



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ภาควิชา

เรื่อง การปนเปื้อนและการลดปริมาณแบคทีเรียจากไซอาร์ทีเมีย

Bacterial Contamination and Decontamination Attempt in *Artemia* cysts

นามผู้วิจัย นายเดลินเกียรติ สมนึก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรัตน์, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์สุนทรภรณ์ ลิ้มสกุล, วท.ม.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สงศรี มหาสวัสดิ์, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราห์ เทพาคดี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปนเปื้อนและการลดปริมาณแบคทีเรียจากไข่อาร์ทีเมีย

Bacterial Contamination and Decontamination Attempt in *Artemia* cysts

โดย

นายเถลิงเกียรติ สมนึก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1455-1

เกลิงเกียรติ สมนึก 2549: การปนเปื้อนและการลดปริมาณแบคทีเรียจากไข่อาร์ทีเมีย
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชา
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นันทวิทย์ อารีย์ชน,
Ph.D. 72 หน้า
ISBN 974-16-1455-1

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา (premium, medium และ low grade) จีน รัสเซีย และ อิหร่าน พบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมและ vibrio ที่ปนเปื้อนในน้ำที่ใช้ฟักไข่อาร์ทีเมียมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.45×10^8 - 2.76×10^8 cfu/ml. และ 5.59×10^4 - 15.37×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียรวมและ vibrio ที่ปนเปื้อนตัวอ่อนระยะ Instar I มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.25×10^6 - 2.06×10^6 cfu/ml. และ 2.98×10^4 - 3.42×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่า ไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งต่างกันมีปริมาณแบคทีเรียรวมและ vibrio แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียกับตัวอ่อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I พบว่าไม่แตกต่างกัน และระดับการ ปนเปื้อนมีความสัมพันธ์กับคุณภาพการฟักของไข่อาร์ทีเมีย โดยไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งที่มีคุณภาพ การฟักดีจะมีการปนเปื้อนน้อยกว่าแหล่งที่มีคุณภาพการฟักต่ำกว่า ซึ่งการปนเปื้อน vibrio ดังกล่าว สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียได้ 5 ชนิด คือ *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*

การลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I โดยการแช่ในสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 2,500 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 15 วินาที สามารถลด ปริมาณเชื้อ vibrio ได้ทั้งหมดในขณะที่ต้องใช้สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และสารละลาย ฟอรัมาลินที่ระดับความเข้มข้นถึง 3,000 และ 3,500 พีพีเอ็ม ที่ระยะเวลาเท่ากัน ตามลำดับ จาก การศึกษาพบว่าไข่อาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียระยะ Instar I สามารถเป็นพาหะในการก่อโรคแก่กุ้ง- ทะเล แต่การปนเปื้อนดังกล่าวสามารถใช้สารเคมีลดการปนเปื้อนได้

เกลิงเกียรติ สมนึก
ลายมือชื่อนิติ


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

24 / มีค. / 49

Talerngkiat Somneuk 2006: Bacterial Contamination and Decontamination Attempt in *Artemia* cysts. Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Assistant Professor Nontawith Areechon, Ph.D.
72 pages.
ISBN 974-16-1455-1

Study on bacterial contamination in *Artemia* from different sources including USA (premium, medium and low grade), China, Russia and Iran was conducted. It was found that the total bacteria count and total *Vibrio* count from hatching water were 1.45×10^8 - 2.76×10^8 cfu/ml. and 5.59×10^4 - 15.37×10^4 cfu/ml. respectively which were significantly different ($p < 0.05$). Bacterial contamination in Instar I was enumerated to be 1.25×10^6 - 2.06×10^6 cfu/ml. and 2.98×10^4 - 3.42×10^4 cfu/ml. respectively which were not significantly different ($p > 0.05$). Bacterial isolation on TCBS revealed 5 species of *Vibrio* including *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. It was also found that the degree of contamination was related to the hatching quality. *Artemia* with high hatching quality had less bacterial contamination when compared with the low hatching quality ones.

Attempt of bacterial decontamination in *Artemia* cyst by hydrogen peroxide, formalin and calcium hypochlorite was also studied. Immersion of *Artemia* Instar I in 2,500 ppm of hydrogen peroxide for 15 seconds totally eradicated *Vibrio* spp. from the nauplii while it took 3,000 and 3,500 ppm for calcium hypochlorite and formalin respectively. It was clearly shown from this study that *Artemia* cyst can be a source of bacteria which many are pathogenic to shrimp. Decontamination of *Artemia* Instar I by disinfectant is an effective mode to reduce this contamination.

