

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การรักษาโรค epitheliocystis ที่เกิดในปลานิล วัยรุ่น ด้วย เกลือ ต่างทับทิม
ฟอร์มาลิน และ เบนซัลโคเนียมคลอไรด์

Treatment of juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus* with
epitheliocystis infection by sodium chloride, potassium permanganate,
formalin and benzalkoniumchloride



T104660

โดย

นางสาวชลดา มือนันต์

รฟ.
๕๒๒๑๗
๒๕๕๐

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 104660

วันเดือนปี..... ๕ พ.ย. ๒๕๕๐

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

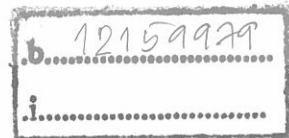
คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา ๒๕๕๑

๐



บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การรักษาโรค epitheliocystis ที่เกิดในปลานิล วัยรุ่น ด้วย เกลือ ต่างทับทิม ฟอรัมาลิน และ เบนซัลโคเนียม คลอไรด์

Treatment of juvenile Tilapia , *Oreochromis niloticus* with epitheliocystis infection by sodium chloride , potassium permanganate , formalin and benzalkonium chloride

เพื่อหาสารเคมีที่เหมาะสมในการรักษาปลานิลที่ติดเชื้อ epitheliocystis ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำปลาที่ติดโรสดังกล่าวมาทดสอบกับสารเคมีสี่ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอรัมาลิน 30 ppm เบนซัลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm และกลุ่มควบคุม ทดลองเป็นครั้งละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน และใส่สารเคมีความเข้มข้นเท่าเดิม ทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อจบการทดลอง ทำการตรวจนับจำนวนซีสต์ของเชื้อ epitheliocystis พบว่า การใช้ เกลือ ฟอรัมาลิน เบนซัลโคเนียมคลอไรด์ และ กลุ่มควบคุม มีผลทำให้จำนวนซีสต์ลดลงจากจำนวนซีสต์ก่อนการทดลอง มีค่าดังนี้ 92.53% 92.60% 89.23% และ 93.97% ตามลำดับ และพบว่าจำนวนซีสต์ของ แต่ละกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.42 ± 2.60 10.33 ± 3.54 15.03 ± 3.03 และ 8.42 ± 0.81 ตามลำดับ แต่พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนซีสต์ของการรักษาด้วยต่างทับทิมมีค่าเท่ากับ 44.40 ± 4.44 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการรักษาด้วยสารเคมีชนิดอื่นและกลุ่มควบคุม เมื่อนำเหงือกปลานิลมาวิเคราะห์ผลทางเนื้อเยื่อพบลักษณะเหงือกเกิด เลือดคั่งในซีเหงือก และมีการเพิ่มขึ้นของ epithelium cell ทำให้ secondary lamella เชื่อมติดกัน (hyperplasia) พร้อมทั้งมีเลือดคั่งในซีเหงือกและมี mucus cell เพิ่มมากขึ้นด้วย แต่ลักษณะของเหงือกที่เกิด hyperplasia นั้นพบเป็นจำนวนมาก ทั้งบริเวณที่พบซีสต์ และบริเวณที่ไม่พบซีสต์ เป็นไปได้ว่า อาจเกิดจากคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม ซึ่งการที่ปลาตายนั้นอาจเป็นเนื่องมาจาก โรค epitheliocystis และ คุณภาพน้ำ ที่มีผลร่วมกันทำให้ปลาอ่อนแอ และตายได้ ดังนั้น การปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด และการใช้เกลือหรือฟอรัมาลินก็เป็นอีกแนวทางเลือกที่ดีเพื่อใช้ในการรักษาหรือลดความรุนแรงของโรคนี้

คำนิยาม

ในการจัดทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ และอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง เป็นอย่างยิ่ง ที่คอยให้ คำปรึกษาและแนะนำ ตลอดจนวิธีการแก้ไขปัญหาในการทำงาน ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการและ เจ้าหน้าที่ทุกท่านของสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำปัญหาพิเศษและคอยให้ คำแนะนำในทุกเรื่อง ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ที่ให้ความ อนุเคราะห์ลูกปลานิลที่ทำการทดสอบขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยให้ทุนทรัพย์ในการทำงาน ขอขอบคุณนุปผา จงพัฒน์ คุณนิพนธ์ จิตตำนาน คุณนภพล เผ่าพันธ์ เจ้าหน้าที่และผู้ดูแล ห้องปฏิบัติการของภาควิชาทุกท่าน ที่ช่วยให้ทำแนะนำและเปิดห้องให้ในวันหยุด ขอขอบคุณ เพื่อนๆ น้อง ๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้จนปัญหาเสร็จลุล่วงไปด้วยดี

นางสาวชลดา มีอนันต์

มีนาคม 2551



สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------|------|
| สารบัญ | I |
| สารบัญตาราง | II |
| สารบัญภาพ | III |
| คำนำ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 18 |
| ผลการทดลองและวิจารณ์ | 22 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 30 |
| เอกสารอ้างอิง | 31 |
| ภาคผนวก | 33 |



สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|------------------|--|------|
| 1 | เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ Epitheliocystis ที่รายงานในปลาชนิดต่าง ๆ | 6 |
| 2 | อัตราการตายของปลานิลเมื่อทดสอบด้วยสารเคมี 4 ชนิด คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอर्मาลิน 30 ppm และเบนซัลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm พร้อมกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ | 27 |
| 3 | จำนวนซิสต์โรค epitheliocystis บริเวณเหงือกปลาหลังการทดลองแช่ด้วยสารเคมี 4 ชนิด คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอर्मาลิน 30 ppm และ เบนซัลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm พร้อมกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ | 28 |
| ตาราง ผนวกที่ | | หน้า |
| 1 | ค่าความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ในการวัดปริมาณแอมโมเนีย ในน้ำที่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ | 34 |
| 2 | จำนวนซิสต์ที่นับได้ในปลาแต่ละตัวของแต่ละทรีทเมนต์ | 35 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | ลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกปลา largemouth bass ที่เป็นโรค epitheliocystis พบลักษณะ granular basophilic cyst (ครรชิต) จำนวนมากในเหงือก : (a) การติดเชือรุนแรงที่เหงือก (b) แสดงซีสต์ที่มีผลให้เกิดการเชื่อมติดกัน (fusion) บริเวณ lamellar | 5 |
| 2 | แสดงรูปร่างที่มี 2 แบบของเชื้อที่อยู่ในซีสต์ พบลักษณะแกนทึบ (ครรชิต) และแกนสว่าง (หัวลูกศร) | 5 |
| 3 | เหงือกปลาที่มีการติดเชื้อและการศึกษาด้วยวิธีต่างๆ : (a) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (b) เนื้อเยื่อของเหงือกที่พบ ลักษณะของ granular basophilic cyst (c) ถ่ายด้วย SEM แสดงลักษณะที่เหงือกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (d) ถ่ายด้วย SEM แสดงลักษณะที่เหงือกที่ถูกทำลายเกิด การเชื่อมติดกัน (fusion) | 11 |
| 4 | สูตรโครงสร้างทางเคมีของ โซเดียมคลอไรด์ | 13 |
| 5 | สูตรโครงสร้างทางเคมีของ potassium permanganate, $KMnO_4$ | 14 |
| 6 | ลักษณะภายนอกของต่างทับทิม เมื่อสังเกตรด้วยตาเปล่า | 15 |
| 7 | สูตรโครงสร้างทางเคมีของ formalin | 15 |
| 8 | ลักษณะของเบนซิลโคเนียม คลอไรด์ | 17 |
| 9 | เหงือกปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis (ครรชิต) ก่อนการทดลอง ที่กำลังขยาย 10 X | 23 |
| 10 | ลักษณะซีสต์ของ epitheliocystis ที่พบในเหงือกปลานิลที่ติดเชื้อมีลักษณะกลม และวี ลีออกน้ำตาล เหลือง epitheliocystis (ครรชิต) ที่กำลังขยาย 40 X | 23 |
| 11 | ภาพเหงือกปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis ก่อนการทดลอง พบลักษณะของซีสต์ที่มีเม็ดกลม ๆ (ครรชิต) ขนาดเล็กอยู่ภายใน อัดแน่นอยู่ที่ กำลังขยาย 100 X | 24 |

ภาพที่

หน้า

- | | | |
|----|---|----|
| 12 | ภาพเหงือกปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis หลังการทดสอบด้วยสารเคมีเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ กำลังขยาย 100 X | 25 |
| 13 | ลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกปลานิล ที่เป็นโรค epitheliocystis พบลักษณะ granular basophilic cyst (ครรชี่สีดำ) ในซี่เหงือก แสดงซี่สดีที่มีผลให้เกิดการเชื่อมติดกัน hyperplasia บริเวณ lamellar และมีเลือดคั่งภายในซี่เหงือก(ครรชี่สีแดง) | 26 |
| 14 | ลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกปลานิล ที่เป็นโรค epitheliocystis พบซี่สดีติดสีน้ำเงิน และมี connective tissue (ครรชี่) บาง ๆ ล้อมรอบอยู่ที่ผนังของซี่สดี | 26 |



คำนำ

ในธุรกิจการเลี้ยงปลา ปัญหาที่มักพบอยู่เสมอคือเรื่องการเกิดโรคของสัตว์น้ำที่เลี้ยงอยู่ ซึ่งความรุนแรงของโรคนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของโรคที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ยังรวมถึงสภาพแวดล้อม และสุขภาพของเจ้าบ้านหรือสัตว์น้ำที่เลี้ยงจะเน้นการศึกษาเกี่ยวโรคชนิดใหม่และการมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการป้องกันและรักษาเป็นสิ่งสำคัญ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

โรค epitheliocystis มีรายงานครั้งแรกในปี 1920 ซึ่งพบในปลาคาร์พ และหลังจากนั้นมีรายงานว่า พบในปลามากกว่า 50 ชนิด ซึ่งเกิดขึ้นทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล และในประเทศไทยเมื่อไม่นานมานี้ พบว่ามีการตายเกิดขึ้นในสัตว์น้ำเศรษฐกิจอย่างปลานิลโดยเฉพาะในปลาขนาดเล็ก ซึ่งมีสาเหตุมาจาก โรค epitheliocystis เช่นกัน โรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ในอันดับ chlamydiales โดยลักษณะอาการของปลาที่ติดเชื้อ จะพบ การติดเชื้อในเซลล์ epithelium ของเหงือก ทำให้เซลล์ของเจ้าบ้านขยายขนาดขึ้นมีลักษณะกลมคล้ายซีสต์ และถ้าซีสต์มีจำนวนมากจะทำให้เหงือกเชื่อมติดกันและ ไปปิดกั้นการแลกเปลี่ยนก๊าซ ซึ่งมีผลต่อการหายใจและสมดุลน้ำของปลาที่ติดเชื้อ โดยเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ โรคนี้สามารถรักษาได้ผลดีที่สุดเมื่อใช้ ออกซิเตตราไซคลิน โดยปัจจัยที่มีผลในการเกิดโรคนี้ได้แก่ ความหนาแน่นในการเลี้ยง ฤดูกาล อุณหภูมิ อายุของปลา และการติดเชื้อร่วมกับปรสิตอื่นๆ

การทำปัญหาพิเศษนี้เพื่อ ให้มีความรู้ความเข้าใจในเรื่องโรค epitheliocystis ซึ่งเป็นโรคที่เพิ่งมีรายงานการพบในสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันและการรักษาโรค epitheliocystis โดยการใช้สารเคมี ซึ่งหาง่าย และไม่เกิดผลตกค้างในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม เหมือนยาปฏิชีวนะ สารเคมีที่ใช้ทดลองรักษา คือ เกลือ ต่างทับทิม เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ และ ฟอมาลิน เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ ไปใช้ประโยชน์แก่ผู้ที่เกิดปัญหาโรค epitheliocystis กับสัตว์น้ำ หรือเป็นแนวทางในการป้องกัน หรือลดความรุนแรงของโรคได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลทางเนื้อเยื่อเหงือกปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis
2. ทดสอบสารเคมีที่เหมาะสมเพื่อ การรักษาโรค epitheliocystis ที่เกิดในปลานิล ขนาด 5.44 ± 0.068 ซึ่งได้แก่ เกลือ ต่างทับทิม ฟอมาลิน และ เบนซิลโคเนียมคลอไรด์

