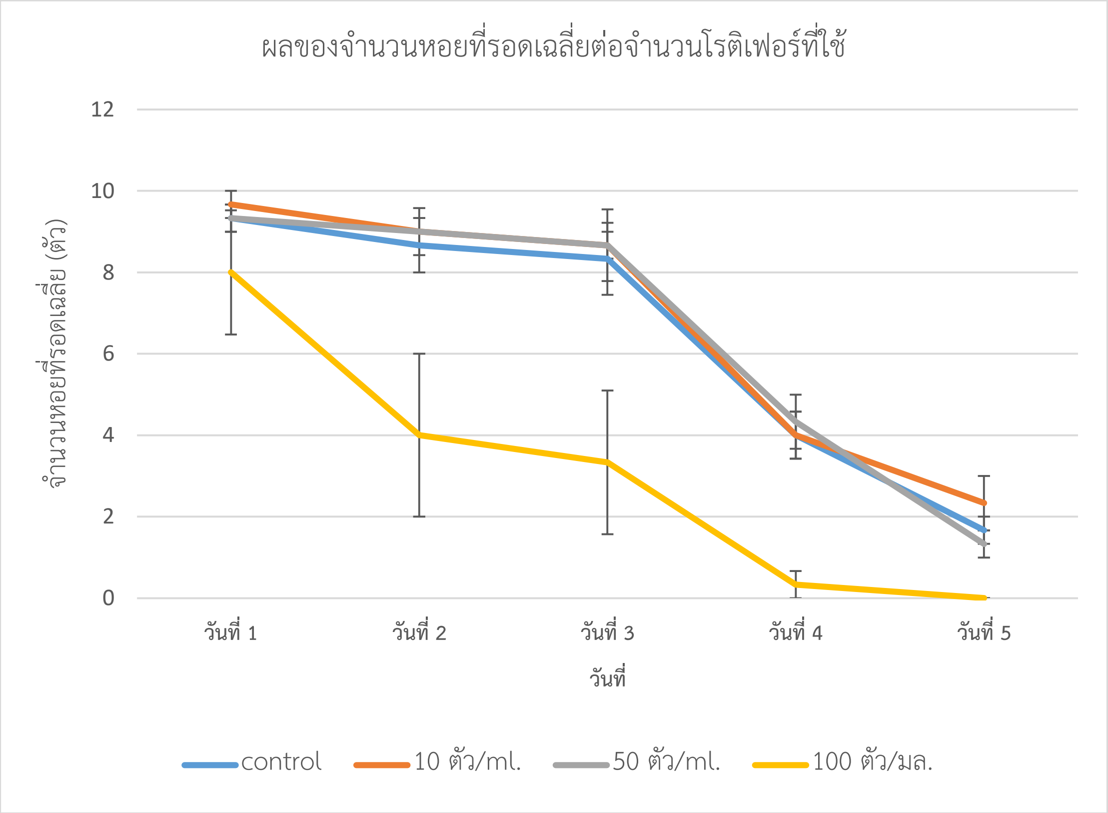
การทดสอบครั้งที่ 2 ในชุดควบคุมพบหอยที่รอดทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 5 และ 2 ตัว ตามลำดับ ในความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 9, 9, 9, 3 และ 3 ตัว ตามลำดับ ในความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 9, 9, 9, 5, และ 1 ตัว ตามลำดับ และในความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในวันที่ 1 จำนวน 5 ตัว และไม่มีหอยที่รอดในวันที่ 2

การทดสอบครั้งที่ 3 ในชุดควบคุมมีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 9, 8, 7, 3 และ 1 ตัว ตามลำดับ ในความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 5 และ 3 ตัว ตามลำดับ ในความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 9, 8, 5 และ 2 ตัว ตามลำดับ และในความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในวันที่1, วันที่ 2, วันที่ 3 และวันที่ 4 จำนวน 10, 6, 6 และ 1 ตัวตามลำดับ (ตารางที่ 4-1)

ตาราง 4-1 จำนวนหอย *B. siamensis* ที่รอดต่อจำนวนโรติเฟอร์ที่ใช้ก่อโรคที่ชุดควบคุม, ความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน

		จำนวนหอยที่รอด (ตัว)				
ครั้งที่	จำนวนศัตรูทางธรรมชาติ (ตัว/มิลลิลิตร)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
1	control	9	8	8	4	2
	10	10	8	7	4	1
	50	9	9	9	3	1
	100	9	6	4	0	0
2	control	10	10	10	5	2
	10	9	9	9	3	3
	50	9	9	9	5	1
	100	5	0	0	0	0

3	control	9	8	7	3	1
	10	10	10	10	5	3
	50	10	9	8	5	2
	100	10	6	6	1	0



ภาพที่ 4-6 จำนวนหอยที่รอดเฉลี่ยต่อจำนวนโรติเฟอร์ที่ใช้ก่อโรคที่ชุดควบคุม, ความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง error bar แสดงค่าความกระเจิงของค่าเฉลี่ย (Standard Error)

4.3.2. <u>Ciliate</u>

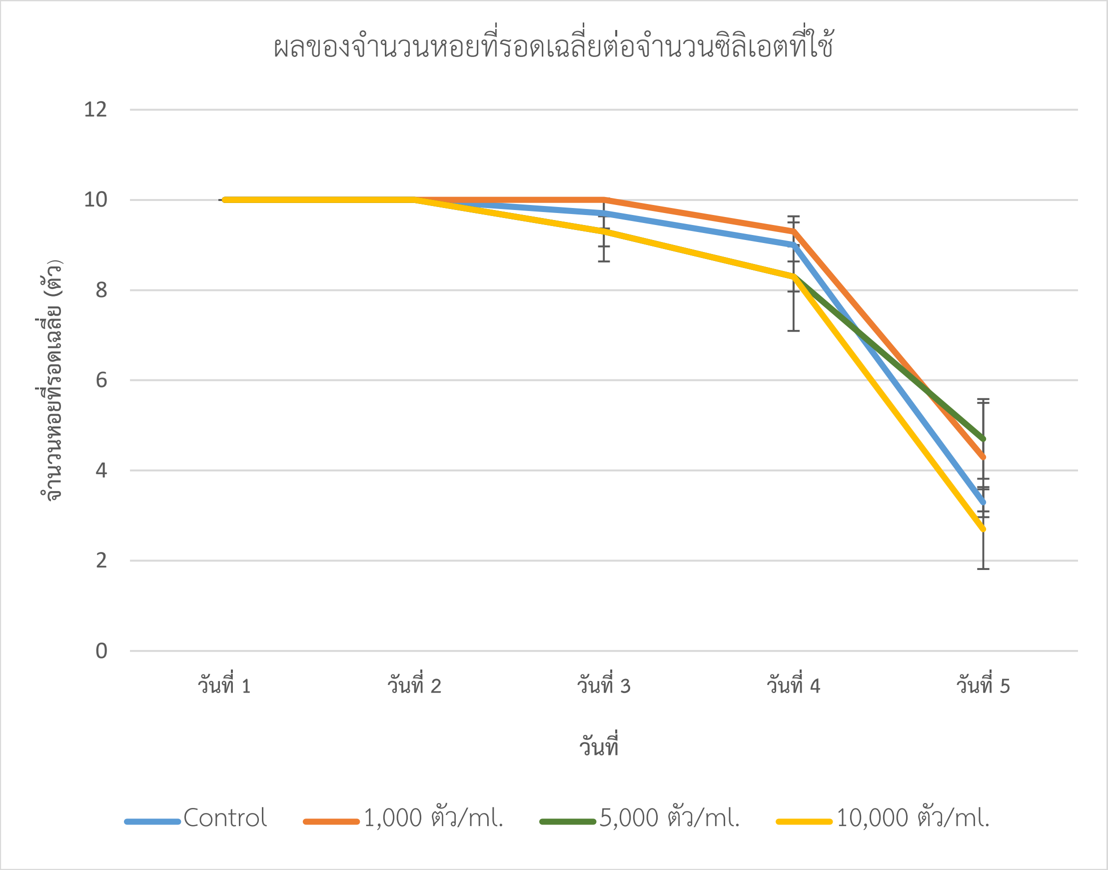
การทดสอบครั้งที่ 1 ในชุดควบคุม มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 9 และ 4 ตัวตามลำดับ ในความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 10 และ 5 ตัวตามลำดับ ในความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 8 และ 3 ตัวตามลำดับ และในความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 10 และ 4 ตัวตามลำดับ