TALENGKIAT SOMNEUK

Student's signature

Nontawith Areechon 24 / 03 / 06

Thesis's Advisor signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นนทวิทย์ อารีย์ชน Ph.D. ประธานกรรมการที่ปรึกษา
อาจารย์สุนทรภรณ์ ลิ้มสกุล วท. ม. กรรมการสาขาวิชาเอก รศ. ส่องศรี มหาสวัสดิ์ วท. ม.
กรรมการสาขาวิชารอง ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ จนกระทั่ง
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นิตยา เลาหจินดา Ph. D. ผู้แทนบัณฑิต
วิทยาลัยที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำหรับน้ำใจ กำลังใจ และความช่วยเหลือของพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคน
และผู้ที่ข้าพเจ้าไม่สามารถกล่าวถึงที่มีส่วนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณกำลังใจของพ่อกับแม่และพี่สาว ที่ช่วยเหลือให้กำลังใจจนสามารถ
ผ่านพ้นอุปสรรคทั้งปวงตลอดระยะเวลาเรียนและทำการทดลองเสมอมา

เถลิงเกียรติ สมนึก

มีนาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
ผลการทดลอง	33
วิจารณ์ผลการทดลอง	46
สรุปผล	52
ข้อเสนอแนะ	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำฟักอาร์ทีเมีย	34
2	ปริมาณไวรัสในน้ำฟักอาร์ทีเมีย	35
3	ปริมาณแบคทีเรียรวมปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I	36
4	ปริมาณไวรัสปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I	38
5	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนไข่ และอาร์ทีเมียระยะ Instar I	39
6	คุณภาพการฟักของไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งต่าง ๆ	42
7	ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ปนเปื้อนหลังแช่ตัวอ่อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด	43
8	ปริมาณไวรัสหลังแช่ตัวอ่อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด	44
 ตารางผนวกที่		
1	เปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching Percentages) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ	70
2	ประสิทธิภาพการฟัก (Hatching Efficiency) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ	71
3	ความพร้อมเพรียงในการฟัก (Time synchronize) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อาร์ทีเมียเต็มวัย (1) ตัวผู้ (2) ตัวเมีย	4
2	ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำฟักไข่อาร์ทีเมีย	34
3	ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโอในน้ำฟักไข่อาร์ทีเมีย	35
4	ปริมาณแบคทีเรียรวมปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I	37
5	ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโอปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I	38
6	ปริมาณแบคทีเรียรวมหลังแช่อาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด	44
7	ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโอหลังแช่อาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด	45
ภาพผนวกที่		
1	เปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching Percentages) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ	70
2	ประสิทธิภาพการฟัก (Hatching Efficiency) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ	71
3	ความพร้อมเพรียงในการฟัก (Time synchronize) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ	72

การปนเปื้อนและการลดปริมาณแบคทีเรียจากไข่อาร์ทีเมีย

Bacterial Contamination and Decontamination Attempt in *Artemia* cysts

คำนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม สัตว์น้ำกร่อยตลอดจนสัตว์น้ำจืดบางชนิดมีการใช้ประโยชน์จากอาร์ทีเมียทั้งในรูปตัวอ่อนแรกฟักและตัวเต็มวัย ซึ่งในประเทศไทยโรงเพาะฟักสัตว์น้ำส่วนใหญ่นิยมใช้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมียระยะ Instar I อนุบาลสัตว์น้ำประเภท กุ้งกุลาดำ กุ้งขาว กุ้งก้ามกราม ปลาเก๋า ปลากะพง และปลาสวยงามอีกหลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลหลายประการ อาทิ มีคุณค่าทางอาหารสูง มีขนาดเล็กเหมาะสม และสามารถเก็บรักษาให้คงสภาพได้นานเมื่อต้องการก็นำมาเพาะฟักก็ได้ตัวอ่อนในระยะเวลาอันสั้นโดยไม่เสียคุณค่าทางอาหาร และสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของลูกสัตว์ทะเลระยะเมตามอโฟซิสได้

การที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้อาร์ทีเมียในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ซึ่งไข่อาร์ทีเมียส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ อาทิ สหรัฐอเมริกา จีน และรัสเซีย เป็นต้น ทั้งนี้จากหลากหลายของแหล่งที่มาของไข่อาร์ทีเมีย กระบวนการผลิต และการเก็บรักษา ย่อมส่งผลต่อการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียกับไข่อาร์ทีเมีก่อนเกษตรกรนำมาใช้ เมื่อนำไข่อาร์ทีเมียที่ปนเปื้อนดังกล่าวมาใช้ออนุบาลสัตว์น้ำย่อมเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายโดยเฉพาะอุตสาหกรรมโรงเพาะฟักกุ้งทะเล ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่มักสร้างความเสียหายเสมอ ๆ ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดเป็นกลุ่มที่ก่อปัญหาเด่นชัดที่สุดในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* บางชนิดสามารถทำลายสารโคติน ซึ่งเป็นสารประกอบในเปลือกสัตว์น้ำกลุ่มครัสตาเซีย และบางชนิดยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกลุ่ม *Penaeid* ทำให้มีการติดเชื้อโดยการแพร่เข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลสู่เนื้อเยื่อภายใน โดยลักษณะอาการจะปรากฏเหงือกมีสีดำ การเรืองแสง ครีบและระยางค์กร่อน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. damsela* และ *V. vulnificus* สามารถก่อโรคในปลาได้เช่นกัน (Austin and Allen, 1982)