การตรวจเอกสาร

ชีววิทยาของปลานิล

1. อนุกรมวิธานของปลานิล

| | |
|---------|-------------|
| Phylum | Chordata |
| Class | Osteichtyes |
| Order | Perciformes |
| Family | Cichilidae |
| Genus | Oreochromis |
| Species | Niloticus |

2. ความเป็นมา

ปลานิลได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอากิฮิโตะ เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ทรงจัดส่งปลานิลขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 9 เซนติเมตร จำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว ในระยะแรกพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ได้ทรงกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงในบ่อดินพื้นที่ประมาณ 10 ตารางเมตร ในบริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต หลังจากเลี้ยงได้ประมาณ 5 เดือนเศษ ปรากฏว่ามีลูกปลาเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ในวันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2508 ทรงย้ายพันธุ์ปลาด้วยพระองค์เอง จากบ่อเดิมไปปล่อยในบ่อใหม่ที่ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้เจ้าหน้าที่สวนหลวงซูด จำนวน 6 บ่อ มีเนื้อที่เฉลี่ยบ่อละ 70 ตารางเมตร ด้วยพระวิสัยทัศน์ที่กว้างไกล ทรงมีพระราชประสงค์ให้พันธุ์ปลานิลนี้แพร่ขยายพันธุ์ อันจะเป็นประโยชน์แก่พสกนิกรของพระองค์ ดังนั้นเมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2509 ได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลานิลนี้ว่า "ปลานิล" และได้พระราชทานปลานิล ขนาดความยาว 3-5 เซนติเมตร จำนวน 10,000 ตัว ให้แก่กรมประมงเพื่อนำไปขยายพันธุ์ที่แผนกทดลองและเพาะเลี้ยงในบริเวณเกษตรกลางบางเขน กรุงเทพฯ และสถานีประมงต่าง ๆ อีกจำนวน 15 แห่ง ทั้งพระราชอาณาจักร เพื่อดำเนินการขยายพันธุ์พร้อมกัน ซึ่งต่อมาปลานิลก็ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงและแพร่ขยายพันธุ์ออกไปอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งในปัจจุบันปลานิลได้เป็นพันธุ์ปลาหลักที่นำมาส่งเสริมให้ราษฎรเลี้ยง เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนอาหารโปรตีนของราษฎรในชนบท (สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดชัยภูมิ, 2004)

ปลานิลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn) เป็นพันธุ์ปลาที่มีถิ่นฐานดั้งเดิมแถบบริเวณลุ่มน้ำไนล์ ในอาฟริกาตะวันออกและบริเวณแถบลุ่มน้ำเซเนกัลและไนเจอร์ ในอาฟริกาตะวันตก ปลานิลมีลักษณะลำตัวแบนข้าง มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มี

ลายพาดขวาง 9-10 แถบ ครีบล้างมีอันเดียว ประกอบด้วยก้านครีบบ่อน 9-10 อัน มีเกล็ดบนเส้นข้าง ลำตัว 33 เกล็ด เกล็ดข้างลำตัวจากครีบล้างถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึง ส่วนหน้าของครีบก้น 13 เกล็ด ที่กระดูกแก้มมีจุดเข้มน 1 จุด

3. รูปร่างลักษณะของปลานิล

รูปร่างลักษณะของปลานิล คล้ายกับปลาหมอเทศแต่ลักษณะพิเศษของปลานิลมีดังนี้คือ ริม ฝีปากบนและล่าง เสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9-10 แถบ นอกจากนั้นลักษณะทั่วไปมีดังนี้ ครีบล้างมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบบ่อน เป็นจำนวนมาก ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบ แข็งและอ่อนเช่นกันมีเกล็ด ตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่ กระดูก แก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วน อ่อนของ ครีบล้าง ครีบก้น และครีบบางนั้นจะมีจุดสีขาว และสีดำ ตัดขวางแลดู คล้ายลายข้าวตอกอยู่ โดยทั่วไป (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2003)

โรค epitheliocystis ในปลา

โรค epitheliocystis เป็นโรคที่เกิดขึ้นในปลาซึ่งพบทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเล โดยมีรายงานว่าพบโรคนี้ ในปลามากกว่า 50 ชนิด โรคนี้จะมีผลโดยตรงกับผิวหนังและเหงือกของปลา โดยอาการจะ แสดงแบบเรื้อรัง ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคคือ แบคทีเรียแกรมลบใน อันดับ chlamydiales โดยจากการ วิจัยด้วยวิธี immunohistochemical การศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมถึงการวิเคราะห์ทางโมเลกุลด้วยเทคนิค PCR จึงสามารถยืนยันได้ว่า แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอยู่ในกลุ่ม chlamydiales จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน (transmission electron microscop , TEM) พบว่ามีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน หรือมีวงจรีตเป็นสองระยะ โดยลักษณะอาการของปลาที่ติดเชื้อ จะพบ การติดเชื้อในเซลล์ epithelium ของเหงือก ทำให้เซลล์ของเจ้าบ้านขยายขนาดขึ้นมีลักษณะกลมคล้ายชีสต์ และถ้าชีสต์มี จำนวนมากจะทำให้ซีเหงือกเชื่อมติดกันและ ไปปิดกั้นการแลกเปลี่ยนก๊าซ ซึ่งมีผลต่อการหายใจและ สมดุลน้ำของปลาที่เกิดโรค โดยเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ โรคนี้สามารถ รักษาได้ผลดีที่สุดเมื่อใช้ ออกซิเตตราไซคลิน โดยปัจจัยที่มีผลในการเกิดโรคนี้ได้แก่ ความหนาแน่น ในการเลี้ยง ฤดูกาล อุณหภูมิ อายุของปลา และการติดเชื้อร่วมกับปรสิตอื่นๆ ซึ่งจะกล่าวถึง รายละเอียดดังต่อไปนี้

สาเหตุที่ทำให้เกิดโรค

1. การจำแนกชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค

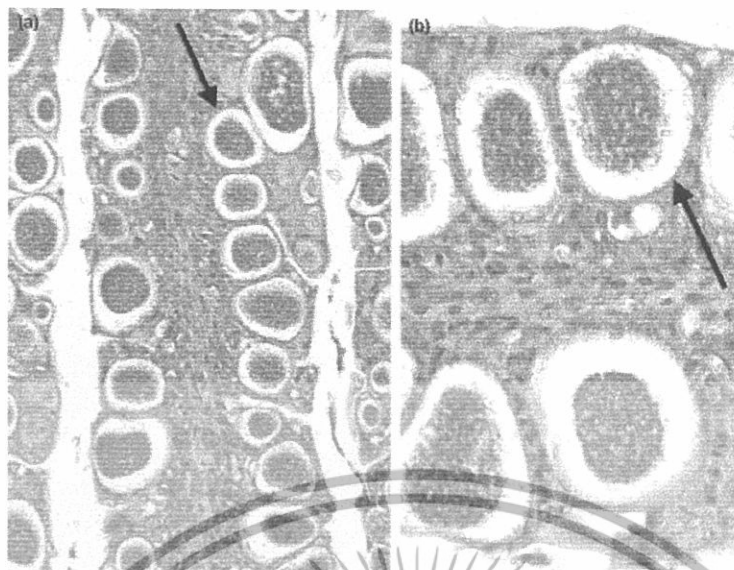
สาเหตุที่ทำให้เกิดโรค epitheliocystis เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างเหมือน Chlamydiaeae หรือ rickettsial และเมื่อจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในขอบเขตของ 16s rDNA จากวิธีวิเคราะห์ทางโมเลกุลนี้ยืนยันได้ว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเกิดจาก อันดับ Chlamydiales ครอบคลุม Chlamydiaeae (Nowak and LaPatra, 2006) และจากการทดลองของ Goodwin et al. (2005) ได้มีการพยายามหาความชัดเจน ในการจำแนกเชื้อของโรค epitheliocystis ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ immunological ซึ่งให้ผลทั้งทางบวกและลบ ในปลา Atlantic salmon และปลา *Salmo salar* จาก Norway และ Ireland ที่เป็นโรค epitheliocystis เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในปลาทั้งสองชนิดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันในกลุ่ม Chlamydia ที่พึ่งพาอาศัยแบบ endosymbiosis ใน *Acanthamoeba* spp.

2. ลักษณะของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค

ลักษณะของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค ดังที่กล่าวแล้วข้างต้นว่า เกิดจากกลุ่มของ Chlamydia ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดหนึ่ง France et al. (1997) รายงานว่าจากการนำเซลล์ที่ติดเชื้อไปวิเคราะห์ทางพยาธิสภาพ ลักษณะของเชื้อเมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าบ้านจะปรากฏซิสต์ที่ภายในมีเม็ดสีน้ำเงิน (granular basophilic cyst) ที่มีรูปร่างกลมและรี (ภาพที่ 1) ที่ล้อมรอบด้วย double trilamina membrane ที่มีขนาดไม่แน่นอน และพบ microtubules ปรากฏที่ขอบนอกของซิสต์ และ Crespo et al. (2001) ได้ทดลองนำเหงือกปลา sea bream ที่ติดเชื้อมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscop, TEM) พบว่า epitheliocystis เป็นเซลล์โพคาริโอต และมีการพัฒนารูปร่างสองแบบหรือ สองระยะในช่วงชีวิตคือ

1. รูปร่างยาวรีซึ่งรูปร่างนี้จะเป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์หรือมีการแบ่งเซลล์
2. รูปร่างกลม หรืออาจจะมีบ้างเล็กน้อย ซึ่งรูปร่างนี้ไม่ได้อยู่ในระยะของการแบ่งเซลล์ และรูปร่างนี้เองเป็นระยะที่มีการติดเชื้อ

สังเกตได้ว่าเซลล์ส่วนมากที่พบใน ซีเหงือกของปลาที่ติดเชื้อ จะมีลักษณะกลมเป็นส่วนมาก ซึ่งโครงสร้างที่กล่าวมานี้ตรงกับรายงานของ France et al. (1997) ที่ได้กล่าวถึงขนาดของซิสต์ที่พบในซีเหงือกกว่าใน สองรูปร่างที่กล่าวมานั้น รูปร่างแบบยาวหรือแบบแท่ง ภายในมีแกน 2 แบบคือ แกนทึบ (electron dense core) และ แกนสว่างที่มีลักษณะคล้ายถุง vesicle (electron lucent vesicle) (ภาพที่ 2) เมื่อวัดค่าเฉลี่ยความยาวเท่ากับ 498.17 ± 47.68 nm และความกว้างเฉลี่ย 145.14 ± 9.53 nm และตำแหน่งรอบนอกพบว่ามีรูปร่างไม่แน่นอน และไม่มีการแสดงของ แกนทึบ และ แกนสว่างที่มีถุง vesicle มีค่าเฉลี่ยความยาวเท่ากับ 704 ± 170.29 nm และความกว้างเฉลี่ย 152.4 ± 16.40 nm ส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ granular basophilic cyst ที่มีรูปร่างกลม มีค่าเท่ากับ 10 – 87 μ m



ภาพที่ 1 ลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกปลา largemouth bass ที่เป็นโรค epitheliocystis พบลักษณะ granular basophilic cyst (ครรชี่) จำนวนมากในเหงือก : (a) การติดเชื่อมแรงที่เหงือก (b) แสดง ซีสต์ที่มีผลให้เกิดการเชื่อมติดกัน (fusion) บริเวณ lamellar

ที่มา : Nowak and LaPatra (2006)



ภาพที่ 2 แสดงรูปร่างที่มี 2 แบบของเชื้อที่อยู่ภายในซีสต์ พบลักษณะแกนทึบ (ครรชี่) และแกนสว่าง (หัวลูกศร)

ที่มา : France *et al.* (1997)