การทดสอบครั้งที่ 2 ในชุดควบคุม มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 9 และ 3 ตัวตามลำดับ ในความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 9 และ 6 ตัวตามลำดับ ในความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 9, 8 และ 5 ตัวตามลำดับ และในความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 8, 6 และ 1 ตัวตามลำดับ

การทดสอบครั้งที่ 3 ในชุดควบคุม มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 9 และ 3 ตัวตามลำดับ ในความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 9 และ 2 ตัวตามลำดับ ในความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 9, 9 และ 6 ตัวตามลำดับ และในความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีหอยที่รอดในทุกวัน จำนวน 10, 10, 10, 9 และ 3 ตัวตามลำดับ (ตารางที่ 4-2)

ตาราง 4-2 จำนวนหอย *B. siamensis* ที่รอดต่อจำนวนซิลิเอตที่ใช้ก่อโรคที่ชุดควบคุม, ความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน

		จำนวนหอยที่รอด (ตัว)				
ครั้งที่	จำนวนศัตรูทางธรรมชาติ (ตัว/มิลลิลิตร)	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
1	control	10	10	10	9	4
	1,000	10	10	10	10	5
	5,000	10	10	10	8	3
	10,000	10	10	10	10	4
2	control	10	10	10	9	3
	1,000	10	10	10	9	6
	5,000	10	10	9	8	5
	10,000	10	10	8	6	1
3	control	10	10	9	9	3
	1,000	10	10	10	9	2
	5,000	10	10	9	9	6
	10,000	10	10	10	9	3



ภาพที่ 4-7 จำนวนหอยที่รอดเฉลี่ยต่อจำนวนซิลิเอตใช้ก่อโรคที่ชุดควบคุม, ความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง error bar แสดงการกระจายของข้อมูล

4.4. ผลทางสถิติ

4.4.1. Rotifer

เมื่อนำข้อมูลไปหาการกระจายตัวของจำนวนหอยที่รอดในแต่ละความเข้มข้น พบว่ามีการกระจายตัวไม่ปกติ เนื่องจากค่า *P* value ของทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีค่าน้อยกว่า 0.05 นั่นคือจำนวนหอยที่รอดในระยะเวลา 5 วัน มีการกระจายตัวไม่ปกติ ดังนั้น จึงใช้สถิติแบบ Non-Parametric Statistics โดยใช้ Kruskal Wallis test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง โดยประกอบไปด้วยความเข้มข้นของโรติเฟอร์ที่ใช้ และจำนวนหอยที่รอด

<u>ความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของโรติเฟอร์ที่ใช้กับจำนวนหอยที่รอดโดย Kruskal Wallis test</u>

Kruskal Wallis test เปรียบเทียบจำนวนหอยที่รอดในแต่ละชุดความเข้มข้น ในวันที่ 1 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 1.317 และ *P* value เท่ากับ 0.725 ในวันที่ 2 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 6.858 และ *P* value เท่ากับ 0.770 ในวันที่ 3 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 4.757 และ *P* value เท่ากับ 0.190 ในวันที่ 4 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 5.024 และ *P* value เท่ากับ 0.170 และในวันที่ 5 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 6.046 และ *P* value เท่ากับ 0.109 โดย *P* value ของการเปรียบเทียบชุดความเข้มข้นในทุกช่วงเวลามากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด (α = 0.05) ดังนั้นจึงยอมรับ H_0 นั่นคือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความเข้มข้นอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นในแต่ละช่วงเวลา (ตารางที่ 4-3)

ตาราง 4-3 Kruskal Wallis test เปรียบเทียบระหว่างชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์ในแต่ละช่วงเวลา

วันที่	Chi-Square	*P* value
วันที่ 1	1.317	0.725
วันที่ 2	6.858	0.770
วันที่ 3	4.757	0.190
วันที่ 4	5.024	0.170
วันที่ 5	6.046	0.109

<u>การวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดของหอยของแต่ละชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์โดย Log rank test</u>

Log rank test ในการเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของหอยระหว่างชุดควบคุม และความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.250 และ *P* value เท่ากับ 0.617, ระหว่างชุดควบคุม และความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.001 และ *P* value เท่ากับ 0.972, ระหว่างชุดควบคุม และความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 19.743 และ *P* value เท่ากับ 0.000, ระหว่างชุดความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.227 และ *P* value เท่ากับ 0.634, ระหว่างชุดความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 22.760 และ *P* value เท่ากับ 0.000 และระหว่างชุดความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 22.047 และ *P* value เท่ากับ 0.000 (ตารางที่ 4-4) ซึ่งมีเพียงการเปรียบเทียบความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตรกับความ

เข้มข้นอื่น ที่น้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด (α = 0.05) ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 นั่นคือ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของชุดควบคุม, ความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร กับ ความเข้มเข้ม 100 ตัวต่อมิลลิลิตร

ตาราง 4-4 Log rank test เปรียบเทียบระยะเวลาการอยู่รอดที่แตกต่างกันระหว่างชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์

	control	10 ตัว/ml.	50 ตัว/ml.	100 ตัว/ml.
control	0.000, 1.000	0.250, 0.617	0.001, 0.972	19.743, 0.000
10 ตัว/ml.		0.000, 1.000	0.227, 0.634	22.760, 0.000
50 ตัว/ml.			0.000, 1.000	22.047, 0.000
100 ตัว/ml.				0.000, 1.000

หมายเหตุ : Chi-Square, *P* value

ตาราง 4-5 ค่ามัธยฐาน (median) ของวันที่หอยตายในแต่ละชุดความเข้มข้นของโรติเฟอร์

	median
control	4
10 ตัวต่อมิลลิลิตร	4
50 ตัวต่อมิลลิลิตร	4
100 ตัวต่อมิลลิลิตร	2

4.4.2. Ciliate

เมื่อนำข้อมูลไปหาการกระจายตัวของจำนวนหอยที่รอดในแต่ละความเข้มข้น พบว่ามีการกระจายตัวไม่ปกติ เนื่องจากค่า *P* value ของทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีค่าน้อยกว่า 0.05 นั่นคือจำนวนหอยที่รอดในระยะเวลา 5 วัน มีการกระจายตัวไม่ปกติ ดังนั้น จึงใช้สถิติแบบ Non-Parametric Statistics โดยใช้ Kruskal Wallis test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองในแต่ละช่วงเวลาของการทดลอง โดยประกอบไปด้วยความเข้มข้นของซิลิเอตที่ใช้ และจำนวนหอยที่รอด

<u>ความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของซิลิเอตที่ใช้กับจำนวนหอยที่รอดโดย Kruskal Wallis test</u>

Kruskal Wallis test เปรียบเทียบจำนวนหอยที่รอดในแต่ละชุดความเข้มข้น ในวันที่ 1 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.000 และ *P* value เท่ากับ 1.000 ในวันที่ 2 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.000 และ *P* value เท่ากับ 1.000 ในวันที่ 3 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 2.352 และ *P* value เท่ากับ 0.503 ในวันที่ 4 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 3.039 และ *P* value เท่ากับ 0.386 และในวันที่ 5 มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 2.673 และ *P* value เท่ากับ 0.445 โดย *P* value ของการเปรียบเทียบชุดความเข้มข้นในทุกช่วงเวลามากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด (α = 0.05) ดังนั้นจึงยอมรับ H_0 นั่นคือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความเข้มข้นอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นในแต่ละช่วงเวลา (ตารางที่ 4-5)