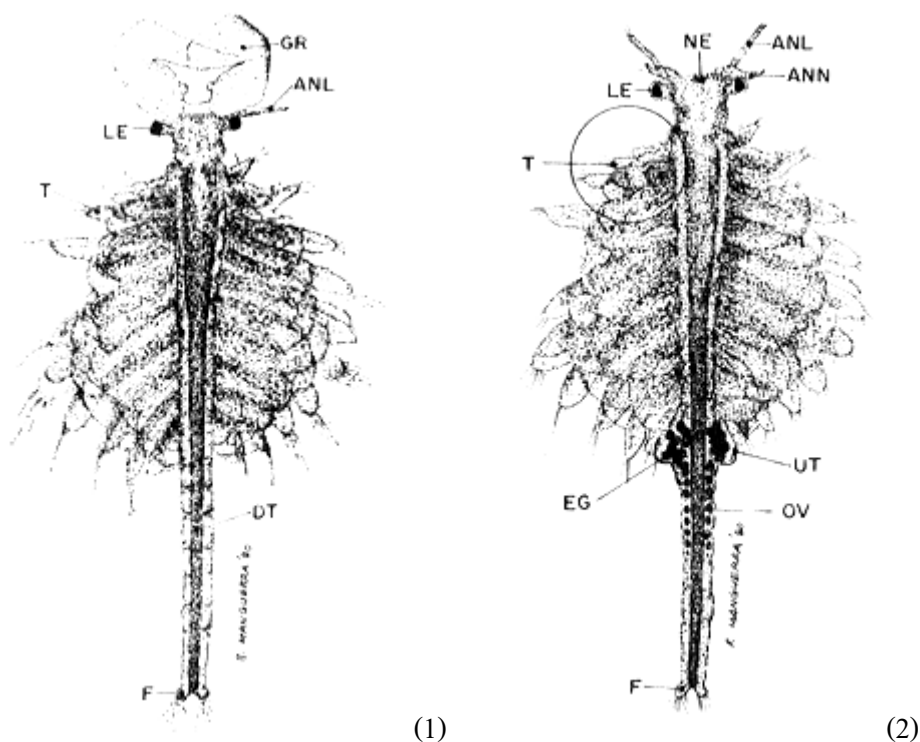
จากปัญหาดังกล่าว การทราบปริมาณและชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับ
ไข่อาร์ทีเมียและแนวทางป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำที่ปนเปื้อนมากับ
อาหารมีชีวิต ย่อมเป็นแนวทางในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ อีกทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิด
โรค ที่มีสาเหตุมาจากการใช้อาร์ทีเมียแรกฟักเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียในไขอาร์ทีเมีย
2. เพื่อศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. ที่ปนเปื้อนมากับไขอาร์ทีเมีย
3. เพื่อศึกษาการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. ที่ปนเปื้อนมากับไขอาร์ทีเมีย โดยใช้สารเคมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คลอรีน และ ฟอर्मาลิน

การตรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของอาร์ทีเมีย



ภาพที่ 1 อาร์ทีเมียเต็มวัย (1) ตัวผู้ (2) ตัวเมีย

ANN	= Antenna	ANL	= Antennula	NE	= Nauplius eye
GR	= Graspers (antenna)	LE	= Lateral eye	T	= Thoracopods
DT	= Digestive tract	UT	= Uterus, brood pouch	EG	= Eggs
F	= Furca	OV	= Ovaries with oocytes		

Artemia (อาร์ทีเมีย) ได้รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ครั้งแรกว่า *Cancer salina* (Linnaeus) ต่อมาในปี ค.ศ. 1819 Leach ได้ให้ชื่อสกุลว่า *Artemia* และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artemia salina* ทางอนุกรมวิธานจัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอดา ชั้นครัสเตเชีย อันดับอะนาสตาคา วงศ์อาร์ทีมิอิดี สกุลอาร์ทีเมีย (ลัดดา, 2540) อาร์ทีเมียไม่มีเปลือกแข็งแต่มีเพียงเนื้อเยื่อบาง ๆ หุ้มตัว ลำตัวแบนและเรียวยาวไปทางหาง ทำให้มีลักษณะคล้ายใบไม้ เคลื่อนที่โดยการว่ายน้ำ แบ่งร่างกายเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) 6 ปล้อง ปล้องแรกเป็นตาเดี่ยว (ocellus) ลักษณะกลมอยู่ด้านหน้ากึ่งกลางหัว มีตา