ชนิดของสัตว์น้ำที่มีการติดเชื้อ

โรค epitheliocystis เกิดขึ้นในปลามากกว่า 50 ชนิด ทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเล ทั้งในปลาจากธรรมชาติ และปลาที่เพาะเลี้ยง การแพร่กระจายของ โรค จะพบในปลาเพาะเลี้ยงมากกว่าในปลาธรรมชาติ ดังตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยสูงสุดการติดเชื้อในปลาธรรมชาติมีค่า 28 % จากช่วงการติดเชื้อ 1 – 90 % และในปลาที่เพาะเลี้ยง มีค่า 73% โดยมีช่วงการติดเชื้อ 20-100 %

ในการเพาะเลี้ยงปลา yellowtail, *Seriola mazatlana* ปลา flounder, *Paralichthys adspersus* และ ปลา *Paralichthys woolmani* พบว่าปลา yellowtail ชนิดเดียวที่ติดเชื้ออย่างรุนแรง และ เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงมาก Nowak and LaPatra (2006) แนะนำว่าความรุนแรงในการติดเชื้อ epitheliocystis ที่แตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด เกี่ยวข้องกับ ชีววิทยา และสรีรวิทยาที่แตกต่างกันของปลาที่ติดเชื้อ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการติดเชื้อ epitheliocystis ที่รายงานในปลาชนิดต่าง ๆ

| ชนิดของปลา | % การติดเชื้อ (n) | แหล่งอาศัย | อ้างอิง |
|--|-------------------|-----------------|--|
| Brown bullhead, <i>Ictalurus nebulosus</i> (Lesueur) | 6 (56) | Wild freshwater | Desser <i>et al.</i> (1998) |
| American plaice, <i>Hippoglossoides platessoides</i> (Fabricius) | 20 (11) | Wild marine | Morrison and Shum (1983) |
| Atlantic cod, <i>Gadus morhua</i> L. | 34 (215) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Fourspot flounder, <i>Paralichthys oblongus</i> (Mitchill) | 27 (20) | Wild marine | |
| Ocean pout, <i>Macrozoarces americanus</i> (Bloch & Schneider) | 47 (15) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Spotted hake, <i>Urophycis regia</i> (Walbaum) | 15 (75) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Summer flounder, <i>Paralichthys dentatus</i> | 25 (209) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Weakfish, <i>Cynoscion regalis</i> (Bloch & Schneider) | 39 (59) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Windowpane, <i>Scophthalmus aquosus</i> (Mitchill) | 40 (144) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Winter flounder, <i>Pleuronectes americanus</i> (Walbaum) | 31 (950) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Yellowtail flounder, <i>Pleuronectes ferrugineus</i> (Storer) | 9 (44) | Wild marine | Lewis <i>et al.</i> (1992) |
| Red morwong, <i>Cheilodactylus fuscus</i> (Castelnau) | 12 (60) | Wild marine | Nowak (1996) |
| Rock cale, <i>Crinodus lophodon</i> (Günther) | 48 (60) | Wild marine | Nowak (1996) |

(ต่อ)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| ชนิดของปลา | % การติด เชื้อ (n) | แหล่งอาศัย | อ้างอิง |
|--|-----------------------|-------------|----------------------------|
| White ear parma, <i>Parma microlepis</i> (Günther) | 7.5 (120) | Wild marine | Tricklebank (1997) |
| Jack mackerel, <i>Trachurus declivis</i> (Jenyns) | 21 (81) | Wild marine | Nowak <i>et al.</i> (2004) |
| Chinook salmon, <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (Walbaum) | 15 (82) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Chum salmon, <i>Oncorhynchus keta</i> (Walbaum) | 91 (32) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i> (Walbaum) | 23 (48) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Pink salmon, <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (Walbaum) | 8 (12) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Pacific herring, <i>Clupea pallasii</i> (Valenciennes) | 21 (38) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Shiner perch, <i>Cymatogaster aggregata</i> (Gibbons) | 41 (32) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Pacific cod, <i>Gadus macrocephalus</i> (Tilesius) | 1 (98) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Pacific hake, <i>Merluccius productus</i> (Ayres) | 12 (25) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Walleye pollock, <i>Theragra chalcogramma</i> (Pallas) | 5 (20) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Pacific tomcod, <i>Microgadus proximus</i> (Girard) | 2.5 (40) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Lingcod, <i>Ophiodon elongatus</i> (Girard) | 14 (111) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Sablefish, <i>Anoplopoma fimbria</i> (Pallas) | 12 (33) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Canary rockfish, <i>Sebastes pinniger</i> (Gill) | 67 (12) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |

(ต่อ)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| ชนิดของปลา | % การติด เชื้อ (n) | แหล่งอาศัย | อ้างอิง |
|--|-----------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Darkblotched rockfish, <i>Sebastes crameri</i> (Jordan) | 30 (10) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Redbanded rockfish, <i>Sebastes babcocki</i> (Thompson) | 40 (10) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Redstripe rockfish, <i>Sebastes proriger</i> (Jordan & Gilbert) | 55 (31) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Rougheye rockfish, <i>Sebastes aleutianus</i> (Jordan & Evermann) | 61 (13) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Silvergrey rockfish, <i>Sebastes brevispinis</i> (Bean) | 25 (11) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Yellowtail rockfish, <i>Sebastes fladivus</i> (Ayres) | 33 (21) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Arrowtooth flounder, <i>Atheresthes stomia</i> (Jordan & Gilbert) | 27 (15) | Wild marine | Kent <i>et al.</i> (1998) |
| Greater pipefish, <i>Sygnathus acus</i> L. | 23 (30) | Wild marine | Longshaw <i>et al.</i> (2004) |
| Pilchard, <i>Sardinops sagax</i> (Jenyns) | 30 (25) | Wild marine | Whittington <i>et al.</i> (1997) |
| Amberjack, <i>Seriola dumerili</i> (Risso) | 46 (15) | Wild marine | Grau and Crespo (1991) |
| Sea bream, <i>Sparus aurata</i> L. | 70 (13) | Cultured marine | Paperna (1977) |
| Red sea bream, <i>Pagrus major</i> (Temminck & Schlegel) | 100 (100) | Cultured marine | Syasina <i>et al.</i> (2004) |
| Red sea bream, <i>P. major</i> black sea bream, <i>Acanthopagrus schlegeli hybrid</i> | 10 (50) | Cultured marine | Syasina <i>et al.</i> (2004) |
| Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i> L. | 20 (20) | Cultured marine | Nowak and Clark (1999) |
| Dentex, <i>Dentex dentex</i> (L.) | 88 (19) | Cultured marine | Company <i>et al.</i> (1999) |
| Yellowtail kingfish, <i>Seriola lalandi</i> (Valenciennes) | 86 (82) | Cultured marine | Nowak, unpublished data |

(ต่อ)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| ชนิดของปลา | % การติดเชื้อ (n) | แหล่งอาศัย | อ้างอิง |
|--|-------------------|---------------------|------------------------------|
| Japanese yellowtail, <i>Seriola quinqueradiata</i> (Temminck & Schlegel) | 100 (10) | Cultured marine | Nowak, unpublished data |
| Channel catfish, <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque) | 46 (46) | Cultured freshwater | Zimmer <i>et al.</i> (1984) |
| Silver perch, <i>Bidyanus bidyanus</i> (Mitchell) | 75 (105) | Cultured freshwater | Frances <i>et al.</i> (1997) |

ที่มา : Nowak and LaPatra (2006)

ลักษณะอาการ

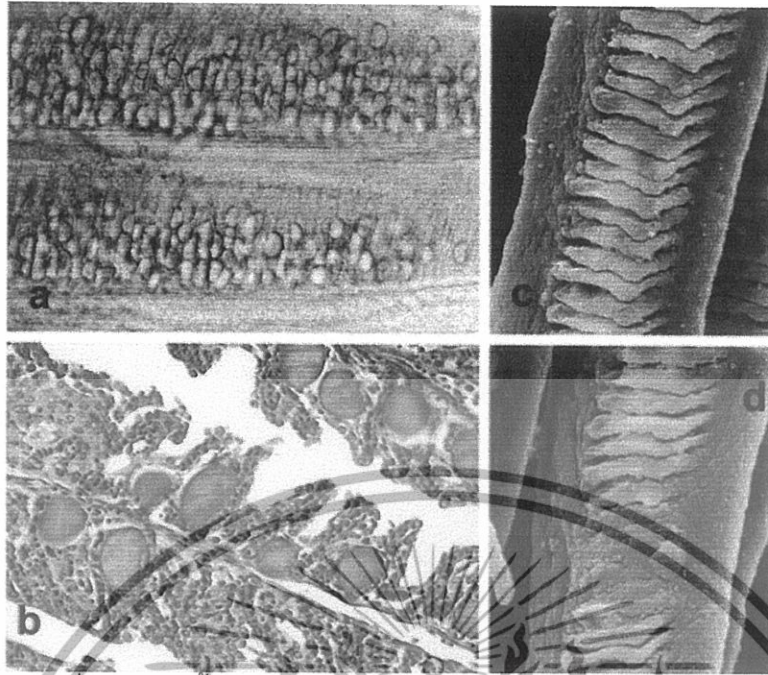
ปลาที่ติดเชื้อ epitheliocystis พบว่าไม่แสดงลักษณะอาการผิดปกติภายนอก และเป็น การติดเชื้อแบบเรื้อรัง ถ้าพบเชื้อปริมาณน้อยจะไม่เป็นอันตรายต่อปลา แต่ถ้าพบเชื้อในปริมาณมาก หรือมีการติดเชื้อรุนแรงอาจทำให้ปลาตายได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Goodwin *et al.* (2005) ที่พบในฟาร์มเพาะเลี้ยง largemouth bass, *Micropterus salmoides* ว่ามีการติดเชื้อจำนวนมากและมีอัตราการตายสูง และ Crespo *et al.* (2001) ได้นำเหงือกปลา sea bass, *Dicentrarchus labrax* ที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรง มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่า มีการติดเชื้อมากที่สุดบริเวณ interlamella space และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าถ้ามีเชื้อจำนวนน้อยจะไม่มีการทำให้เหงือกมีการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 3c) และยังพบว่า lamella เชื่อมติดกัน (fusion) เพียง 7% โดยมีผลกระทบกับ lamella ที่อยู่ติดกัน ประมาณ 6 – 10 lamellae ดังภาพที่ 3d โดย Goodwin *et al.* (2005) กล่าวว่า ถ้าพบเชื้อจำนวนมากจะมีผลต่อกระบวนการหายใจและสมดุลน้ำของปลาอาจทำให้ปลาตายได้ นอกจากนี้ France *et al.* (1997) ยังพบการติดเชื้อที่เซลล์อื่น ๆ เช่น chloride cell, macrophages และ pilla cell พบการติดเชื้อที่หลากหลายของเซลล์ เช่น ที่ epithelial cell chloride cell และ mucous cell ในปลา carp ซึ่งลักษณะการติดเชื้อที่หลากหลายเซลล์นี้ อาจเกิดจากความแตกต่างระหว่าง ชนิดของโฮสต์หรือเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดโรค จากการศึกษาทางพยาธิสภาพ Nowak and LaPatra (2006) กล่าวว่า epithelial cell มีการเปลี่ยนแปลงหลังการติดเชื้อ โดยพบการเพิ่มขึ้นของ mitochondria ทั้งนี้เนื่องจาก chlamydiae ขาดความสามารถในการสร้างพลังงานเพื่อไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหารและการหายใจ จึงจำเป็นต้องอาศัย จากเซลล์เจ้าบ้านที่มันไปอาศัยอยู่

ความรุนแรงของโรค

อัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อ epitheliocystis มีรายงานว่าอยู่ในช่วง 4 – 100 % และพบการตายในการเพาะเลี้ยงอย่างเดี่ยวซึ่งอัตราการตายขึ้นกับ ปริมาณการติดเชื้อ ถ้าติดเชื้อปริมาณน้อยจะไม่ทำให้ปลาตายซึ่ง Nowak and LaPatra (2006) ได้ทำการศึกษาในปลา Atlantic salmon ในฟาร์มที่ Tasmania พบการ ติดเชื้อ 20% ของปลา และพบซีสต์ในซีเหงือกเพียง 1 – 2 ซีสต์ โดยไม่มีรายงานว่าปลาตาย ขณะที่ Atlantic salmon ในฟาร์มที่ Norway พบการติดเชื้อ 60 – 80 % และมีรายงานว่าปลามีการตายเกิดขึ้น สิ่งนี้ยืนยันได้ว่าอัตราการตายขึ้นกับปริมาณการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาวัยอ่อนมีอัตราการตายมาก และตายก่อนที่จะมีการตอบสนองของเซลล์ ซีเหงือก ในขณะที่ ปลาที่โตแล้ว พบอัตราการตายน้อย และ มีการตอบสนองของเซลล์ซีเหงือกก่อนตาย โดยการเพิ่มจำนวน epithelium เซลล์ ทำให้เหงือกเชื่อมติดกัน (hyperplasia)