ตาราง 4-6 Kruskal Wallis test เปรียบเทียบระหว่างชุดความเข้มข้นของซิลิเอตในแต่ละช่วงเวลา

วันที่	Chi-Square	*P* value
วันที่ 1	0.000	1.000
วันที่ 2	0.000	1.000
วันที่ 3	2.352	0.503
วันที่ 4	3.039	0.386
วันที่ 5	2.673	0.445

<u>การวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดของหอยของแต่ละชุดความเข้มข้นของซิลิเอตโดย log rank test</u>

Log rank test ในการเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของหอยระหว่างชุดควบคุม และความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.723 และ *P* value เท่ากับ 0.395, ระหว่างชุดควบคุม และความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.388 และ *P* value เท่ากับ 0.533, ระหว่างชุดควบคุม และความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.591 และ *P* value เท่ากับ 0.442, ระหว่างชุดความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 0.021 และ *P* value เท่ากับ 0.886, ระหว่างชุดความเข้มข้น 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square เท่ากับ 2.502 และ *P* value เท่ากับ 0.114 และระหว่างชุดความเข้มข้น 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่าสถิติ Chi-Square

เท่ากับ 1.650 และ *P* value เท่ากับ 0.199 (ตารางที่ 4-6) ซึ่งทุกการเปรียบเทียบมีค่า *P* value มากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด (α = 0.05) ดังนั้นจึงยอมรับ H_0 นั่นคือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการอยู่รอดของหอยในชุดควบคุม, ความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร, ความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มเข้ม 100 ตัวต่อมิลลิลิตร

ตาราง 4-7 Log rank test เปรียบเทียบระยะเวลาการอยู่รอดที่แตกต่างกันระหว่างชุดความเข้มข้นของซิลิเอต

	control	1,000 ตัว/ml.	5,000 ตัว/ml.	10,000 ตัว/ml.
control	0.000, 1.000	0.723, 0.395	0.388, 0.533	0.591, 0.442
1,000 ตัว/ml.		0.000, 1.000	0.021, 0.886	2.502, 0.114
5,000 ตัว/ml.			0.000, 1.000	1.650, 0.199
10,000 ตัว/ml.				0.000, 1.000

หมายเหตุ : Chi-Square, *P* value

ตาราง 4-8 ค่ามัธยฐาน (median) ของวันที่หอยตายในแต่ละชุดความเข้มข้นของซิลิเอต

	median
control	5
1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	5
5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	5
10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	5

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

5.1. ศัตรูทางธรรมชาติที่พบ

จากการคัดแยกไข่หอย และหอยระยะไข่ที่ตายใน 24 wells-plate และสังเกตสิ่งมีชีวิตที่ออกมาจากซากหอย พบว่า มีสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่ม คือ โรติเฟอร์ และ ซิลิเอต (ภาพที่ 5-1) อาจเป็นเพราะโรติเฟอร์สามารถพบเจอได้ในแหล่งน้ำจืดทั่วไป และสามารถใช้ส่วนเท้า (foot) ในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อของหอย ส่งผลให้หอยอ่อนแอ และตายลงได้ (Mohamed, et al., 2002) ในส่วนของซิลิเอตที่พบนั้น สามารถพบได้ทั่วไปในซึ่งอาจส่งผลแหล่งน้ำเช่นเดียวกับโรติเฟอร์ และดำรงชีวิตโดยกินแบคทีเรียในน้ำ หรือแบคทีเรียที่อยู่ในตัวหอย ส่งผลให้หอยอ่อนแอ และตายลงเช่นเดียวกัน (Watt et al., 2019) ดังนั้นจึงได้นำสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่พบนี้มาทำการทดสอบ

ในการทดลองของโรติเฟอร์ การศึกษาในครั้งนี้ต่างกับงานวิจัยของ Mohamed และคณะในปี 2002 ที่ทดลองกับหอยระยะไข่ (egg) แต่การศึกษาในครั้งนี้ได้ทดลองในหอยระยะ juvenile ที่อายุ 1-3 วันหลังฟัก เนื่องด้วยข้อจำกัดของปริมาณไข่หอยจากหอยตัวเต็มวัยที่ไม่วางไข่ รวมไปถึงเวลาในการทดลองที่ล่าช้า จึงจำเป็นที่จะต้องทดลองกับหอยระยะ juvenile ที่มีอยู่

5.2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

การศึกษาครั้งนี้พบว่าในการทดลองของโรติเฟอร์ มีอัตราการตายของหอยสูงที่สุดในชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร โดยไม่เหลือหอยที่รอดเลยในวันที่ 5 ของการทดลอง อาจเป็นเพราะโรติเฟอร์จำนวนนี้มีแนวโน้มที่สามารถควบคุมประชากรของหอยได้ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนั้นยังได้สังเกตเห็นว่าจำนวนโรติเฟอร์เพิ่มขึ้นในชุดทดลอง 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และ 50 ตัวต่อมิลลิลิตร แต่กลับมีโรติเฟอร์ที่ตาย และลดจำนวนลงในชุดทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร อาจเป็นเพราะโรติเฟอร์นั้นมีขนาดใหญ่ประมาณ 500 ไมโครเมตร จึงต้องมีจำนวนประชากรอย่างจำกัดในพื้นที่ของหลุม 24-wells plate

ส่วนในการทดลองของซิลิเอต ในวันที่ 1, 2 และ 3 มีอัตราการตายของหอยน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย แต่มีการตายมากขึ้นในวันที่ 4 และมีอัตราการตายสูงที่สุดในวันที่ 5 เหมือนกันทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม อาจเป็นเพราะ การที่หอยไม่ได้รับอาหารเลยตลอดระยะเวลาการทดลองส่งผลให้หอยที่ตายไม่ได้เกิดจากซิลิเอต แต่เกิดจากการไม่ได้รับอาหารนั่นเอง นอกจากนั้นยังได้สังเกตเห็นว่าจำนวนของซิลิเอตลดน้อยลงในทุกความเข้มข้นของวันที่ 2 ของการทดลองอีกด้วย จากนั้นจึงสังเกตเห็นการเพิ่มขึ้นของจำนวนซิลิเอตในวันที่ 4 และ 5 โดยอาจเกิดจากการที่เมื่อมีหอยที่

ตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และวันที่ 5 จะเกิดแบคทีเรียเป็นจำนวนมากในซากหอย ซิลิเอตที่สามารถดำรงชีวิตได้ด้วยแบคทีเรียจึงเพิ่มจำนวนได้ในช่วงเวลานั้น

เมื่อวิเคราะห์ผลจาก Kruskal Wallis test ที่ใช้วิเคราะห์ผลความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่มากกว่า 2 กลุ่มในแต่ละช่วงระยะเวลาการทดลอง และ log rank test ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของหอยระหว่างแต่ละชุดการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการอยู่รอดของกลุ่มที่แตกต่างกัน พบว่า

5.2.1. **Kruskal Wallis test**

ผลจาก Kruskal Wallis test พบว่าทั้งโรติเฟอร์และซิลิเอต มีการกระจายของข้อมูลที่ไม่ปกติและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความเข้มข้นอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นในแต่ละช่วงเวลา กล่าวคือทั้งชุดควบคุม และอีก 3 ความเข้มข้น ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละวัน ซึ่งขัดแย้งกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่าตัวควบคุมธรรมชาติที่ใช้สามารถก่อโรคได้ อาจเป็นเพราะในการทดลองไม่มีการให้อาหารแก่หอยเลยตลอดระยะเวลา 5 วัน รวมไปถึงอาจเกิดจากของเสียภายในอาหารเลี้ยงที่เพิ่มมากขึ้น และการที่หอยไม่สามารถดำรงชีวิตได้ในน้ำต้มฟาง ส่งผลให้มีหอยที่ตายเช่นเดียวกันทั้งในชุดควบคุม และชุดทดลอง