รวม (compound eyes) 1 คู่ มีก้านตาอยู่แต่ละข้างของหัวและมีริมฝีปาก (labrum) ปล้องที่ 2 มีหนวดคู่แรก (first antennae) ใช้รับความรู้สึก ปล้องที่ 3 มีหนวดคู่ที่ 2 (second antenna) ใช้ในการว่ายน้ำและกรองเพื่อรวบรวมอาหารเข้าสู่ปาก ปล้องที่ 4 มีระยางค์ทำหน้าที่เป็นกราม (mandibles) ช่วยโฉบพัดอาหารเข้าปาก กินอาหารขนาดเล็กทุกชนิดที่มีขนาดไม่เกิน 50 ไมครอน (ขนาดปากประมาณ 20-60 ไมครอน) โดยการกรอง (filter feeding) ปล้องที่ 5 มีระยางค์เป็นแผ่นคล้ายฟันคู่แรก (first maxillae) และปล้องที่ 6 มีระยางค์เป็นแผ่นคล้ายฟันคู่ที่สอง (second maxillae) ส่วนอก (thorax) 11 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ (appendages) ยาวปล้องละ 1 คู่ ระยางค์คู่ถัดไปยาวขึ้นเล็กน้อย และระยางค์ท้าย ๆ จะสั้นลงเล็กน้อย ซึ่งเป็นระยางค์อก (thoracopods) ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ เคลื่อนที่ หายใจ และกรองรวบรวมอาหาร ส่วนท้องและหาง (abdomen and tail) มี 8 ปล้อง แคบกว่าส่วนอกมาก ปล้องแรกเป็นที่ตั้งของอวัยวะเพศ ปล้องที่ 2-7 ไม่มี ระยางค์ ปล้องที่ 8 มีเพนหาง (cercopods) 1 คู่ (Vos, 1979)

อนันต์ (2543) รายงานว่าเพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย หนวดคู่ที่ 2 ของเพศผู้มีลักษณะคล้ายตะขอ อวัยวะเพศบริเวณปล้องแรกของส่วนท้องในเพศผู้จะมี penis หรือ graspers 1 คู่ ส่วนในเพศเมียจะมี uterus หรือ brood pouch

ลัดดา (2540) รายงานว่าอาร์ทีเมียสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สามารถออกไข่ได้ทั้ง ovoviviparous (ไข่ฟักออกเป็นตัวภายใน uterus ก่อนออกมาเป็นตัว uterus มักจะมีสีขาว) และ oviparous (ไข่ฟักออกเป็นตัวภายนอก uterus ก่อนออกมาเป็นไข่ uterus มักจะมีสีน้ำตาล) ซึ่งในแต่ละรอบการสืบพันธุ์ เพศเมียแต่ละตัวจะออกลูกเป็นตัวหรือเป็นไข่ได้เพียงแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น อาร์ทีเมียอายุประมาณ 1-3 เดือน สามารถสืบพันธุ์ได้หลายครั้งโดยทั่วไปอาร์ทีเมียจะมีความคงไข่ประมาณ 50-300 ฟอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่และสายพันธุ์ จะมีจำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม สามารถใช้อาร์ทีเมียอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนหรือเลี้ยงสัตว์น้ำได้โดยตรง ตัวอ่อนที่ห่อหุ้มด้วยเปลือก (*Artemia* cysts) สามารถเก็บให้คงสภาพมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานหลายปี เมื่อต้องการใช้น้ำไปเพาะฟักในระยะเวลาสั้น ๆ ก็จะได้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมียใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ตามต้องการ สะดวกต่อการใช้และการจัดการ อาร์ทีเมียแบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ คือ กลุ่มที่มีเฉพาะเพศเมีย ส่วนใหญ่พบในทวีปยุโรปและเอเชีย เรียกชื่อว่า *Artemia parthenogenetica* และต่อท้ายด้วยแหล่งที่พบ เช่น *A. parthenogenetica* Meva Lake, Africa เป็นต้น กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มี

สองเพศ คือ มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย เช่น *Artemia salina*, *A. tunisiana*, *A. urmiana*, *A. franciscana*, *A. persimilis* และ *A. monica* เป็นต้น

อาร์ทีเมียมีคุณค่าทางอาหารต่อสัตว์น้ำดังนี้

ระยะ	โปรตีน(%)	ไขมัน(%)	คาร์โบไฮเดรต(%)	เถ้า (%)
- ตัวอ่อน	52.2±8.8	18.9±4.5	14.8±4.8	9.7±4.6
- ตัวเต็มวัย	56.4±5.6	11.8±5.0	12.1±4.4	17.4±6.3

Leger *et al.* (1987)