การวินิจฉัยโรค

ในการตรวจวินิจฉัยโรคนี้ วิธีที่ง่ายและสะดวกที่สุดคือ การ ศึกษาตัวอย่างสด (wet mount) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยการตัดซี เหงือกปลาป่วยมาส่งกล้องที่กำลังขยาย 100 เท่าขึ้นไป จะเห็นลักษณะซีสต์บริเวณ interlamella space เป็นสีน้ำตาลเหลืองดังภาพที่ 3a และเมื่อ นำเหงือกปลามาวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อ แล้วย้อมสี H&E และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จะพบลักษณะของ granular basophilic cyst ดังภาพที่ 3b จากนั้น นำตัวอย่างเหงือกที่ติดเชื้อมาทำ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อจำแนกชนิด หรือ ตำแหน่งในอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคต่อไป และหากต้องการศึกษาเพิ่มเติมการ นำเหงือกปลาป่วยมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscop , SEM) จะทำให้ทราบความผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงของซีเหงือกดังภาพที่ 3c – d หรือ นำเหงือกปลาป่วยมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscop , TEM) เพื่อดูลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคซึ่งมีอยู่ 2 รูปร่างดังภาพ ที่ 2



ภาพที่ 3 เหงือกปลาที่มีการติดเชื้อและการศึกษาด้วยวิธีต่างๆ : (a) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (b) เนื้อเยื่อของเหงือกที่พบ ลักษณะของ granular basophilic cyst (c) ถ่ายด้วย SEM แสดงลักษณะที่เหงือกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (d) ถ่ายด้วย SEM แสดงลักษณะที่เหงือกที่ถูกทำลายเกิดการเชื่อมติดกัน (fusion)

ที่มา : Crespo *et al.* (2001)

การรักษาโรค epitheliocystis

ในฟาร์มปลา largemouth bass, *Micropterus salmoides* ทำการรักษาโดยใช้ ออกซิเตตราไซคลิน 25 ppm 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน ให้ผลดีมากในการรักษาโรค และเห็นผลอย่างรวดเร็วโดยหลังจาก 3 วันในการรักษา เมื่อวินิจฉัยโรคจากเนื้อเยื่อเหงือกปลา ไม่พบซีสต์ของ epitheliocystis นอกจากนี้ในปลา sea bream การใช้ คลอแรมฟินิคอล ผสมกับตับไก่ในสัดส่วน 1:100 แล้วให้กิน 100 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน ก็ให้ผลดีเช่นกันในการรักษาทำให้ การตายหยุดลงหลังได้รับยา 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม ยาต้านจุลชีพชนิดนี้ไม่เหมาะสมในการใช้กับปลาที่เลี้ยงเพื่อให้คนบริโภค Nowak and LaPatra (2006) แนะนำ การฆ่าเชื้อน้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อ epitheliocystis ในปลา amberjack, *Seriola dumerili* และ *Plectropomus leopardus* ได้

ปัจจัยเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดโรค

1. ความหนาแน่นในการเลี้ยง

มีรายงานในปลา sea bream ที่พบในธรรมชาติมีการติดเชื้อน้อย หรือพบการติดเชื้อเป็นครั้งคราว ในขณะที่ฟาร์มเพาะเลี้ยง sea bream พบการติดเชื้อที่รุนแรง และ มีการตาย 26 % นอกจากนี้ยังพบว่า ปลา sea bream ใน stock ก่อนนำไปเพาะเลี้ยง ที่ตรวจแล้วไม่พบเชื้อ แต่หลังจากนำปลาไปเลี้ยง 1 เดือน พบโรค epitheliocystis เกิดขึ้น มากกว่า 70 % จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงหรือสภาพการเลี้ยง รวมทั้งความหนาแน่นของปลาที่เลี้ยงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดติดเชื้อ และมีผลกับความรุนแรงของโรคด้วย ซึ่งบางครั้งความหนาแน่นในการเลี้ยง และการจัดการต้องมีความเหมาะสม เพื่อไม่ให้ปลาเกิดการแก่งแย่งอาหาร ทำร้ายกัน ซึ่งส่งผลให้ปลาเกิดความเครียดและมีผลต่อการเกิดโรคได้ง่าย (Nowak and LaPatra , 2006)

2. ปริมาณสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำ

Nowak and LaPatra (2006) ทำการเก็บตัวอย่างปลา red morwong, *Cheilodactylus fuscus* และ rock cale, *Crinodus tophodon* จาก 2 แหล่งคือ บริเวณปากทางระบายน้ำเสีย และ บริเวณปากแม่น้ำ พบว่า ปลาที่เก็บจากบริเวณปากทางระบายน้ำเสีย มีการติดเชื้อมากกว่า บริเวณปากแม่น้ำ แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า ความเข้มข้นของสารอินทรีย์หรือของเสียในน้ำสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ รวมถึงความรุนแรงของเชื้อที่แตกต่างกัน

3. แอมโมเนียในน้ำ

ในการทดลองการติดโรคกับลูกปลา silver perch ที่เลี้ยงในน้ำที่ระดับแอมโมเนียต่างกัน พบว่า แอมโมเนีย 0.02 mg/l มีการติดเชื้อ epitheliocystis น้อยกว่าที่ระดับแอมโมเนียที่ 3.6 mg/l (Nowak and LaPatra , 2006)

4. ฤดูกาลและอุณหภูมิ

ฤดูกาลเป็นอีกปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค epitheliocystis ได้โดยพบว่าปลา Atlantic salmon ใน Tasmania ช่วง 1 เดือนของฤดูร้อน พบการติดเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อเพิ่มขึ้น (Nowak and LaPatra , 2006)

5. การติดเชื้อร่วมกับปรสิตและโรคอื่น ๆ โดย Nowak and LaPatra (2006) พบว่า

5.1 Paramyxovirus มีความเกี่ยวข้องกับการตายของเจ้าบ้าน โดยพบ Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV) ปรากฏที่เหงือกของปลาบางตัวที่ติดเชื้อ epitheliocystis

5.2 Lymphocystis ติดเชื้อร่วมกับ epitheliocystis มีรายงานในปลา barramundi ว่าพบซิสต์ของ lymphocystis ในผิวหนัง และพบเซลล์ Chlamydia ภายในซิสต์ด้วย แต่พบจำนวนไม่มาก

5.3 epitheliocystis ติดเชื้อร่วมกับ *Trichodina sp.* และ *Gyrodactylus sp.* พบในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลา pacu, *Piaractus mesopotamicus* นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อร่วมกับ monogenean ใน ปลา amberjack และ kingfish ซึ่งพบว่าเมื่อเกิดพาราไซต์ขึ้นความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้น แต่หลังจากที่กำจัด monogenean มีผลให้ซีสต์ของ epitheliocystis ลดจำนวนลง แสดงให้เห็นว่าพาราไซต์ ทำให้มีการติดเชื้อรุนแรงเพิ่มมากขึ้น

ยาและสารเคมีที่ใช้ในการรักษาโรคสัตว์น้ำ

1. เกลือ (โซเดียมคลอไรด์ NaCl)

เป็นสารเคมีราคาถูก และหาซื้อได้ง่ายที่สุด จัดเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ดี โดยจะแตกตัวให้โซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออนโดยมี สูตรโครงสร้างของ โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมี มีลักษณะการเรียงตัวของอะตอมของธาตุแบบซิดที่ สุด แบบ ccp ของ Cl⁻ และมี Na⁺ อยู่ในช่องออกทะยี่ตรอล ในแลตทิซผลึก Na⁺ ถูกล้อมรอบด้วย Cl⁻ 6 ไอออน และ Cl⁻ ถูกล้อมรอบด้วย Na⁺ 6 ไอออน ดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ โซเดียมคลอไรด์

ที่มา : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (2005)

เกลือสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ เกลือสินเธาว์ (rock salt) และเกลือแกง (table salt) โดยทั่วไปจะใช้กันในรูปเกลือแกง ประสิทธิภาพ ของเกลือแกงมีดังนี้

- ใช้ในการกำจัดปรสิตภายนอก อัตราการใช้ 0.1 - 0.5 % แช่ตลอด 1% 30 นาที - 1 ชั่วโมง และ 3% จุ่มนาน 2-3 นาที

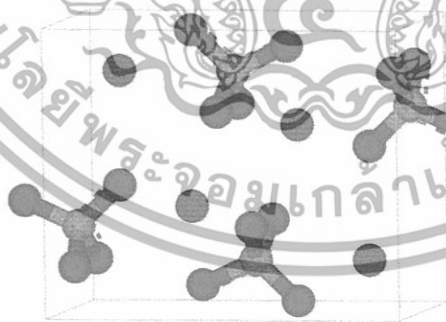
- ใช้ลดความเครียดในระหว่างการขนส่ง อัตราการใช้ 0.1 % ช่วยลดความเป็นพิษของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) อัตราการใช้ 60-100 กิโลกรัมต่อพื้นที่บ่อ 1 ไร่ Bolivar *et al.* (2004) ได้ทำการทดสอบโซเดียมคลอไรด์ ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นพาหะ ในบ่อเลี้ยงปลานิล *Oreochromis niloticus* พบว่าการใช้ โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 ppt เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียลดลง จากระดับ 5.1 x 10⁸ cfu/ml เป็น 2.79 x 10⁸ cfu/ml และ 4.5 x 10⁸ cfu/ml เป็น 2.12 x 10⁸ cfu/ml ตามลำดับ

2. ด่างทับทิม (potassium permanganate, KMnO_4)

เป็นสารเคมีที่มีลักษณะเป็นผลึกสีม่วงเข้ม เป็นเงาเหมือนโลหะปราศจากกลิ่น เมื่อละลายน้ำ จะได้สารละลายสีม่วงหรือชมพูอมม่วง มีประสิทธิภาพต่าง ๆ คือ ใช้ในการกำจัดปรสิตภายนอกในบ่อปูนหรือบ่อดินที่น้ำใส ใช้ในอัตรา 2-4 ppm (ส่วนในล้านส่วน) แซ่ตลอด ใช้ฆ่าเชื้อ อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กระจก สายยาง ใช้ในอัตรา 20-25 ppm (ส่วนในล้านส่วน) แช่นาน 24 ชั่วโมง ใช้กำจัดปรสิต เชื้อรา และแบคทีเรียในอาหารสัตว์น้ำที่มีชีวิต เช่น ลูกไร ลูกน้ำ โดยแช่ในสารละลายต่าง ๆ ทับทิมเข้มข้น 100-150 ppm (ส่วนในล้านส่วน) นาน 3-5 นาที ใช้ลดปริมาณแพลงก์ตอนและสารอินทรีย์ในน้ำ ปริมาณการใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสีน้ำ ถ้าน้ำมีสีเข้มมาก ต้องใช้ในปริมาณที่สูงขึ้น สามารถใช้ลดความเป็นพิษของก๊าซไข่เน่า (ไฮโดรเจนซัลไฟด์ H_2S) และโลดีน (Rotenone) นอกจากนี้ Rasowo *et al.*, 2007 ใช้ด่างทับทิมในการรักษาไข่ของ African catfish พบว่า เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นที่ 2 ppm เป็นเวลา 30 นาที ให้อัตราการฟักไข่ที่ 96.7%