5.2.2. **Log rank test**

ผลของ log rank test พบว่าในโรติเฟอร์ ชุดทดลองความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีอัตราการอยู่รอดของหอยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม และชุดทดลองอื่นๆ จึงมีความเป็นได้ในการใช้ความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตรในการควบคุมปริมาณหอย และ จากผลของค่ามัธยฐาน พบว่า ชุดควบคุม, ความเข้มข้น 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 50 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 4 หรือ ค่ากลางของข้อมูลที่แบ่งข้อมูลวันที่หอยตายออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กันอยู่ในวันที่ 4 ในขณะที่ ความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร มีค่ามัธยฐานเท่ากับ 2 หรือ ค่ากลางของข้อมูลที่แบ่งข้อมูลวันที่หอยตายออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กันอยู่ในวันที่ 2 แสดงว่า ความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตร ให้ผลที่ทำให้หอยตายได้เร็วกว่าในชุดการทดลองอื่น ส่วนผลของ log rank test ในซิลิเอตพบว่าทุกชุดการทดลองมีอัตราการอยู่รอดของหอยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือซิลิเอตทุกความเข้มข้นไม่มีแนวโน้มที่สามารถจะควบคุมปริมาณหอย อาจเป็นเพราะซิลิเอตไม่สามารถเข้าไปในตัวของหอยได้ หรือซิลิเอตจำเป็นต้องดำรงชีวิตโดยแบคทีเรียที่เกิดหลังจากหอยตาย รวมไปถึงจำนวนของซิลิเอตที่ลดน้อยลงในทุกความเข้มข้น จึงไม่ส่งผลต่อการตายของหอย และจากผลของค่ามัธยฐาน พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 5 หรือค่ากลางของข้อมูลที่แบ่งข้อมูลวันที่

หอยตายออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กันอยู่ในวันที่ 5 เหมือนกัน จึงไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า พบสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มคือ โรติเฟอร์วงศ์ Philodinidae และ ซิลิเอตสกุล *Tetrahymena* สามารถเลี้ยงเพิ่มจำนวนโดยวิธีการเลี้ยงในน้ำต้มฟางที่ใส่ยีสต์ ในการทดสอบความสามารถของโรติเฟอร์และซิลิเอตในทุกความเข้มข้นให้ผลที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดทดลองในแต่ละช่วงเวลาเมื่อใช้การทดสอบทางสถิติ Kruskal Wallis test แต่ในโรติเฟอร์ความเข้มข้น 100 ตัวต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตของหอยกับความเข้นข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้การทดสอบทางสถิติ log rank test จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถควบคุมประชากรหอยฝาเดียวน้ำจืด *B. siamensis siamensis* ได้

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์</u>

ถึงแม้ว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้จะยังไม่แน่ชัดว่าสิ่งมีชีวิตที่พบจะสามารถก่อโรคได้ในหอยน้ำจืดได้จริงหรือไม่ จากการออกแบบการทดลองที่อาจจะยังไม่เหมาะสม จึงอาจใช้การทดลองในแบบอื่น เช่น วางแผนให้มีการทดลองทั้งกับไข่หอย และตัวหอย เพื่อมีผลเปรียบเทียบกัน หรือการทดสอบหาสัดส่วนของน้ำต้มฟางที่ทำให้โรติเฟอร์หรือซิลิเอตเจริญเติบโตได้ดีที่สุด นอกจากนั้นสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาจจะสามารถเป็นประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น โรติเฟอร์สามารถเป็นอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่นต่อไปได้ ซึ่งสามารถใช้การศึกษาการเลี้ยงเพิ่มจำนวนในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ได้ต่อไป

6.2.2. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต</u>

การเลือกใช้วิธีการคัดเลือกศัตรูทางธรรมชาติในแนวทางอื่นนอกจากการสังเกตสิ่งมีชีวิตที่ออกมาจากซากหอย ซึ่งอาจจะพบศัตรูทางธรรมชาติที่สามารถควบคุมประชากรหอยชนิดอื่นๆ ได้ และในการทดลองเกี่ยวกับโรติเฟอร์ควรทดลองกับระยะไข่ (egg) เพื่อให้ได้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Mohamed M. Abou Zaid และคณะ (2002) นอกจากนั้นการทดลองมีการทำซ้ำเพียง 3 ครั้งต่อศัตรูทางธรรมชาติที่พบ การศึกษาในอนาคตจึงควรจะทำการทดลองเพิ่มจำนวนซ้ำมากกว่า 3 ซ้ำ หรือมีการให้อาหารแก่หอยในการทดลอง เพื่อที่อาจจะได้ผลที่แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

ชตพรรษ ชวนประสิทธิ์. (2556). การติดเชื้อพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืด บริเวณเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ ประเทศไทย. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศิลปากร, Retrieved from http://www.sure.su.ac.th/xmlui/bitstream/handle/123456789/10176/fulltext.pdf?sequence=2&isAllowed=y

ภาษาอังกฤษ

IARC. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994.

Kaewpitoon, N., Kaewpitoon, J. S., Pengsaa, P. and Sripa, B. 2008. *Opisthorchis viverrini*: The carcinogenic human liver fluke. World Journal Gastroenterol. 14(5): 666–674.

Kulsantiwong, J., Boonmars, T., Khampoosa, P., Piratae, S., Prasopdee, S., Ruangsitichai, J., Suwannatrai, A., Tarbsripair, P., Tesana, S. and Thammasiri, C. 2015. Trematode Infection Of Freshwater Snail, Family Bithyniidae In Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 4(3): 396.

Kulsantiwong, J., Chaiyasaeng, M., Labbunruang, N. Prasopdee, S. and Tesana, S. 2017. Habitats And Trematode Infection Of *Bithynia siamensis goniomphalos* In Udon Thani Province, Thailand. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 48(5): 975.

Leiper R. T., 1911. "Notes of the occurrence of parasites presumably rare in man". J London School Trop Med, 1, 16–19.

Littleford, A. R. 1960. Culture of Protozoa in the Classroom. The American Biology Teacher. 22(9): 551-559.

Mohamed, M. S. and Tohamy, A. A. 2006. Chromosomal studies on two Egyptian fresh water snails, Cleopatra and Bithynia (Mollusca - Prosobranchiata). Arab Journal Biotech. 9(1): 17-26.

Mohamed, M. A., Fattera, R., Hanan, M. K., and Erian, G. K. 2002. Rotifers as A Possible Biological Control Agent Against *Biomphalaria Alexandjuna* Eggs. Egypt. J. Aquat. Biol & Fish. 6. 115-132.

Ngern-klun, R., Sukontason, L. K., Tesana, S., Sripakdee, D., Irvine, N. K. and Sukontason, K. 2006. Field Investigation of *Bithynia Funiculata*, Intermediate Host of *Opisthochis Viverrini* In Northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 37(4):662-72.

Nigon, V. 1943. Le déterminisme du sexe chez un nématode libre hermaphrodite (*Rhabditis elegans* Maupas). C. R. Soc. Biol. 137: 40-41.

Okabe K, Shiraishi S. 1971. Experimental Infection Of Oncomelania hupensis nosophora With Rhabditis oncomelaniae YOK00 ET OKABE. The Kurume Medical Journal. 18(4): 195-199.

Piratae, S. 2015. *Bithynia siamensis goniomphalos*, the first intermediate host of *Opisthorchis viverrini* in Thailand. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 8(10): 779-783.

Pointier, P. J. and Jourdane, J. 2000. Biological control of snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. Acta tropica. 77(1): 53-60.

Prommas, C. 1927. "Report of a case of *Opisthorchis felineus* in Siam". Ann Trop Med Parasitol, 21, 9-10.

Sadun, E. H. 1955. "Studies on *Opisthorchis viverrini* in Thailand". Am J Hyg, 62, 81–115.