Clegg and Conte (1980) รายงานว่าไข่อาร์ทีเมียที่เจริญในตัวแม่จะฟักออกเป็นตัว โดยเซลล์พัฒนาจากตัวอ่อนระยะแกสตรูลา (gastrula stage) ซึ่งตัวอ่อนในระยะนี้จะพักการเจริญเติบโตชั่วคราวและคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะพัฒนาต่อจนได้เป็นระยะเอ็มบริโอซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 3,000-4,000 เซลล์ แต่ถ้าอาร์ทีเมียอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเค็มจัด อุณหภูมิของน้ำสูงหรือต่ำเกินไป ปริมาณแร่ธาตุและอาหารไม่เหมาะสม ไข่อาร์ทีเมียในตัวแม่จะหยุดการเจริญของตัวอ่อนและจะสร้างเปลือกหุ้มป้องกันตัวในระยะเวลาแกสตรูลาไม่ให้เป็นอันตราย ซึ่งเปลือกหุ้มตัวอ่อนดังกล่าวมีลักษณะหนาแข็ง สามารถแลกเปลี่ยนก๊าซต่อตัวอ่อนเนื่องจากมีรูพรุนเป็นทางผ่านของอากาศและน้ำ ช่วยพองให้ซิสต์ลอยน้ำ โดยทั่วไปมีขนาดระหว่าง 200-300 ไมครอน ประกอบด้วยเปลือกหุ้ม 3 ชั้น คือ เปลือกชั้นโคเรียน (Chorion) เป็นชั้นที่มีความแข็งแรงและหนากว่าชั้นอื่น ๆ มีหน้าที่ป้องกันตัวจากอันตรายภายนอก รวมทั้งรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV rays) ประกอบด้วยสารพวกไลโปโปรตีน ไคติน และเฮมาทิน (Lipoprotein chitin และ Haematin) เฮมาทินมีไอออนของธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) เชื่อมหุ้มชั้นนอก (Outer cuticular membrane) เป็นชั้นที่ถัดจากเปลือกหุ้มชั้นโคเรียน มีหน้าที่ป้องกันไม่ให้ก๊าซที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าโมเลกุลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึมผ่านทำหน้าที่คล้ายเยื่อกรองเลือกผ่าน (Semipermeable membrane) เยื่อหุ้มตัวอ่อน (Embryonic cuticle) ลักษณะเป็นเยื่อบางใส ยึดหยุ่นได้มากมีเยื่อ Inner cuticular membrane หรือ Hatching membrane กันอยู่อีกชั้นหนึ่ง ไข่อาร์ทีเมียแห้ง (dry cysts) สามารถดูดซับน้ำ ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของซิสต์เพิ่มขึ้น (โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง) ซึ่งกระบวนการเมตาบอลิซึมต้องอาศัยแสงและออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญ โดยทำให้คาร์โบไฮเดรตที่สะสมไว้ในรูปของสารทรีฮาโลส (trehalose) ให้เป็นไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของตัวอ่อนและเปลี่ยนแปลงเป็นกลีเซอรอล (glycerol) สะสมไว้

ในเชื้อหุ้มชั้นนอก เมื่อกลีเซอรอลมีปริมาณมากขึ้น ตัวอ่อนหรือคัพภะจะสามารถดูดน้ำผ่านเชื้อหุ้มชั้นนอก ทำให้เกิดความดันออสโมติกภายในเชื้อหุ้มชั้นนอกมากขึ้นเรื่อย ๆ มากจนถึงระยะแตก (breaking stage) ซึ่งจะทำให้เปลือกหุ้มชั้นโคเรียนแตกออกไปด้วย กลีเซอรอลที่ถูกสะสมอยู่ก็จะถูกปล่อยออกไป เรียกว่า trehalose-glycerol hyperosmotic regulatory system ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เปลือกไข่แตกออกมาซึ่งเกิดขึ้นจากแรงดันออสโมติกจากการสูญเสียเกลือ ดังนั้นถ้าความเค็มของน้ำที่ใช้ในการเพาะฟักเพิ่มขึ้น กลีเซอรอลจะถูกสร้างให้มีปริมาณมากขึ้นทำให้ต้องใช้เวลาในการฟักมากขึ้น