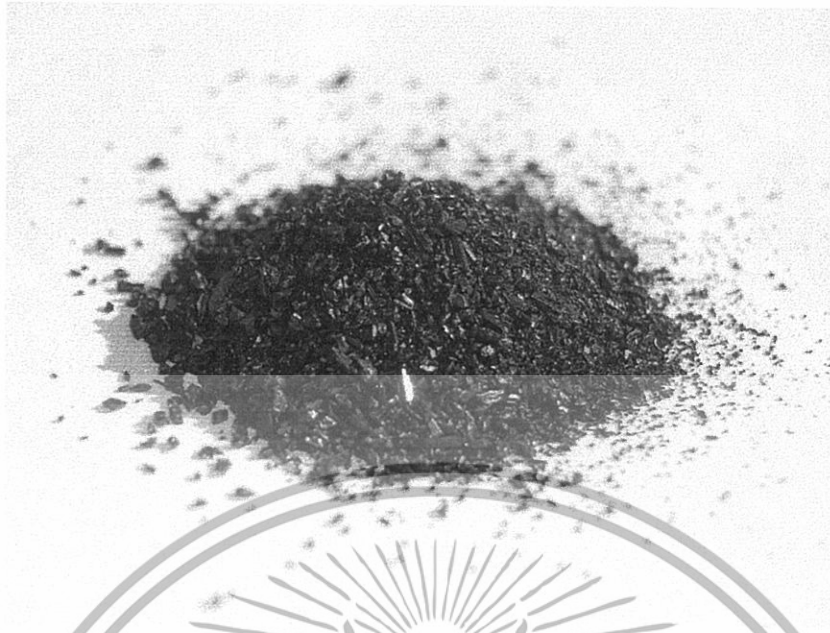
ข้อควรระวัง ในการใช้ด่างทับทิม

ไม่ควรใช้เพื่อเพิ่มออกซิเจนในบ่อปลา ไม่ควรใช้ร่วมกับฟอร์มาลิน เนื่องจากด่างทับทิมสามารถฆ่าแพลงก์ตอนได้ จึงมีผลทำให้ออกซิเจนในน้ำลดลงโดยทางอ้อม คือด่างทับทิมมีผลทำให้แพลงก์ตอนตาย และเกิดการเน่าเสียของแพลงก์ตอน ไม่ควรให้ถูกผิวหนังของผู้ใช้โดยตรง ควรเก็บด่างทับทิมในสถานที่ ที่ไม่ถูกแสง



ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ potassium permanganate, KMnO_4

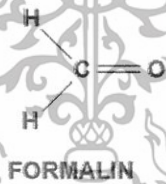
ที่มา : Wikimediacommons (2007)



ภาพที่ 6 ลักษณะภายนอกของด่างทับทิม เมื่อตั้งเกิดด้วยตาเปล่า

ที่มา : Wikimediacommons (2007)

3. ฟอรัมาลีน (formalin)



ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ formalin

ที่มา : USGS (2007)

น้ำยาฟอรัมาลีนหรือที่เรียกกันทั่วไปว่า ยาฉีดศพ เป็นสารละลาย 37-40 % ของฟอรัมาลดีไฮด์ ในน้ำ แต่ถือการออกฤทธิ์ของสารเป็น 100 % มีสูตรทางเคมีคือ CH_2O ซึ่งมีเมทานอล (methylalcohol) 10-15 % เป็นองค์ประกอบ เพื่อป้องกันมิให้ฟอรัมาลีนเปลี่ยนรูปไปเป็นพาราฟอรัมาลดีไฮด์ (paraformaldehyde) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ฟอรัมาลีนที่มีคุณภาพจะเป็นสารละลายใสไม่มีสี กลิ่นฉุน แต่ถ้าเก็บไว้นาน หรือเก็บไว้ในภาชนะที่มีแสงส่องผ่านได้จะพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น เนื่องจากฟอรัมาลีนเปลี่ยนรูปไปเป็น พาราฟอรัมาลดีไฮด์ ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคสัตว์น้ำ ประสิทธิภาพของฟอรัมาลีนที่เกี่ยวข้องกับโรคสัตว์น้ำคือ ใช้ในการกำจัดปรสิตภายนอก อัตราการใช้ 25-50 ppm แซ่ตลอด หรือ 100-200 ppm แซ่นาน 30 นาที – 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ จากการทดลองของ Gieseke *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองใช้ฟอรัมาลีน ในการรักษา

ไซของปลา Rainbow trout ที่ติดเชื้อรา Saprolegnia พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 50 100 และ 150 ppm ให้ผลการรักษาที่ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ กับการรักษาที่ 0 ppm นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการรักษาเชื้อราแล้ว ยังสามารถรักษาปรสิตในเหงือกปลา โดยการใช้ฟอร์มาลินที่ 200 ppm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ช่วยกำจัด monogene, *Microcotyle* sp. ได้เป็นอย่างดี (Ktharios et al. 2006) นอกจากนี้ ฐิติพร และคณะ (2544) รายงานว่า ผลการตรวจวินิจฉัยโรคในปลาออกสการ์ (*Astronotus ocellatus*) ที่มีอาการผิดปกติ คือ ถ่ายน้ำเหลืองขี้ม ไม่กินอาหาร ผอม สีผิวเข้มขึ้น บางตัวมีแผล รวมตัวกันที่พื้นบ่อ และตายในระยะเวลาอันสั้น อัตราการตายสูงถึง 80-100 % พบปรสิตสกุลเห็บระฆัง และปลิงใส บริเวณเหงือกและผิวหนัง การใช้ฟอร์มาลิน ในอัตราความเข้มข้น 40-45 ppm สามารถควบคุมปรสิตดังกล่าวได้

ข้อควรระวังในการใช้ฟอร์มาลิน

ฟอร์มาลินสามารถ ลดปริมาณออกซิเจนในน้ำได้โดยตรงฉะนั้นเวลาใช้ควรระวังปัญหาการขาดออกซิเจน ถ้าใส่ฟอร์มาลินลงตู้กระจก หรือบ่อปูนควรเพิ่มออกซิเจน ลงในน้ำโดยการเปิดเครื่องเพิ่มอากาศ แรง ๆ กรณีใส่ลงบ่อดินควรสังเกตสีของน้ำก่อน ถ้าสีเขียวจัดควรเปิดเครื่องตีน้ำ หรือการพ่นน้ำขึ้นไปในอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนด้วย ควรสาดฟอร์มาลินลงในบ่อช่วงที่มีแสงแดด ไม่ควรสาดฟอร์มาลินลงในบ่อช่วงตอนเย็น ไม่ควรใช้ฟอร์มาลินรวมกับด่างทับทิม ควรเลือกซื้อฟอร์มาลินในภาชนะบรรจุที่บ่งแสง หรือในขวดชา. ควรระวังมิให้ฟอร์มาลินสัมผัสผิวหนังหรือตาของผู้ใช้

4. เบนซัลโคเนียม คลอไรด์ (benzalkonium chloride, BKC)

เป็นสารเคมีในกลุ่มยาฆ่าเชื้อ (quaternary ammonium compound) ลักษณะเป็นสารละลายสีเหลืองใส ประกอบด้วยสาร N-Alkyl (C 12 - C 16) - N, N-dimethyl-N-benzylammonium chloride และ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมี 2 ชนิด ระดับความเข้มข้นคือ บีเคซี 50 % และ บีเคซี 80 % นิยมใช้ในการฆ่า เชื้อแบคทีเรียในน้ำ และกำจัดโปรโตซัวภายนอก ได้แก่ เห็บระฆัง (*Trichodina* sp.) อีพิสไตรส (*Epistylis* sp.) และสามารถฆ่าแพลงก์ตอนในน้ำได้ด้วย อัตราส่วนที่ใช้ คือ 0.3-0.8 ppm หรือ 0.5 -1.3 ลิตรต่อพื้นที่บ่อ 1 ไร่ ที่มีระดับน้ำลึก 1 เมตร หรือ 1-2 ppm แชนาน 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 ลักษณะของเบนซัลโคเนียม คลอไรด์

ที่มา: Germesonline (2005)

ข้อควรระวังในการใช้ เบนซัลโคเนียม คลอไรด์

ระวังอย่าให้เข้าตา ถูกผิวหนัง หรือสูดดม ไม่ควรใช้ในบ่อที่มีพีชน้ำ เช่นผักตบชวา ผักบุ้ง เนื่องจากบีเคซี สามารถ ฆ่าพีชน้ำได้ ถ้าต้องใช้น้ำหลังการใช้ควรรินา พีชน้ำที่ตายออก เพื่อมิให้น้ำในบ่อเน่าเสีย เป็นวัตถุไวไฟ ดังนั้นควรเก็บให้ห่างเปลวไฟ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตู้ทดลอง ขนาด 24 นิ้ว
2. สไลด์ และ cover glass
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
4. เครื่องวัด DO
5. pH meter รุ่น HI8424
6. spectrophotometer
7. ชุดเครื่องแก้ว
8. เครื่อง tissue processor
9. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)
10. อ่างล้างชิ้นเนื้อ
11. paraffin bath
12. slide warmer
13. เครื่องชั่งสาร
14. ชุดย้อมสีเนื้อเยื่อ
15. สีย้อม hematoxin และ eosin
16. 10% buffer formalin
17. decalcification solution
18. sodium chloride
19. potassiumpermanganate
20. formalin
21. benzalkonium chloride
22. ปลายินขนาดเฉลี่ย 4.1 เซ็นติเมตร

แผนการทดลอง

นำปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis จากธรรมชาติ ที่เลี้ยงในคลองน้ำทิ้งของสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ นำมาตรวจเช็คการติดโรค แล้วนำมาทดสอบกับสารเคมีสี่ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอर्मาลิน 30 ppm เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm และกลุ่มควบคุม เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน และใส่สารเคมีความเข้มข้นเท่าเดิม ทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์เมื่อจบการทดลอง ทำการตรวจนับจำนวนซีสต์ และบันทึกผล โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 : การเตรียมสัตว์ทดลอง

1. นำตัวอย่างปลาจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ตำบลคลอง 5 อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ซึ่งมีรายงานว่ามีการติดโรค epitheliocystis มาพักไว้ในบ่อเป็นเวลาประมาณ 1 อาทิตย์ ให้อาหารวันละสองครั้ง
2. เก็บข้อมูลคุณภาพน้ำในบ่อที่เลี้ยงปลาที่ติดโรค ดังนี้ ค่า DO pH ความโปร่งแสง อุณหภูมิ และ แอมโมเนีย โดยการวิเคราะห์แอมโมเนียจะทำการเก็บน้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ
3. ทำการเช็คโรค epitheliocystis โดยการตัดซี เหงือกปลาขนาดเล็กน้อยส่งกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 10 เท่าขึ้นไป จะเห็นลักษณะซีสต์บริเวณ interlamella space เป็นสีน้ำตาลเหลือง นำเฉพาะปลาที่ติดโรคหรือพบซีสต์เท่านั้นมาพักแยกเลี้ยงไว้เพื่อใช้ในการทดลองกับสารเคมีต่อไป

การทดลองที่ 2 : ทดลองการรักษาด้วยสารเคมี คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่าง
 ทับทิม 4 ppm ฟอรัมาลิน 30 ppm และ เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm

1. นำปลาติดเชื้อจากขั้นตอนที่ 1 โดยสุ่มจาก stock ปลาติดเชื้อทั้งหมด 10 ตัวเพื่อมานับจำนวน
 ซีสต์เริ่มต้นบนซีเหงือกทั้งหมดก่อนการรักษาด้วยสารเคมี และจดบันทึกผล
2. นำปลาที่ติดเชื้อมาทดสอบด้วยสารเคมีซึ่ง แบ่งการทดลองเป็น 5 ทริทเมนต์ ทริทเมนต์ละ 3
 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ดังนี้