Sassenhagen, I., Christaki, U., Irion, S., Moreira, D. and Jardillier, L. 2019. Protist Interactions and Community Structure During Early Autumn in the Kerguelen Region (Southern Ocean). Protist. 171(1): 125709.

Suwannatrai, K., Suwannatrai, T. A., Loukas, A. and Sotillo, J. 2020. Recent advances on the immunobiology of *Bithynia* spp. hosts of *Opisthorchis viverrini.* Developmental & Comparative Immunology. 102: 103460.

Viglierchio, R. D. and Schmitt, V. R. 1983. On the Methodology of Nematode Extraction from Field Samples: Bearmann Funnel Modifications. Journal of Nematology. 15(3): 438-444.

Viranuvatti, V. S. and Harinasuta, C. 1959. Primary carcinoma of the liver. Analysis of 90 cases. Baltimore: Willams and Wilkins, USA.

Watt, A. Haites, R., Jacope, B. H. and Young, N. 2019. The mitochondrial genome of *Tetrahymena rostrate.* Mitochondrial DNA Part B Resources. 5: 53-54.

Wilson, M., Glen, D., Rodgers, P. and Pearce, J. 1995. Monoxenic culture of the slug parasite *Phasmarhabditis Hermaphrodita* (Nematode, Rhabditidae) with different bacteria in liquid and solid-phase. Fundamental and Applied Nematology. 18(2): 159-166.

Wykoff, D. E., Harinasuta, C., Juttijudata, P. and Winn, M. M. 1965. “Opisthorchis viverrini in Thailandthe life cycle and comparison with *O. felineus*”. J Parasitol , 51, 207–214.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์จำนวนหอยที่รอดในแต่ละช่วงเวลา ในการทดลองของโรติเฟอร์ โดยวิธี Kruskal-Wallis test

Ranks

ชุดทดลอง		N	Mean rank
วันที่ 1	Control	3	6.33
	10 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.17
	50 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.33
	100 ตัว/มิลลิลิตร	3	5.17
	Total	12	
วันที่ 2	Control	3	7.17
	10 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.33
	50 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.50
	100 ตัว/มิลลิลิตร	3	2.00
	Total	12	
วันที่ 3	Control	3	6.50
	10 ตัว/มิลลิลิตร	3	7.33
	50 ตัว/มิลลิลิตร	3	7.17
	100 ตัว/มิลลิลิตร	3	1.50
	Total	12	
วันที่ 4	Control	3	6.67
	10 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.67
	50 ตัว/มิลลิลิตร	3	7.67
	100 ตัว/มิลลิลิตร	3	1.50
	Total	12	
วันที่ 5	Control	3	6.83
	10 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.50
	50 ตัว/มิลลิลิตร	3	5.67
	100 ตัว/มิลลิลิตร	3	1.50
	Total	12	

Test statistics[a,b]

	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
Chi-Square	1.317	6.858	4.757	5.024	6.046
df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	.725	.077	.190	.170	.109

a. Kruskal Wallis test

b. Grouping Variable: ชุดทดลอง

ภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์จำนวนหอยที่รอดในแต่ละช่วงเวลา ในการทดลองของซิลิเอต โดยวิธี Kruskal-Wallis test

Ranks

ชุดทดลอง		N	Mean rank
วันที่ 1	Control	3	6.50
	1,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	5,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	10,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	Total	12	
วันที่ 2	Control	3	6.50
	1,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	5,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	10,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	Total	12	
วันที่ 3	Control	3	6.67
	1,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.50
	5,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	4.83
	10,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.00
	Total	12	
วันที่ 4	Control	3	7.00
	1,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.50
	5,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	4.00
	10,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	6.50
	Total	12	
วันที่ 5	Control	3	5.50
	1,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	7.67
	5,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	8.50
	10,000 ตัว/มิลลิลิตร	3	4.33
	Total	12	

Test statistics[a,b]

	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
Chi-Square	.000	.000	2.352	3.039	2.673
df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	1.000	.077	.503	.386	.445

c. Kruskal Wallis test

d. Grouping Variable: ชุดทดลอง

ภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดของหอยเปรียบเทียบในแต่ละชุดการทดลอง ในการทดลองของโรติเฟอร์ โดยวิธี Log rank test

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 10 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
control	30	25	5	16.7%
10 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	23	7	13.3%
Overall	60	48	12	20.0%

Survival Table

1 : control 2: 10 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
1	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.933	.046	2	28
	3	2	ตาย	.	.	3	27
	4	2	ตาย	.867	.062	4	26
	5	3	ตาย	.833	.068	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.		13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14

	17	4	ตาย	.	.	17	13
	18	4	ตาย	.400	.089	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11
	20	5	ตาย	.	.	20	10
	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.	.	22	8
	23	5	ตาย	.	.	23	7
	24	5	ตาย	.	.	24	6
	25	5	ตาย	.167	.068	25	5
	26	6	รอด	.	.	25	4
	27	6	รอด	.	.	25	3
	28	6	รอด	.	.	25	2
	29	6	รอด	.	.	25	1
	30	6	รอด	.	.	25	0
2	1	1	ตาย	.967	.033	1	29
	2	2	ตาย	.	.	2	28
	3	2	ตาย	.900	.055	3	27
	4	3	ตาย	.867	.062	4	26
	5	4	ตาย	.	.	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.	.	13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.	.	17	13

18	4	ตาย	.400	.089	18	12
19	5	ตาย	.	.	19	11
20	5	ตาย	.	.	20	10
21	5	ตาย	.	.	21	9
22	5	ตาย	.	.	22	8
23	5	ตาย	.233	.077	23	7
24	6	รอด	.	.	23	6
25	6	รอด	.	.	23	5
26	6	รอด	.	.	23	4
27	6	รอด	.	.	23	3
28	6	รอด	.	.	23	2
29	6	รอด	.	.	23	1
30	6	รอด	.	.	23	0

Means and Medians for Survival Time

1 : control 2: 10 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
1	4.200	.242	3.725	4.675	4.000	.206	3.595	4.405
2	4.367	.228	3.919	4.814	4.000	.192	3.624	4.376
Overall	4.283	.167	3.956	4.610	4.000	.141	3.725	4.275

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.250	1	.617

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 50 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
control	30	25	5	16.7%
50 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	26	4	13.3%
Overall	60	51	9	15.0%

Survival Table

1 : control 3: 50 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
1	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.933	.046	2	28
	3	2	ตาย	.	.	3	27
	4	2	ตาย	.867	.062	4	26
	5	3	ตาย	.833	.068	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.		13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.	.	17	13
	18	4	ตาย	.400	.089	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11

	20	5	ตาย	.	.	20	10
	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.	.	22	8
	23	5	ตาย	.	.	23	7
	24	5	ตาย	.	.	24	6
	25	5	ตาย	.167	.068	25	5
	26	6	รอด	.	.	25	4
	27	6	รอด	.	.	25	3
	28	6	รอด	.	.	25	2
	29	6	รอด	.	.	25	1
	30	6	รอด	.	.	25	0
3	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.933	.046	2	28
	3	2	ตาย	.900	.055	3	27
	4	3	ตาย	.867	.062	4	26
	5	4	ตาย	.	.	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.	.	13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.433	.090	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11
	20	5	ตาย	.	.	20	10

21	5	ตาย	.	.	21	9
22	5	ตาย	.	.	22	8
23	5	ตาย	.	.	23	7
24	5	ตาย	.	.	24	6
25	5	ตาย	.	.	25	5
26	5	ตาย	.133	.062	26	4
27	6	รอด	.	.	26	3
28	6	รอด	.	.	26	2
29	6	รอด	.	.	26	1
30	6	รอด	.	.	26	0

Means and Medians for Survival Time

1 : control 3: 50 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
1	4.200	.242	3.725	4.675	4.000	.206	3.595	4.405
3	4.267	.226	3.824	4.709	4.000	.209	3.591	4.409
Overall	4.233	.166	3.909	4.558	4.000	.147	3.712	4.288