อนันต์ (2543) รายงานว่าอาร์ทีเมียที่ฟักเป็นตัว (Instar I) มีความยาวประมาณ 0.4-0.52 มม. กว้างประมาณ 0.14-0.18 มม. น้ำหนักประมาณ 0.01 มก. เจริญเติบโตโดยการลอกคราบประมาณ 15 ครั้ง (7-15 วัน) มีความยาวประมาณ 7-15 มม. กว้างประมาณ 3-4 มม. น้ำหนักประมาณ 3-5 มก. เมื่อโตเต็มวัยอาร์ทีเมียจะมีขนาดต่างกันขึ้นอยู่กับเพศ ความสมบูรณ์ ลักษณะทางสายพันธุ์และความเค็ม อาร์ทีเมียมีขนาดช่องปากประมาณ 60 ไมครอน กินอาหารโดยการกรอง (Filtering feeder) ซึ่งการกินอาหารแบบดังกล่าวนี้จะไม่สามารถเลือกชนิดและประเภทอาหารได้ แต่จะกรองรวบรวมอาหารและทุกสิ่งในน้ำที่มีขนาดเล็กกว่าช่องปาก จนกระทั่งมีขนาด 1-3 ไมครอน ดังนั้นอาหารของอาร์ทีเมียจึงมีทั้งประเภทมีชีวิตและไม่มีชีวิต ได้แก่ ยีสต์ ไคอะตอม สาหร่ายเซลล์เดียว แบคทีเรีย รา ละอองดิน กากถั่ว มูลสัตว์ เป็นต้น โดยอาร์ทีเมียวัยอ่อน (nauplii) จะใช้หนวดในการกรองรวบรวมอาหารส่งผ่านเข้าสู่ mandible และทางเดินอาหาร ส่วนเมื่อโตเต็มวัย (adult) จะใช้ส่วนหนึ่งของระยะขาที่ส่วนนอกกรองรวบรวมอาหารที่มีขนาดเล็กตั้งแต่ 1-40 ไมครอน รวบรวมอาหารส่งเข้าสู่ช่องปาก และเข้าสู่ทางเดินอาหาร ซึ่งข้อได้เปรียบของตัวอ่อนอาร์ทีเมียในระยะ Instar I จะยังไม่กินอาหารเนื่องจากทางเดินอาหาร ปากและรูก้นของตัวอ่อนยังปิดอยู่ และอยู่ในช่วงใช้อาหารจากไข่แดง (yolk) ตัวอ่อนอาร์ทีเมียจะเริ่มกินอาหารโดยใช้หนวดคู่ที่ 2 (second antennae) รวบรวมอาหาร อาร์ทีเมียสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำความเค็มต่ำประมาณ 3-4 พีพีที จนกระทั่งความเค็มสูงกว่า 200 พีพีที (pH 7.5 - 9) แต่ในแหล่งน้ำธรรมชาติสามารถพบอาร์ทีเมียเฉพาะในทะเลสาบ หรือแหล่งน้ำที่มีความเค็มจัด มีรายงานการพบอาร์ทีเมียมากกว่า 50 สายพันธุ์ทั่วโลก ทั้งในเขตหนาว เขตอบอุ่น และเขตร้อน แต่ก็มีเพียง 10 กว่าแหล่งเท่านั้นที่มีปริมาณมากพอที่จะเก็บรวบรวมไปส่งออกจำหน่ายเป็นการค้าได้ เช่น จีน สหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และบราซิล เป็นต้น การรวบรวมเก็บรักษาไข่อาร์ทีเมีย มีขั้นตอนเริ่มจากการรวบรวมและล้างทำความสะอาดไข่อาร์ทีเมียที่ลอยตามคลื่นลมพัดหรือใช้เรือในการรวบรวม จากนั้นกรองแยกเศษขยะและตัวอาร์ทีเมียที่ตายทิ้งล้างทำความสะอาดสิ่งกรองที่เหลือแยกไข่ออกจากสิ่งเจือปนทั้งหมด โดยไข่อาร์ทีเมียจะจมในน้ำ

จืดและลอยได้ดีที่สุดในน้ำเค็มจนกระทั่งอิ่มตัว (ความเค็มมากกว่า 250 พีพีที) จากนั้นนำไขอาร์ทีเมียมาล้างเอาเกลือออกรวบรวมไปทำให้สะอาดก็นำไปตากในบริเวณแดดจัด (1-2 วัน) หรือใช้ลมร้อนเป่าจนแห้งประมาณ 2-48 ชั่วโมง การใช้ลมเป่าสามารถแยกสิ่งเจือปนและไขออกจากกัน วิธีการดังกล่าวทำให้ไขมีความชื้นอยู่ระหว่าง 7-12% และขั้นตอนสุดท้ายการเก็บรักษาไขนิยมกันมี 3 วิธี คือ การเก็บในสุญญากาศ (vacuum pack) ถุงที่บรรจุไนโตรเจน (nitrogen pack) และเก็บในที่ซึ่งมีความชื้นและออกซิเจนน้อยที่สุด

2. การเพาะฟักไขอาร์ทีเมีย

อนันต์ (2543) ได้เรียบเรียงวิธีการเพาะฟักและเก็บเกี่ยวตัวอ่อนอาร์ทีเมียไว้มีขั้นตอนดังนี้ คือฟักไขอาร์ทีเมียในน้ำมีความเค็ม 10-35 พีพีที อัตราประมาณ 1-5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลา ระยะเวลาเพาะฟักนานประมาณ 15-48 ชั่วโมง ปริมาณการฟักเป็นตัวอ่อนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณภาพของไขและสายพันธุ์เป็นสำคัญ ใส่สารเคมีในอัตราที่เหมาะสมก่อนนำไปให้เป็นอาหารสัตว์น้ำ เพื่อฆ่าเชื้อโรค ลดปริมาณแบคทีเรียหรือพาราสิตซึ่งอาจจะติดมากับไขอาร์ทีเมีย เมื่อฟักอาร์ทีเมียแล้วประมาณ 24-36 ชั่วโมง จึงเติมเกลือหรือน้ำเกลือเข้มข้นลงในถังเพาะฟัก เพื่อเพิ่มความเค็มของน้ำในถังให้มีความเค็มสูงเท่าความเค็มของน้ำในบ่อดินที่จะนำไปปล่อยลงเลี้ยง ซึ่งใช้ระยะเวลาในการปรับความเค็มให้สูงขึ้นประมาณ 12 ชั่วโมง การเก็บเกี่ยวตัวอ่อนอาร์ทีเมียมีขั้นตอนดังนี้ ขึ้นแรกโดยการฟอกหรือละลายเปลือกไขออกก่อนที่จะนำไปเพาะฟัก จากนั้นใช้ความเค็มหยุดการเพิ่มฟองอากาศในถังเพาะฟักประมาณ 1-3 นาที เปลือกไขจะลอยขึ้นที่ผิวน้ำแล้วทิ้งเปลือก (ไขอาร์ทีเมียจะลอยได้ดียิ่งขึ้นในน้ำที่มีความเค็มสูงมากขึ้น) ตัวอ่อนยังคงว่ายอยู่ในน้ำ และการใช้แสงล่อตัวอ่อนอาร์ทีเมียที่ใส่ไว้ในถังที่บดแสงจะว่ายผ่านรูหรือช่องเข้าสู่บ่อหรือถังที่โปร่งแสง ส่วนเปลือกไขก็ยังอยู่ในบ่อหรือถังที่บดแสง