ทริทเมนต์ที่ 1 กลุ่มควบคุม

ทริทเมนต์ที่ 2 เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt

ทริทเมนต์ที่ 3 ต่างทับทิมที่ความเข้มข้น 4 ppm

ทริทเมนต์ที่ 4 ฟอรัมาลินที่ความเข้มข้น 30 ppm

ทริทเมนต์ที่ 5 เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2 ppm

3. เตรียมตู้ทดลองโดยทำความสะอาดด้วย ฟอรัมาลิน 100 ppm เพื่อฆ่าเชื้อ และเติมน้ำให้ได้
 ปริมาตร 50 ลิตร จำนวน 15 ตู้ จากนั้นนำปลานิลที่ติดเชื้อ ใส่ลงในตู้ ตู้ละ 10 ตัว
4. ให้อาหารวันละสองครั้ง เปลี่ยนถ่ายน้ำสองวันครั้งทุกทริทเมนต์ (รวมถึงกลุ่มควบคุม) และ
 ใส่สารเคมีที่ความเข้มข้นเท่าเดิม ทุกครั้งหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำ 2 ใน 3
 ส่วน ของปริมาณน้ำทั้งหมด (ยกเว้นในทริทเมนต์ที่รักษาด้วยเกลือจะต้องทำการเปลี่ยนถ่าย
 น้ำเกือบ 100%) ทำการทดลองเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ในระหว่างการทดลองให้สังเกตและ
 บันทึกการตายของปลาทุกวัน จนจบการทดลอง
5. นำปลาที่รักษาด้วยสารเคมีและการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ที่เสร็จสิ้นการทดลอง มาเช็คจำนวนซีสต์ที่
 ซีเหงือก ทุกซี โดยทำการสลับปลา ด้วยยาสลับ ตัดกระดูกปิดเหงือกออก และตัดซีเหงือก
 ออก โดยแบ่งซีเหงือกออกเป็น 8 ซี และทำการนับโดยมาส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่
 กำลังขยาย 40 เท่าขึ้นไป จะเห็นลักษณะซีสต์บริเวณ interlamella space เป็นดิ่งน้ำตาลเหลือง
 นับด้วยเครื่องนับ และจดบันทึกผลการทดลอง และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1. นำปลานิลติดโรค epitheliocystis มาสลับด้วยสาร guanadin แล้วตัดบริเวณเหงือก มาดองใน 10% buffer formalin
2. หลังจากดองแล้วอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำชิ้นเหงือก วางลงบน แคทเช็ท แล้วปิดให้สนิท พร้อมเขียนรหัส และทำการย่อยแคลเซียมด้วยน้ำยาย่อยแคลเซียม จากนั้นนำมาปรับ pH ด้วย 5% Na_2SO_4 แล้วนำชิ้นเนื้อที่จะเข้าเครื่อง tissue processor มาผ่านน้ำไหลประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ฟอรัมาลินออกจากเนื้อเยื่อ
3. นำเข้าเครื่อง tissue processor เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ และฝังเนื้อเยื่อลงใน พาราฟลาส นำชิ้นเนื้อที่ตรึงกับ parafin มา ตัดส่วนที่เกินออก หรือเรียกว่าการแต่ง block (trimming) จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาตัด เนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 4-5 ไมโครเมตร
4. ทำการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin เมื่อจบขั้นตอนการย้อมสีจะได้ สไลด์เนื้อเยื่อ และนำไปวิเคราะห์ทางพยาธิสภาพถึงผลกระทบจากการติด โรค epitheliocystis ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ข้อมูลจากการเปรียบเทียบรายคู่โดยวิธีของ T-test และใช้โปรแกรม Excell ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาทำการทดลอง

ทำการทดลองตั้งแต่วันที่ 13 กรกฎาคม 2550 - 20 กันยายน 2550 เป็นระยะเวลา 68 วัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำจาก แหล่งที่เกิดโรค

จากการเก็บตัวอย่าง และวัดคุณภาพน้ำในวันที่เก็บตัวอย่าง จากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ตำบลคลอง 5 อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 พบว่าค่า DO pH อุณหภูมิ ความโปร่งแสง และแอมโมเนีย มีค่าเท่ากับ 4.98 ppm 7.64 31.30 องศาเซลเซียส 33 เซ็นติเมตร และ 0.05 ppm ตามลำดับ ซึ่งพบว่าคุณภาพน้ำไม่เหมาะสมกับการเลี้ยงสัตว์น้ำเพียงเล็กน้อย โดยพบว่า มีค่า DO ต่ำ และ แอมโมเนียที่สูงเกิน ซึ่งในน้ำควรมีค่าค่า DO ควรอยู่ที่ระดับประมาณ 6.8 ppm และมีค่าแอมโมเนียไม่เกิน 0.02 ppm (สมชาย, 2548) ซึ่งค่าที่ได้ทำการวัดเพียงครั้งเดียวในวันที่เก็บตัวอย่างซึ่ง คุณภาพน้ำอาจเปลี่ยนไปได้ตามช่วงเวลาตั้งนั้นจึงไม่สามารถวิจารณ์ถึงผลจากคุณภาพน้ำในครั้งนี้ แต่จากการสอบถามเจ้าน้ำที่ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ พบว่า บริเวณที่พบปลาติดเชื้อ epitheliocystis นี้ เป็นคลองน้ำทิ้ง ของทางสถาบัน ซึ่งเป็นพื้นที่เหลือใช้ จึงนำกระชังปลามาเลี้ยงไว้ แต่พบว่ามีการตายจึง นำมาตรวจสอบและพบโรค ดังกล่าว ซึ่งการที่เป็นคลองน้ำทิ้งนี้ อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่สภาพของคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม และอาจเป็นที่สะสมของพาหะนำโรค จึงทำให้เกิดโรค epitheliocystis ได้

2. ลักษณะของเหงือกก่อนและหลังทดสอบด้วยสารเคมี

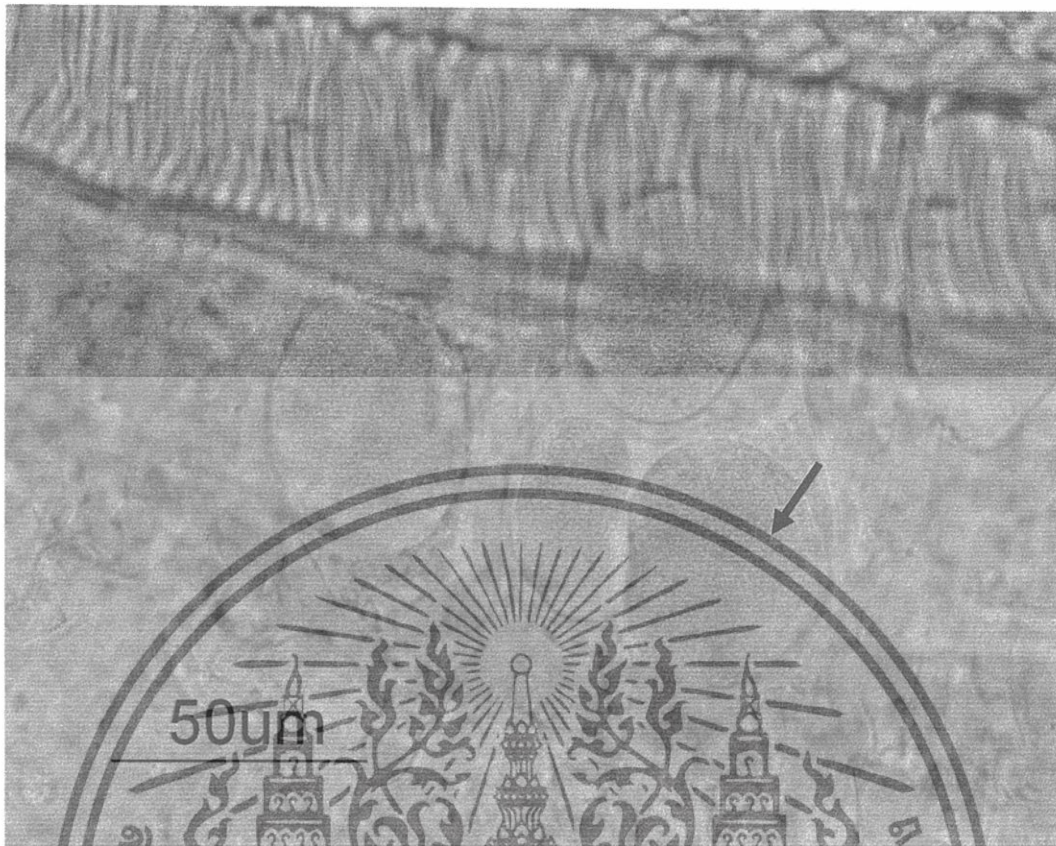
2.1 ลักษณะของเหงือกปลาติดเชื้อ epitheliocystis ก่อนการทดลอง

จากการตรวจเช็คการติดเชื้อ epitheliocystis ของปลาก่อนการทดลอง เมื่อบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 4X พบว่าการติดเชื้อโดยพบซีสต์อยู่ภายในซีเหงือก ลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนโดยส่วนมากแล้วจะมีลักษณะกลม และรี สีออกน้ำตาล เหลือง (ภาพที่ 9) จากนั้นเมื่อเพิ่มกำลังขยายมากขึ้น จะพบเห็นลักษณะของซีสต์ที่ชัดเจนขึ้น ดังภาพที่ 10 และ 11 โดยที่ กำลังขยาย 100X จะเห็นลักษณะของซีสต์ที่มีเม็ดกลม ๆ ขนาดเล็กอยู่ภายใน อัดแน่นอยู่ และจะไม่พบเห็นลักษณะของอวัยวะ และ organell อื่นๆ เหมือนกับแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งลักษณะของซีสต์นี้สอดคล้องกับ ผลการทดลองของ Crespo et al. (2001) ที่ทดลองในปลา sea bass โดยนำเหงือกปลามาศึกษา ตัวอย่างสดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะ ซีสต์ (yellowish round-to-oval cysts) ในบริเวณ ช่อง interlamella ภายในเหงือก เช่นกัน



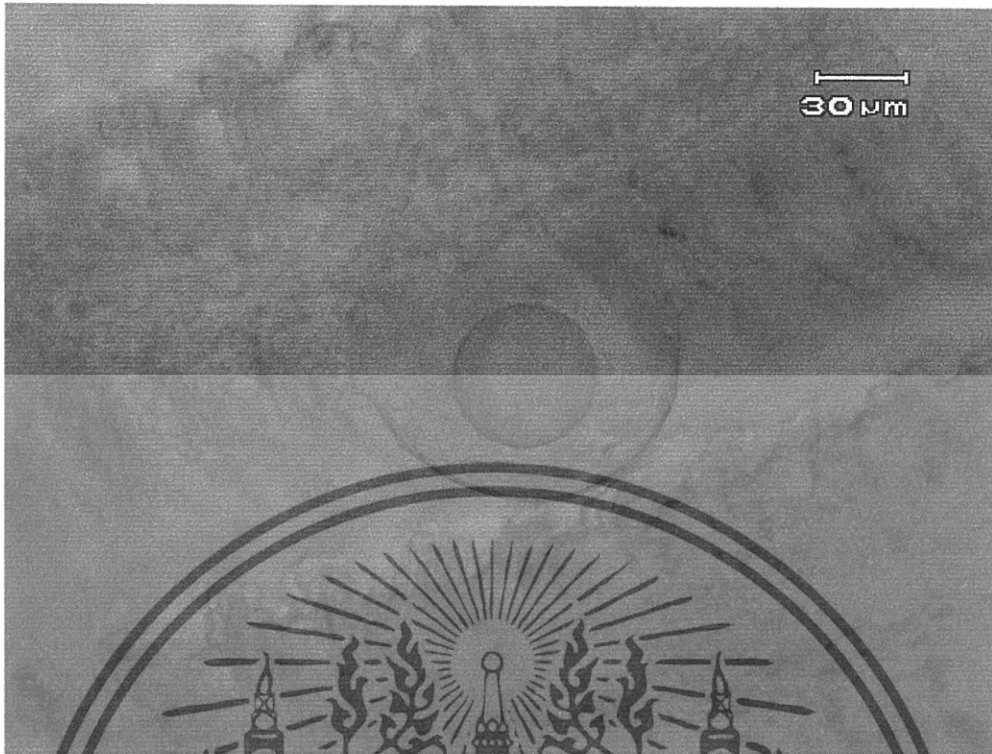
ภาพที่ 9 ซีเหงือกปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis (ครรชี่) ก่อนการทดลอง ที่กำลังขยาย 10 X

ภาพที่ 10 ลักษณะที่สัดของ epitheliocystis ที่พบในซีเหงือกปลานิลที่ติดเชื้อมีลักษณะกลม และ รี่ สีออกน้ำตาล เหลือง epitheliocystis (ครรชี่) ที่กำลังขยาย 40 X