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.001	1	.972

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
control	30	25	5	16.7%
100 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	30	0	0%
Overall	60	55	5	8.3%

Survival Table

1 : control 4: 100 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
1	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.933	.046	2	28
	3	2	ตาย	.	.	3	27
	4	2	ตาย	.867	.062	4	26
	5	3	ตาย	.833	.068	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.		13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.	.	17	13
	18	4	ตาย	.400	.089	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11

	20	5	ตาย	.	.	20	10
	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.	.	22	8
	23	5	ตาย	.	.	23	7
	24	5	ตาย	.	.	24	6
	25	5	ตาย	.167	.068	25	5
	26	6	รอด	.	.	25	4
	27	6	รอด	.	.	25	3
	28	6	รอด	.	.	25	2
	29	6	รอด	.	.	25	1
	30	6	รอด	.	.	25	0
4	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.	.	2	28
	3	1	ตาย	.	.	3	27
	4	1	ตาย	.	.	4	26
	5	1	ตาย	.800	.073	5	25
	6	1	ตาย	.	.	6	24
	7	2	ตาย	.	.	7	23
	8	2	ตาย	.	.	8	22
	9	2	ตาย	.	.	9	21
	10	2	ตาย	.	.	10	20
	11	2	ตาย	.	.	11	19
	12	2	ตาย	.	.	12	18
	13	2	ตาย	.	.	13	17
	14	2	ตาย	.	.	14	16
	15	2	ตาย	.	.	15	15
	16	2	ตาย	.	.	16	14
	17	2	ตาย	.	.	17	13
	18	2	ตาย	.400	.089	18	12
	19	3	ตาย	.333	.086	19	11
	20	4	ตาย	.	.	20	10

21	4	ตาย	.	.	21	9
22	4	ตาย	.	.	22	8
23	4	ตาย	.	.	23	7
24	4	ตาย	.	.	24	6
25	4	ตาย	.	.	25	5
26	4	ตาย	.	.	26	4
27	4	ตาย	.	.	27	3
28	4	ตาย	.	.	28	2
29	4	ตาย	.033	.033	29	1
30	5	ตาย	.000	.000	30	0

Means and Medians for Survival Time

1 : control 4: 100 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
1	4.200	.242	3.725	4.675	4.000	.206	3.595	4.405
4	2.567	.223	2.129	3.004	2.000	.224	3.562	2.438
Overall	3.383	.194	3.002	3.765	4.000	.145	3.716	4.284

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	19.743	1	.000

ชุด 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 50 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
10 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	23	7	23.3%
50 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	26	4	13.3%
Overall	60	49	11	18.3%

Survival Table

2: 10 ตัวต่อมิลลิลิตร 3: 50 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
2	1	1	ตาย	.967	.033	1	29
	2	2	ตาย	.	.	2	28
	3	2	ตาย	.900	.055	3	27
	4	3	ตาย	.867	.062	4	26
	5	4	ตาย	.	.	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.	.	13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.	.	17	13
	18	4	ตาย	.400	.089	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11

	20	5	ตาย	.	.	20	10
	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.	.	22	8
	23	5	ตาย	.233	.077	23	7
	24	6	รอด	.	.	23	6
	25	6	รอด	.	.	23	5
	26	6	รอด	.	.	23	4
	27	6	รอด	.	.	23	3
	28	6	รอด	.	.	23	2
	29	6	รอด	.	.	23	1
	30	6	รอด	.	.	23	0
3	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.933	.046	2	28
	3	2	ตาย	.900	.055	3	27
	4	3	ตาย	.867	.062	4	26
	5	4	ตาย	.	.	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.	.	13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.433	.090	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11
	20	5	ตาย	.	.	20	10

21	5	ตาย	.	.	21	9
22	5	ตาย	.	.	22	8
23	5	ตาย	.	.	23	7
24	5	ตาย	.	.	24	6
25	5	ตาย	.	.	25	5
26	5	ตาย	.133	.062	26	4
27	6	รอด	.	.	26	3
28	6	รอด	.	.	26	2
29	6	รอด	.	.	26	1
30	6	รอด	.	.	26	0

Means and Medians for Survival Time

2 : 10 ตัวต่อมิลลิลิตร 3: 50 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
2	4.367	.228	3.919	4.814	4.000	.192	3.624	4.376
3	4.267	.226	3.824	4.709	4.000	.209	3.591	4.409
Overall	4.317	.161	4.002	4.632	4.000	.141	3.723	4.277

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.227	1	.634

ชุด 10 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
10 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	23	7	23.3%
100 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	30	0	0.0%
Overall	60	53	7	11.7%

Survival Table

2: 10 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 100 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
2	1	1	ตาย	.967	.033	1	29
	2	2	ตาย	.	.	2	28
	3	2	ตาย	.900	.055	3	27
	4	3	ตาย	.867	.062	4	26
	5	4	ตาย	.	.	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.	.	13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.	.	17	13
	18	4	ตาย	.400	.089	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11

	20	5	ตาย	.	.	20	10
	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.	.	22	8
	23	5	ตาย	.233	.077	23	7
	24	6	รอด	.	.	23	6
	25	6	รอด	.	.	23	5
	26	6	รอด	.	.	23	4
	27	6	รอด	.	.	23	3
	28	6	รอด	.	.	23	2
	29	6	รอด	.	.	23	1
	30	6	รอด	.	.	23	0
4	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.	.	2	28
	3	1	ตาย	.	.	3	27
	4	1	ตาย	.	.	4	26
	5	1	ตาย	.800	.073	5	25
	6	1	ตาย	.	.	6	24
	7	2	ตาย	.	.	7	23
	8	2	ตาย	.	.	8	22
	9	2	ตาย	.	.	9	21
	10	2	ตาย	.	.	10	20
	11	2	ตาย	.	.	11	19
	12	2	ตาย	.	.	12	18
	13	2	ตาย	.	.	13	17
	14	2	ตาย	.	.	14	16
	15	2	ตาย	.	.	15	15
	16	2	ตาย	.	.	16	14
	17	2	ตาย	.	.	17	13
	18	2	ตาย	.400	.089	18	12
	19	3	ตาย	.333	.086	19	11
	20	4	ตาย	.	.	20	10

21	4	ตาย	.	.	21	9
22	4	ตาย	.	.	22	8
23	4	ตาย	.	.	23	7
24	4	ตาย	.	.	24	6
25	4	ตาย	.	.	25	5
26	4	ตาย	.	.	26	4
27	4	ตาย	.	.	27	3
28	4	ตาย	.	.	28	2
29	4	ตาย	.033	.033	29	1
30	5	ตาย	.000	.000	30	0

Means and Medians for Survival Time

2 : 10 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 100 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
2	4.367	.228	3.919	4.814	4.000	.192	3.624	4.376
4	2.567	.223	2.129	3.004	2.000	.224	3.562	2.438
Overall	4.317	.161	4.002	4.632	4.000	.141	3.723	4.277

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.227	1	.634

ชุด 50 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 100 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
50 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	26	4	13.3%
100 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	30	0	0.0%
Overall	60	56	4	6.7%

Survival Table

3: 50 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 100 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
3	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.933	.046	2	28
	3	2	ตาย	.900	.055	3	27
	4	3	ตาย	.867	.062	4	26
	5	4	ตาย	.	.	5	25
	6	4	ตาย	.	.	6	24
	7	4	ตาย	.	.	7	23
	8	4	ตาย	.	.	8	22
	9	4	ตาย	.	.	9	21
	10	4	ตาย	.	.	10	20
	11	4	ตาย	.	.	11	19
	12	4	ตาย	.	.	12	18
	13	4	ตาย	.	.	13	17
	14	4	ตาย	.	.	14	16
	15	4	ตาย	.	.	15	15
	16	4	ตาย	.	.	16	14
	17	4	ตาย	.433	.090	17	13