3. การประเมินคุณภาพการฟักไข่อาร์ทีเมีย (Sorgeloos *et al.*, 1986) มีดังนี้

- ประสิทธิภาพการฟัก (Hatching Efficiency = HE) หมายถึง จำนวนตัวอ่อนจากการฟักไข่อาร์ทีเมีย 1 กรัม การคำนวณ ประสิทธิภาพการฟัก

$$HE = N \times 2,000 \text{ ตัว} / \text{ไข่ 1 กรัม} \quad (N = \text{จำนวนอาร์ทีเมียระยะ Instar I})$$

- เปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching Percentage = HP) หมายถึง ตัวอ่อนที่ได้จากการฟักของไข่ดี (full cyst) 100 ฟอง การคำนวณ เปอร์เซ็นต์การฟัก

$$HP = [N / (N + U + FC)] \times 100\%$$

N แทน จำนวนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

U แทน จำนวนอาร์ทีเมียระยะ Umbrella

FC แทน จำนวนไข่อาร์ทีเมีย Full cyst

- อัตราการฟัก (Hatching Rate = HE) หมายถึง ระยะเวลาที่ได้ตัวอ่อนตัวแรกถึงเวลาที่ตัวอ่อนทั้งหมด มีค่าต่าง ๆ ดังนี้

T0 = ระยะเวลาจากเริ่มทำการเพาะฟักถึงเวลาที่ได้ตัวอ่อนตัวแรก

T10 = ระยะเวลาจากเริ่มทำการเพาะฟักถึงเวลาที่ได้ตัวอ่อน 10% ของจำนวนทั้งหมด

T90 = ระยะเวลาจากเริ่มทำการเพาะฟักถึงเวลาที่ได้ตัวอ่อน 90% ของจำนวนทั้งหมด

$$Ts = T90 - T10$$

หากค่าที่ได้มีค่าต่ำแสดงว่าไข่อาร์ทีเมียใช้เวลาในการฟักสั้นทำให้ได้ตัวอ่อนระยะเดียวกัน หากค่าที่ได้มีค่าสูงส่งผลให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาเป็นระยะอื่นได้

4. การปนเปื้อนของไข่อาร์ทีเมีย

Austin and Allen (1982) รายงานการแยกชนิดและนับจำนวนแบคทีเรียจากไข่อาร์ทีเมีย (dry cysts) ซึ่งตรวจพบแบคทีเรียประเภท Aerobic และ Heterotrophic bacteria มีความหนาแน่น

2.3×10^5 เซลล์แบคทีเรียต่อไข่อาร์ทีเมีย 1 กรัม เมื่อนำมาจำแนกชนิดปรากฏเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบรวมทั้ง *V. parahaemolyticus* ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในเปลือกไข่อาร์ทีเมียและน้ำหลังการเพาะฟักไข่อาร์ทีเมียสายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย (Californian brine shrimp) สอดคล้องกับรายงานของ (Igarashi *et al.*, 1989) ซึ่งตรวจพบแบคทีเรียชนิดก่อโรครวมทั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio* ที่ปนเปื้อนมาจากไข่อาร์ทีเมียตัวอย่าง 14 ยี่ห้อ ที่มีจำหน่าย (Gatesoupe, 1993)

Lopez-Torres and Lizarraga-Partida (2001) ได้รายงานการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากไข่อาร์ทีเมียทางการค้าโดยสุ่มตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากที่มีจำหน่ายจำนวน 24 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบปริมาณแบคทีเรีย 10^6 - 10^8 cfu/ml. โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 95% ซึ่งการเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมียดังกล่าวได้ทำในสภาพปลอดเชื้อ (laboratory) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมียในสภาพโรงเพาะฟักพบว่า ปริมาณแบคทีเรียแกรมลบมีอัตราส่วนเท่ากับ 100% เมื่อทำการจำแนกชนิดด้วยแถบแยกชนิดแบคทีเรียและการทดสอบทางชีวเคมี พบแบคทีเรียที่ปนเปื้อนคือแบคทีเรียชนิด *Vibrio* spp., *V. alginolyticus*, *V. pelagius* และ *V. vulnificus*