ภาพที่ 11 ภาพเหงือกปลาชนิดที่ติดเชื้อ epitheliocystis ก่อนการทดลอง พบลักษณะของซิสต์ที่มีเม็ดกลม ๆ (ครีซี) ขนาดเล็กอยู่ภายใน อัดแน่นอยู่ ที่กำลังขยาย 100 X

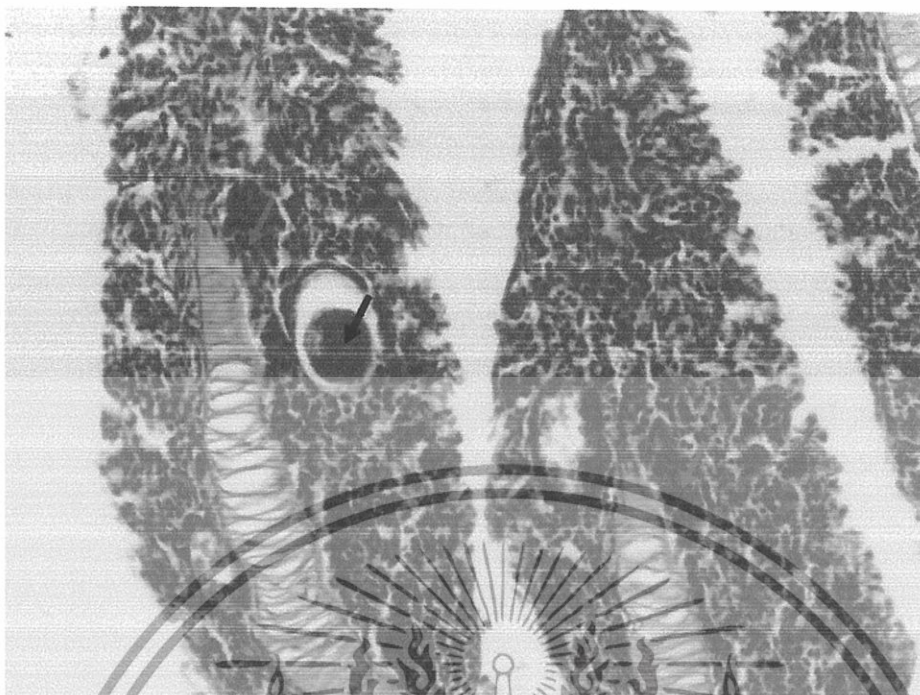
2.2 ลักษณะของเหงือกปลาชนิดที่ติดเชื้อ epitheliocystis หลังการทดสอบด้วยสารเคมี เมื่อทดลองรักษาปลานิลเป็นโรคด้วยสารเคมี ชนิดต่าง ๆ พร้อมกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง พบว่าซิสต์บางซิสต์ มีการเคลื่อนที่ออกจากซีเหงือก ซึ่งมีลักษณะของเมือกที่ค่อนข้างหนาโอปัลลุ่มซีอยู่ (ภาพที่ 12) และในซีเหงือกบางซี พบร่องรอยการหายไปของซิสต์ แต่ไม่พบซิสต์อยู่ภายในซีเหงือกนั้น



ภาพที่ 12 ภาพเหงือกปลาชนิดที่ติดโรค epitheliocystis หลังการทดสอบด้วยสารเคมีเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 100 X

3. ภาพทางเนื้อเยื่อของเหงือกปลาที่มีการติดโรค epitheliocystis

เมื่อนำเหงือกปลาชนิดที่ตรวจนับชีสต์ก่อนการทดสอบด้วยสารเคมี นำมา fix ด้วย 10% buffer formalin แล้วนำไปตัดเนื้อเยื่อที่ขนาด 4 ไมโครเมตร และทำการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะเหงือกเกิดเลือดคั่งในซีเหงือก และมีการเพิ่มขึ้นของ epithelium cell ทำให้ secondary lamella เชื่อมติดกัน (hyperplasia) (ภาพที่ 13) พร้อมทั้งมีเลือดคั่งในซีเหงือกและมี mucus cell เพิ่มขึ้นด้วย โดยชีสต์จะติดสีน้ำเงิน และมี connective tissue บาง ๆ ล้อมรอบอยู่ที่ผนังของชีสต์ (ภาพที่ 14) นอกจากนี้พบว่าชีสต์มักจะอยู่บริเวณ กลางถึงปลายซีเหงือก มากกว่าบริเวณโคนซีเหงือก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nowak and LaPatra (2006) ที่รายงานผลทางเนื้อเยื่อ ของเหงือกปลา largemouth bass ที่เป็นโรค epitheliocystis พบลักษณะ granular basophilic cyst จำนวนมากในซีเหงือก และชีสต์ เกิดการเชื่อมติดกัน (fusion) บริเวณ lamellar



ภาพที่ 13 ลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกปลานิล ที่เป็นโรค epitheliocystis พบลักษณะ granular basophilic cyst (ครรชี่สีดำ) ในซี่เหงือก แสดงซีสต์ที่มีผลให้เกิดการเชื่อมติดกัน hyperplasia บริเวณ lamellar และมีเลือดคั่งภายในซี่เหงือก(ครรชี่สีแดง)



ภาพที่ 14 ลักษณะเนื้อเยื่อของเหงือกปลานิล ที่เป็นโรค epitheliocystis พบซีสต์ติดสีน้ำเงิน และมี connective tissue (ครรชี่) บาง ๆ ล้อมรอบอยู่ที่ผนังของซีสต์

ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวถือว่า ยังไม่รุนแรงมากเพราะพบซิสต์เป็นจำนวนน้อย แต่ลักษณะของเหงือกที่เกิด hyperplasia นั้นพบเป็นจำนวนมาก ทั้งบริเวณที่พบซิสต์ และบริเวณที่ไม่พบซิสต์ เป็นไปได้ว่า อาจเกิดจากคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม ซึ่งการที่ปลาตายนั้นอาจเป็นเนื่องมาจาก โรค epitheliocystis และ คุณภาพน้ำ ที่มีผลร่วมกันทำให้ปลาอ่อนแอ และตายได้

4. ผลการทดลองรักษาปลานิลติดโรค epitheliocystis ด้วย เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอรัมาลิน 30 ppm และ เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm

จากการทดสอบปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis กับสารเคมีทั้งสี่ชนิด พร้อมกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าอัตราการตายของปลานิล มีค่าดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราการตายของปลานิลเมื่อทดสอบด้วยสารเคมี 4 ชนิด คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอรัมาลิน 30 ppm และ เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm พร้อมกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์

| ซ้ำ | กลุ่มควบคุม | อัตราการตาย (ตัว) | | | |
|--------|-------------|-------------------|--------|-----------|--------|
| | | ต่างทับทิม | เกลือ | ฟอรัมาลิน | BKC |
| 1 | 0.0 % | 10.0 % | 0.0 % | 0.0 % | 10.0 % |
| 2 | 0.0 % | 0.0 % | 10.0 % | 10.0 % | 40.0 % |
| 3 | 0.0 % | 0.0 % | 0.0 % | 0.0 % | 10.0 % |
| เฉลี่ย | 0.0 % | 3.3% | 3.3% | 3.3 % | 20.0 % |

เห็นว่า การตายจะพบมากที่สุดในการทดสอบการรักษาด้วย BKC (เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ 2 ppm) โดยระหว่างที่ทำการทดลอง พบว่าเมื่อใส่ BKC ลงไปน้ำจะมีลักษณะเป็นฟองเล็กน้อย เนื่องจาก BKC มีฤทธิ์ในการชักฟอง นอกจากนี้ BKC ยังมีหลายเกรดบางเกรดก็เหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรม ชักฟองหรือชำระล้างทำความสะอาด ใช้ในการทำน้ำยาสระผม สบู่ หรือน้ำยาล้างจานซึ่ง BKC กลุ่มนี้ จะมีฟองมากมี โลหะหนักสูงแต่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อต่ำ แต่สำหรับเกรดที่ใช้กับสัตว์น้ำจะมีฟองน้อยกว่า มีโหหะหนักต่ำมีปริมาณแอมโมเนียอิสระต่ำ BKC กลุ่มนี้จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อสูง (ธนากร พันธนิยะ, 2546) เมื่อจบการทดลอง ทำการตรวจนับจำนวนซิสต์ของเชื้อ epitheliocystis จำนวนซิสต์หลังการทดลองรักษาด้วย เกลือ ฟอรัมาลิน เบนซิลโคเนียม คลอไรด์ และ กลุ่มควบคุม มีผลทำให้จำนวนซิสต์ลดลงจากจำนวนซิสต์ก่อนการทดลอง มีค่าดังนี้ 92.53% 92.60% 89.23% และ 93.97% ตามลำดับ และจากการทดลองรักษาด้วยสารเคมี ทั้งสี่ชนิด ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3 โดยพบว่า

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างน้อยหนึ่งคู่ เมื่อทำการเปรียบเทียบรายคู่ด้วย t-test ซึ่งจำนวนซิสต์ในการทดสอบด้วยสารเคมี ฟอรัมาลิน เกลือ และ BKC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนซิสต์ของการรักษาด้วยต่างทับทิม เป็นที่น่าสังเกตว่า กลุ่มควบคุมซึ่งมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำบางส่วนนั้น พบว่าเมื่อทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จำนวนซิสต์ได้ลดลงจากก่อนทดลอง ด้วยเช่นกัน ดังนั้นนอกจากการใช้สารเคมีในการรักษาโรค epitheliocystis การเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือการทำให้น้ำมีความสะอาด และเหมาะสมก็สามารถช่วยให้จำนวนซิสต์ของ โรคนี้ลดลงได้ ซึ่ง จากการใช้สารเคมีทั้งสี่ ชนิดนี้ เห็นว่า ไม่อาจทำให้จำนวนซิสต์หมดไปได้ เหมือนการใช้ยาต้านจุลชีพ

ตารางที่ 3 จำนวนซิสต์โรค epitheliocystis บริเวณเหงือกปลาหลังการทดลองแช่ด้วยสารเคมี 4 ชนิด คือ เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ต่างทับทิม 4 ppm ฟอรัมาลิน 30 ppm และ เบนซิลโคเนียมคลอไรด์ 2 ppm พร้อมกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์

| ทรีทเมนต์ | ค่าเฉลี่ยจำนวนซิสต์ ก่อนการทดลอง | จำนวนซิสต์ในแต่ละซ้ำ | | | เฉลี่ย |
|------------|-------------------------------------|----------------------|-------|-------|---------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| เปลี่ยนน้ำ | 139.60 | 8.71 | 6.89 | 9.67 | 8.42 ± 0.81 ^a |
| ต่างทับทิม | 139.60 | 37.50 | 52.70 | 43.00 | 44.40 ± 4.44 ^b |
| เกลือ | 139.60 | 15.50 | 8.88 | 6.89 | 10.42 ± 2.60 ^a |
| ฟอรัมาลิน | 139.60 | 8.10 | 5.63 | 17.25 | 10.33 ± 3.54 ^a |
| BKC | 139.60 | 10.71 | 13.50 | 20.88 | 15.03 ± 3.03 ^a |

การรักษาโรค epitheliocystis ด้วยออกซิเตตราไซคลิน 25 ppm 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน (Nowak and LaPatra, 2006) แต่สามารถลดจำนวนซิสต์ได้บางส่วน ซึ่ง การติดโรคนี้ถ้าพบว่ามีจำนวนซิสต์จำนวนน้อย จะไม่ทำให้ปลาเกิดการตาย เพียงแต่ทำลายเหงือกเพียงบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นเมื่อปลาเกิดโรค epitheliocystis ขึ้น การทำให้คุณภาพน้ำดีขึ้น ด้วยการเปลี่ยนน้ำ หรือการรักษาด้วยสารเคมี เกลือที่ความเข้มข้น 2 ppt ฟอรัมาลิน 30 ppm เป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยอาจจะรักษาให้จำนวนซิสต์ลดลง ซึ่ง การที่เกลือ และฟอรัมาลิน สามารถทำให้จำนวนซิสต์ลดลงได้นั้นอาจเนื่องมาจาก สารเคมีทั้งสองชนิดนี้ มีฤทธิ์ในการกำจัดปรสิตภายนอก (ก่อนการทดลองมีการตรวจพบเห็บระฆัง และ ปลิงใส) ซึ่งทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ และเหนียวน้ำทำให้เกิดการติดโรค เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อปรสิตภายนอกนี้ได้ถูกกำจัด มีผลให้สัตว์น้ำแข็งแรงขึ้น และสามารถต่อสู้ หรือสร้างภูมิคุ้มกันด้วยตัวมันเอง ซึ่งสัตว์น้ำอาจจะมีการขับ หรือกำจัดซิสต์ ออกมาได้บางส่วน ถ้าผู้เลี้ยง เอาใจใส่คุณภาพน้ำในระยะยาวต่อไป ก็จะสามารถ รักษาโรคนี้โดยไม่ต้องใช้ยาต้านจุลชีพ เพราะการ