	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11
	20	5	ตาย	.	.	20	10
	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.	.	22	8
	23	5	ตาย	.	.	23	7
	24	5	ตาย	.	.	24	6
	25	5	ตาย	.	.	25	5
	26	5	ตาย	.133	.062	26	4
	27	6	รอด	.	.	26	3
	28	6	รอด	.	.	26	2
	29	6	รอด	.	.	26	1
	30	6	รอด	.	.	26	0
4	1	1	ตาย	.	.	1	29
	2	1	ตาย	.	.	2	28
	3	1	ตาย	.	.	3	27
	4	1	ตาย	.	.	4	26
	5	1	ตาย	.800	.073	5	25
	6	1	ตาย	.	.	6	24
	7	2	ตาย	.	.	7	23
	8	2	ตาย	.	.	8	22
	9	2	ตาย	.	.	9	21
	10	2	ตาย	.	.	10	20
	11	2	ตาย	.	.	11	19
	12	2	ตาย	.	.	12	18
	13	2	ตาย	.	.	13	17
	14	2	ตาย	.	.	14	16
	15	2	ตาย	.	.	15	15
	16	2	ตาย	.	.	16	14
	17	2	ตาย	.	.	17	13
	18	2	ตาย	.400	.089	18	12

19	3	ตาย	.333	.086	19	11
20	4	ตาย	.	.	20	10
21	4	ตาย	.	.	21	9
22	4	ตาย	.	.	22	8
23	4	ตาย	.	.	23	7
24	4	ตาย	.	.	24	6
25	4	ตาย	.	.	25	5
26	4	ตาย	.	.	26	4
27	4	ตาย	.	.	27	3
28	4	ตาย	.	.	28	2
29	4	ตาย	.033	.033	29	1
30	5	ตาย	.000	.000	30	0

Means and Medians for Survival Time

3: 50 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 100 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
			95% Confidence interval				95% Confidence interval	
	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
3	4.267	.226	3.824	4.709	4.000	.209	3.591	4.409
4	2.567	.223	2.129	3.004	2.000	.224	3.562	2.438
Overall	3.417	.192	3.041	3.793	4.000	.149	3.708	4.292

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	22.047	1	.000

ภาคผนวกที่ 4 ข้อมูลแสดงผลการวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดของหอยเปรียบเทียบในแต่ละชุดการทดลอง ในการทดลองของซิลิเอต โดยวิธี Log rank test

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
control	30	20	10	33.3%
1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	17	13	43.3%
Overall	60	37	23	38.3%

Survival Table

1 : control 2: 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
1	1	3	ตาย	.967	.033	1	29
	2	4	ตาย	.	.	2	28
	3	4	ตาย	.900	.055	3	27
	4	5	ตาย	.	.	4	26
	5	5	ตาย	.	.	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.		13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14

	17	5	ตาย	.	.	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11
	20	5	ตาย	.333	.086	20	10
	21	6	รอด	.	.	20	9
	22	6	รอด	.	.	20	8
	23	6	รอด	.	.	20	7
	24	6	รอด	.	.	20	6
	25	6	รอด	.	.	20	5
	26	6	รอด	.	.	20	4
	27	6	รอด	.	.	20	3
	28	6	รอด	.	.	20	2
	29	6	รอด	.	.	20	1
	30	6	รอด	.	.	20	0
2	1	4	ตาย	.	.	1	29
	2	4	ตาย	.933	.046	2	28
	3	5	ตาย	.	.	3	27
	4	5	ตาย	.	.	4	26
	5	5	ตาย	.	.	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.433	.090	17	13

18	6	รอด	.	.	17	12
19	6	รอด	.	.	17	11
20	6	รอด	.	.	17	10
21	6	รอด	.	.	17	9
22	6	รอด	.	.	17	8
23	6	รอด	.	.	17	7
24	6	รอด	.	.	17	6
25	6	รอด	.	.	17	5
26	6	รอด	.	.	17	4
27	6	รอด	.	.	17	3
28	6	รอด	.	.	17	2
29	6	รอด	.	.	17	1
30	6	รอด	.	.	17	0

Means and Medians for Survival Time

1 : control 2: 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
1	5.200	.128	4.949	5.451	5.000	.152	4.702	5.298
2	5.367	.110	5.150	5.583	5.000	.181	4.645	5.355
Overall	5.283	.085	5.116	5.450	5.000	.118	4.769	5.231

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.723	1	.395

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
control	30	20	10	33.3%
5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	16	14	46.7%
Overall	60	51	9	15.0%

Survival Table

1 : control 3: 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
1	1	3	ตาย	.967	.033	1	29
	2	4	ตาย	.	.	2	28
	3	4	ตาย	.900	.055	3	27
	4	5	ตาย	.	.	4	26
	5	5	ตาย	.	.	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.		13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.	.	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11

	20	5	ตาย	.333	.086	20	10
	21	6	รอด	.	.	20	9
	22	6	รอด	.	.	20	8
	23	6	รอด	.	.	20	7
	24	6	รอด	.	.	20	6
	25	6	รอด	.	.	20	5
	26	6	รอด	.	.	20	4
	27	6	รอด	.	.	20	3
	28	6	รอด	.	.	20	2
	29	6	รอด	.	.	20	1
	30	6	รอด	.	.	20	0
3	1	3	ตาย	.	.	1	29
	2	3	ตาย	.933	.046	2	28
	3	4	ตาย	.	.	3	27
	4	4	ตาย	.	.	4	26
	5	4	ตาย	.833	.068	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	6	รอด	.467	.091	16	13
	18	6	รอด	.	.	16	12
	19	6	รอด	.	.	16	11
	20	6	รอด	.	.	16	10

21	6	รอด	.	.	16	9
22	6	รอด	.	.	16	8
23	6	รอด	.	.	16	7
24	6	รอด	.	.	16	6
25	6	รอด	.	.	16	5
26	6	รอด	.	.	16	4
27	6	รอด	.	.	16	3
28	6	รอด	.	.	16	2
29	6	รอด	.	.	16	1
30	6	รอด	.	.	16	0

Means and Medians for Survival Time

1 : control 3: 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
			95% Confidence interval				95% Confidence interval	
	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
1	5.200	.128	4.949	5.451	5.000	.152	4.702	5.298
3	5.233	.161	4.918	5.549	5.000	.	.	.
Overall	5.217	.103	5.015	5.419	5.000	.136	4.734	5.266

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.388	1	.533

ชุดควบคุม และชุดการทดลอง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
control	30	20	10	33.3%
10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	22	8	26.7%
Overall	60	42	18	30.0%

Survival Table

1 : control 4: 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
1	1	3	ตาย	.967	.033	1	29
	2	4	ตาย	.	.	2	28
	3	4	ตาย	.900	.055	3	27
	4	5	ตาย	.	.	4	26
	5	5	ตาย	.	.	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.		13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.	.	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11

	20	5	ตาย	.333	.086	20	10
	21	6	รอด	.	.	20	9
	22	6	รอด	.	.	20	8
	23	6	รอด	.	.	20	7
	24	6	รอด	.	.	20	6
	25	6	รอด	.	.	20	5
	26	6	รอด	.	.	20	4
	27	6	รอด	.	.	20	3
	28	6	รอด	.	.	20	2
	29	6	รอด	.	.	20	1
	30	6	รอด	.	.	20	0
4	1	3	ตาย	.	.	1	29
	2	3	ตาย	.933	.046	2	28
	3	4	ตาย	.	.	3	27
	4	4	ตาย	.	.	4	26
	5	4	ตาย	.833	.068	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.	.	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12
	19	5	ตาย	.	.	19	11
	20	5	ตาย	.	.	20	10

	21	5	ตาย	.	.	21	9
	22	5	ตาย	.267	.081	22	8
	23	6	รอด	.	.	22	7
	24	6	รอด	.	.	22	6
	25	6	รอด	.	.	22	5
	26	6	รอด	.	.	22	4
	27	6	รอด	.	.	22	3
	28	6	รอด	.	.	22	2
	29	6	รอด	.	.	22	1
	30	6	รอด	.	.	22	0