เพาะเลี้ยงในฟาร์มขนาดใหญ่ เมื่อเกิดการติดเชื้อ epitheliocystis ต้องใช้ยาต้านจุลชีพเป็นจำนวนมากซึ่งราคาแพง และมีการตกค้าง ดังนั้นจากการทดลองนี้ แนะนำให้ปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด และการใช้เกลือหรือฟอร์มาลินก็เป็นอีกแนวทางเลือกที่ดีเพื่อใช้ในการรักษาหรือลดความรุนแรงของโรคนี้



สรุป

จากการทดลอง ทดสอบการรักษาโรค epitheliocystis ด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ เมื่อ วัดผลจากการนับจำนวนซีสต์ พบว่าหลังการรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ การใช้ เกลือ ฟอ์มาลิน BKC และ กลุ่มควบคุม ให้ผลแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ การรักษาด้วยด่างทับทิม และสามารถทำให้จำนวนซีสต์ลดลงจากจำนวนซีสต์ก่อนการทดลอง ซึ่งการรักษาด้วยการปรับปรุงคุณภาพน้ำ น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด และการใช้เกลือหรือฟอ์มาลินก็เป็นอีกแนวทางเลือกที่ดีเพื่อใช้ในการรักษาหรือลดความรุนแรงของโรคนี้

จากการวิเคราะห์เนื้อปลานิลที่ติดโรค epitheliocystis พบว่าอาการที่เด่นชัดคือ เหงือกเกิด hyperptasia ทำให้ความสามารถในการแลกเปลี่ยนก๊าซลดลง ซึ่งมีผลต่อการหายใจและสมดุลน้ำของปลาที่เกิดโรค ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายได้ นอกจากนี้คุณภาพที่ไม่เหมาะสม การติดเชื้อร่วมกับปรสิตชนิดอื่น ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งซึ่งเป็นปัจจัยร่วม ที่เหนี่ยวนำทำให้เกิดโรคและการตายของปลาได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทำเนื้อเยื่อ ควร fix เนื้อปลาคควรทำด้วยความรวดเร็วก่อนที่เหงือกจะเสียสภาพ
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องปัจจัยเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดโรค และการเพาะเลี้ยงเชื้อ Chlamydia ในห้องปฏิบัติการ
3. ควรหาจำนวนปลาให้เพียงพอแก่การทดลอง เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมในการทดลองนี้
4. เนื่องจากในกลุ่มควบคุมพบว่าจำนวนซีสต์ลดลงจากก่อนการทดลองด้วย ซึ่งการเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือการปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้นน่าจะเป็นวิธีการควบคุมหรือลดความรุนแรงของโรค epitheliocystis ด้วย

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร.2003.การเลี้ยงปลา
 นิล.http://www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/fish_nil/tilipia0.htm
- ฐิติพร หลาวประเสริฐ สมเกียรติ กาญจนาคาร และ สุปราณี ชินบุตร. 2544. โรคอะมีบาในปลาออก
 สการ์ . ข่าวโรคสัตว์น้ำ ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 ธันวาคม
 ธนากร พันธนิยะ,2546 ,ยา สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
 ,http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=100
- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.2005. สูตรโครงสร้างโซเดียม
 คลอไรด์. www.sci.tu.ac.th/Chem/solid/images/pic19_1.jpg
- สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.ยาและสารเคมีเพื่อการ
 ป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ.22 หน้า
- สมชาย หวังวิบูลย์กิจ. 2548. คุณภาพน้ำเพื่อการประมง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะ
 เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 120 หน้า
- สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดชัยภูมิ. 2004. การเพาะเลี้ยงปลานิล. [www.fisheries.go.th/sf-
 chaiyaphum/การเพาะเลี้ยงปลานิล.htm](http://www.fisheries.go.th/sf-chaiyaphum/การเพาะเลี้ยงปลานิล.htm)
- Bolivar,B.R., M.A. D. Aragones ,and G. G. Garcia. 2004. Effect of methylene blue and
 sodium chloride on the bacterial load in the transport water with Nile Tilapia
 (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. Nueva Ecija 3120:188-198.
- Crespo, S., C. Zarza and F. Padros. 2001. Epitheliocystis hyperinfection in sea bass,
Dicentrarchus labrax (L.): light and electron microscope observation. Fish
 Diseases 24: 557 - 560.
- Frances,J., R.Tennent and B.F.Nowak. 1997. Epitheliocystis in silver perch, *Bidyanus*
bidyanus (Mitchell). Fish Diseases 20 : 453 – 457.
- Germesonline.2005.BenzalkoniumChloride.[http://www.germes-
 online.com/catalog/6/126/168965/multi_function_electronic_scaler_dii.html](http://www.germes-online.com/catalog/6/126/168965/multi_function_electronic_scaler_dii.html)
- Gieseke ,C.M., S.G. Serfling, and R. Reimschuessel. 2006. Formalin treatment to reduce
 mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus*
mykiss. Aquaculture 253 : 120– 129
- Goodwin,A.E., E.Park and B.F. Nowak. 2005 . Successful treatment of largemouth bass,

Micropterus salmoides(L.), with epitheliocystis hyperinfection. Fish Diseases 28: 623 - 625.

Katharios ,P., N.Papandroulakis, and P. Divanach. 2006. Treatment of *Microcotyle sp.* (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. Aquaculture 251: 167– 171.

Nowak,B.F. and S.E.LaPatra. 2006. Epitheliocystis in fish. Fish Diseases 29 :573 – 588.

Rasowo,J., O.E. Okoth, and C.C. Ngugi. 2007. Effects of formaldehyde sodium chloride potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. Aquaculture 269 : 271–277

USGS.2007.Formalin.http://www.umesc.usgs.gov/aquatic/drug_research/formalin.html

Wikimediacommons.2007.Image:Potassium-permanganate-sample.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Potassium-permanganate-sample.jpg>

Wikimediacommons.2007.Image:Potassium-permanganate-

sample.<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Potassium-permanganate-unit-cell-3D-balls.png>



ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม Eosin y

| | |
|---------------------|--------|
| Eosin y CI45380 | 1 g |
| 70% ethyl alcohol | 100 ml |
| Glacial acetic acid | 5 ml |

สารละลายที่ได้เป็น stock เมื่อนำมาใช้ให้ผสมกับ 70% ethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:1 แล้วหยด Glacial acetic acid 2-3 หยด คนให้เข้ากัน

การเตรียมน้ำยา ย่อยกระดูก

| | |
|-----------------|--------|
| AlCl_3 | 7 g |
| HCl | 8.5 ml |
| Formic acid | 5 ml |
| น้ำกลั่น | 87 ml |

แช่ 1-5 ชั่วโมงด้วยน้ำปะปา 10 นาที เช็ดชิ้นเนื้อ ถ้ามีน้ำมันให้ชั่งอย่างใน 5% Na_2SO_4 ประมาณ 5 ชั่วโมง หรือค้างคืน

ขั้นตอนการย้อมสี ทำการย้อมสี Hematoxylin และ eosin

| | | | |
|----|--|-----|-----|
| 1 | Xylene I | 3-5 | min |
| 2 | Xylene II | 3-5 | min |
| 3 | Absolute alcohol I | 2 | min |
| 4 | Absolute alcohol II | 2 | min |
| 5 | 95% alcohol | 1-2 | min |
| 6 | 70% alcohol | 1-2 | min |
| 7 | Slowly dripping tap water | 3-5 | min |
| 8 | Hematoxylin staining | 1-5 | min |
| 9 | Slowly dripping tap water | 3-5 | min |
| 10 | Blue the hematoxylin with few drop of ammonia in tap water | 3-5 | min |

| | | | |
|----|------------------------------------|-------|-----|
| 11 | Wash in slowly dripping tap water | 3 - 5 | min |
| 12 | 70% alcohol | 1 - 2 | min |
| 13 | 95% alcohol | 1 - 2 | min |
| 14 | Eosin staining (70 % alc solution) | 1 - 3 | min |
| 15 | Absolute alcohol I | 1 - 2 | min |
| 16 | Absolute alcohol II | 1 - 2 | min |
| 17 | Absolute alcohol III | 1 - 2 | min |
| 18 | Xylene I | 2 - 3 | min |
| 19 | xylene II | 2 - 3 | min |
| 20 | xylene III | 2 - 3 | min |
| 21 | Mount | | |

ตารางผนวกที่ 1 ค่าความเข้มขึ้นและค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ในการวัด ปริมาณแอมโมเนีย ในน้ำที่ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธูกรรมสัตว์น้ำ

| ความเข้มขึ้น | ค่าดูดกลืนแสง |
|---------------------|---------------|
| 0 | 0.015 |
| 0.1 | 0.046 |
| 0.2 | 0.066 |
| 0.3 | 0.117 |
| 0.4 | 0.123 |
| 0.5 | 0.154 |
| น้ำตัวอย่างซ้ำที่ 1 | 0.099 |
| น้ำตัวอย่างซ้ำที่ 1 | 0.120 |

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนชีวิตที่นับได้ใหม่ปลาแต่ละตัวของแต่ละทรีทเมนต์

| ปลาตัวที่ | ก่อนการทดลอง | กลุ่มควบคุม | | | จำนวนชีวิต | | | รอด | | | พอร์มาลิน | | | เบนซัลโคเดนิลเมคคโบลด์ | | |
|-----------|--------------|-------------|---------|---------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|------------------------|---------|---------|
| | | ซ้ำที่1 | ซ้ำที่2 | ซ้ำที่3 | ซ้ำที่1 | ซ้ำที่2 | ซ้ำที่3 | ซ้ำที่1 | ซ้ำที่2 | ซ้ำที่3 | ซ้ำที่1 | ซ้ำที่2 | ซ้ำที่3 | ซ้ำที่1 | ซ้ำที่2 | ซ้ำที่3 |
| 1 | 44 | 13 | 24 | 4 | 30 | 4 | 2 | 8 | 5 | 3 | 28 | 24 | 2 | | | |
| 2 | 348 | 4 | 4 | 19 | 38 | 42 | 2 | 14 | 7 | 3 | 22 | 4 | | | | |
| 3 | 36 | 7 | 9 | 13 | 8 | 59 | 4 | 11 | 14 | | | 4 | 8 | | | |
| 4 | 119 | 10 | 32 | 30 | 47 | 16 | 62 | 3 | 12 | 1 | 10 | 5 | 1 | | | |
| 5 | 224 | 2 | 3 | 24 | 179 | 37 | 7 | | 5 | 3 | 8 | 1 | 4 | | | |
| 6 | 67 | 8 | 6 | 13 | 34 | | | 2 | 1 | 7 | 45 | 15 | 43 | | | |
| 7 | 137 | 12 | 1 | 52 | 4 | 38 | 2 | 25 | 8 | 2 | 3 | 4 | | | | |
| 8 | 257 | 12 | 3 | 5 | 53 | 8 | 20 | 12 | 4 | 6 | 12 | | | | | |
| 9 | 69 | 20 | 3 | 38 | 121 | | 1 | 2 | 1 | 14 | 29 | 1 | | | | |
| 10 | 95 | 4 | 1 | 3 | 96 | 27 | 12 | 1 | 35 | 3 | | | | | | |
| เฉลี่ย | 139.600 | 8.71 | 6.89 | 9.67 | 37.50 | 43.00 | 15.50 | 8.88 | 6.89 | 8.10 | 5.63 | 17.25 | 10.71 | 13.50 | 20.88 | |