Means and Medians for Survival Time

1 : control 4: 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
1	5.200	.128	4.949	5.451	5.000	.152	4.702	5.298
4	5.033	.145	4.749	5.318	5.000	.142	4.721	5.279
Overall	5.117	.097	4.926	5.308	5.000	.104	4.795	5.205

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.591	1	.442

ชุด 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	17	13	43.3%
5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	16	14	46.7%
Overall	60	33	27	45.0%

Survival Table

2: 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร 3: 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
2	1	4	ตาย	.	.	1	29
	2	4	ตาย	.933	.046	2	28
	3	5	ตาย	.	.	3	27
	4	5	ตาย	.	.	4	26
	5	5	ตาย	.	.	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.433	.090	17	13
	18	6	รอด	.	.	17	12

	19	6	รอด	.	.	17	11
	20	6	รอด	.	.	17	10
	21	6	รอด	.	.	17	9
	22	6	รอด	.	.	17	8
	23	6	รอด	.	.	17	7
	24	6	รอด	.	.	17	6
	25	6	รอด	.	.	17	5
	26	6	รอด	.	.	17	4
	27	6	รอด	.	.	17	3
	28	6	รอด	.	.	17	2
	29	6	รอด	.	.	17	1
	30	6	รอด	.	.	17	0
3	1	3	ตาย	.	.	1	29
	2	3	ตาย	.933	.046	2	28
	3	4	ตาย	.	.	3	27
	4	4	ตาย	.	.	4	26
	5	4	ตาย	.833	.068	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	6	รอด	.467	.091	16	13
	18	6	รอด	.	.	16	12
	19	6	รอด	.	.	16	11

20	6	รอด	.	.	16	10
21	6	รอด	.	.	16	9
22	6	รอด	.	.	16	8
23	6	รอด	.	.	16	7
24	6	รอด	.	.	16	6
25	6	รอด	.	.	16	5
26	6	รอด	.	.	16	4
27	6	รอด	.	.	16	3
28	6	รอด	.	.	16	2
29	6	รอด	.	.	16	1
30	6	รอด	.	.	16	0

Means and Medians for Survival Time

2 : 1,000 ตัวต่อ มิลลิลิตร 3: 5,000 ตัวต่อ มิลลิลิตร	Mean				Median			
			95% Confidence interval				95% Confidence interval	
	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
2	5.367	.110	5.150	5.583	5.000	.181	4.645	5.355
3	5.233	.161	4.918	5.549	5.000	.	.	.
Overall	5.300	.098	5.108	5.492	5.000	.148	4.710	5.290

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.021	1	.886

ชุด 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	17	13	43.3%
10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	22	8	26.7%
Overall	60	39	21	35.0%

Survival Table

2: 1,000 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
2	1	4	ตาย	.	.	1	29
	2	4	ตาย	.933	.046	2	28
	3	5	ตาย	.	.	3	27
	4	5	ตาย	.	.	4	26
	5	5	ตาย	.	.	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.433	.090	17	13

	18	6	รอด	.	.	17	12
	19	6	รอด	.	.	17	11
	20	6	รอด	.	.	17	10
	21	6	รอด	.	.	17	9
	22	6	รอด	.	.	17	8
	23	6	รอด	.	.	17	7
	24	6	รอด	.	.	17	6
	25	6	รอด	.	.	17	5
	26	6	รอด	.	.	17	4
	27	6	รอด	.	.	17	3
	28	6	รอด	.	.	17	2
	29	6	รอด	.	.	17	1
	30	6	รอด	.	.	17	0
4	1	3	ตาย	.	.	1	29
	2	3	ตาย	.933	.046	2	28
	3	4	ตาย	.	.	3	27
	4	4	ตาย	.	.	4	26
	5	4	ตาย	.833	.068	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	5	ตาย	.	.	17	13
	18	5	ตาย	.	.	18	12

19	5	ตาย	.	.	19	11
20	5	ตาย	.	.	20	10
21	5	ตาย	.	.	21	9
22	5	ตาย	.267	.081	22	8
23	6	รอด	.	.	22	7
24	6	รอด	.	.	22	6
25	6	รอด	.	.	22	5
26	6	รอด	.	.	22	4
27	6	รอด	.	.	22	3
28	6	รอด	.	.	22	2
29	6	รอด	.	.	22	1
30	6	รอด	.	.	22	0

Means and Medians for Survival Time

2 : 1,000 ตัวต่อ มิลลิลิตร 4: 10,000 ตัวต่อ มิลลิลิตร	Mean				Median			
			95% Confidence interval				95% Confidence interval	
	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
2	5.367	.110	5.150	5.583	5.000	.181	4.645	5.355
4	5.033	.145	4.749	5.318	5.000	.142	4.721	5.279
Overall	5.200	.094	5.016	5.384	5.000	.115	4.774	5.226

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2.502	1	.114

ชุด 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลอง 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร

Case Processing Summary

	Total	จำนวนที่ตาย	จำนวนที่รอด	
			N	Percent
5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	16	14	46.7%
10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	30	22	8	26.7%
Overall	60	38	22	36.7%

Survival Table

3: 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร		day	status	Cumulative Proportion Surviving at the time		N of Cumulative Events	N of Remaining Cases
				Estimate	Std. Error		
3	1	3	ตาย	.	.	1	29
	2	3	ตาย	.933	.046	2	28
	3	4	ตาย	.	.	3	27
	4	4	ตาย	.	.	4	26
	5	4	ตาย	.833	.068	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16

	15	5	ตาย	.	.	15	15
	16	5	ตาย	.	.	16	14
	17	6	รอด	.467	.091	16	13
	18	6	รอด	.	.	16	12
	19	6	รอด	.	.	16	11
	20	6	รอด	.	.	16	10
	21	6	รอด	.	.	16	9
	22	6	รอด	.	.	16	8
	23	6	รอด	.	.	16	7
	24	6	รอด	.	.	16	6
	25	6	รอด	.	.	16	5
	26	6	รอด	.	.	16	4
	27	6	รอด	.	.	16	3
	28	6	รอด	.	.	16	2
	29	6	รอด	.	.	16	1
	30	6	รอด	.	.	16	0
4	1	3	ตาย	.	.	1	29
	2	3	ตาย	.933	.046	2	28
	3	4	ตาย	.	.	3	27
	4	4	ตาย	.	.	4	26
	5	4	ตาย	.833	.068	5	25
	6	5	ตาย	.	.	6	24
	7	5	ตาย	.	.	7	23
	8	5	ตาย	.	.	8	22
	9	5	ตาย	.	.	9	21
	10	5	ตาย	.	.	10	20
	11	5	ตาย	.	.	11	19
	12	5	ตาย	.	.	12	18
	13	5	ตาย	.	.	13	17
	14	5	ตาย	.	.	14	16
	15	5	ตาย	.	.	15	15

16	5	ตาย	.	.	16	14
17	5	ตาย	.	.	17	13
18	5	ตาย	.	.	18	12
19	5	ตาย	.	.	19	11
20	5	ตาย	.	.	20	10
21	5	ตาย	.	.	21	9
22	5	ตาย	.267	.081	22	8
23	6	รอด	.	.	22	7
24	6	รอด	.	.	22	6
25	6	รอด	.	.	22	5
26	6	รอด	.	.	22	4
27	6	รอด	.	.	22	3
28	6	รอด	.	.	22	2
29	6	รอด	.	.	22	1
30	6	รอด	.	.	22	0

Means and Medians for Survival Time

3: 5,000 ตัวต่อมิลลิลิตร 4: 10,000 ตัวต่อมิลลิลิตร	Mean				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
3	5.233	.161	4.918	5.549	5.000	.	.	.
4	5.033	.145	4.749	5.318	5.000	.142	4.721	5.279
Overall	5.133	.109	4.919	5.347	5.000	.133	4.739	5.261

Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	22.047	1	.000