5. การจำแนกเชื้อ *Vibrio*

Vibrio (*Vibrio* spp.) เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมทั้งน้ำจืดและเจริญเติบโตได้ดีในทะเล มีการตรวจพบอาศัยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในทางเดินอาหาร (alimentary tracts) ของสัตว์หลาย ๆ ชนิดรวมถึงกุ้งทะเลบางชนิด (Yasuda and Kitao, 1980) และแบคทีเรียบางชนิดดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายในสภาพแวดล้อม บางชนิดสามารถก่อโรคในมนุษย์ รวมทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. metschnikovii* นอกจากนี้ยังพบว่า *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. ordalii* และ *V. vulnificus* จัดเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคในปลาเช่นกัน (Austin and Allen, 1982) และบางชนิดยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกลุ่ม *Penaeid* อีกด้วย (Lightner, 1988) แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* จัดเป็นแบคทีเรีย แกรมลบอยู่ในครอบครัว *Vibrionaceae* มีลักษณะเซลล์เป็นแท่งตรงหรือโค้งงอ (rods) มีความกว้างของเซลล์ประมาณ 0.5-0.8 ไมครอน ยาว 1.4-2.6 ไมครอน บางชนิดอาจมีแฟลกเจลลัมจำนวนมากบริเวณด้านข้างของเซลล์เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) เมื่อทำการทดสอบ oxidase test ให้ผลเป็นบวก และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส บางชนิดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเกือบทั้งหมดของแบคทีเรีย *Vibrio* สามารถเจริญได้ดีใน

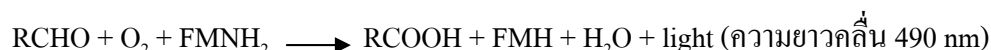
อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) มีคุณสมบัติเป็น selective media เมื่อมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง มีขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของแต่ละสายพันธุ์ (Cowan, 1975) ในสภาพการเจริญในอาหารเหลว (liquid media) แบคทีเรีย *Vibrio* จะมี polar flagellum ที่มีปลอกหุ้มเพียง 1 เส้น ใช้ในการเคลื่อนที่บางครั้งอาจพบ polar flagellum เพิ่มขึ้นเป็น 3 เส้น (Bauman *et al.*, 1972)

5.1 ชนิดของเชื้อสกุล *Vibrio* ที่สำคัญกล่าวโดยสังเขป ดังนี้คือ

5.1.1 *V. harveyi*

แบคทีเรียชนิด *V. harveyi* จัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเรืองแสง (luminascence) ในสภาพ ต่าง ๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Vibrio* หลายชนิด เช่น *V. cholerae* (biotype *albansis*) (ลิลาและคณะ 2539), *V. fisheri* (Schmetterer *et al.*, 1986), *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* sp. บางสายพันธุ์ (Mohny *et al.*, 1994), *V. splendidus* (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้มีเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Aldehyde และ Flavin mononucleotide (FMNH₂) และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปพลังงานแสง ซึ่งมีความยาวคลื่น 490 nm ทำให้ปรากฏมีสีเขียวแกมเหลืองออกมา (Ziegler and Baldwin, 1981) ดังสมการการเกิดการเรืองแสงของ *V. harveyi*

Luciferase



หมายเหตุ ; RCHO คือ อัลดีไฮด์คาร์บอนอะตอมต่อกันเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 7-9 คาร์บอนอะตอม (straight-aliphatic moiety)

จากรายงานพบว่า โดยทั่วไปแบคทีเรียเรืองแสงบางชนิดเท่านั้นที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้แก่ *V. harveyi*, *V. splendidus* และบางสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *V. harveyi* สร้างความเสียหายอย่างหนักต่อการเพาะและอนุบาลกุ้งในแถบประเทศที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยมีผลทำให้กุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักและอนุบาลเกิดโรคที่เรียกว่า โรคเรืองแสงหรือโรคเพชรพลอย (Luminous หรือ Diamond Disease) โดย

ลักษณะอาการของลูกกุ้งที่มีการติดเชื้อเรืองแสง ลูกกุ้งที่ป่วยเป็นโรคจะไม่ว่องไวในการว่ายน้ำ การเคลื่อนที่ช้าลง กล้ามเนื้อบริเวณช่องท้องจะมีสีขาวขุ่น อ่อนแอ กินอาหารน้อยลง จมลงสู่ก้น บ่อ และตายภายใน 1-2 วัน ภายหลังจากพบอาการ อัตราการตายจะเพิ่มสูงขึ้นจาก 20% ถึง 100% และมีแสงคล้ายหิ่งห้อยลอยตัวขึ้นลงตามการเคลื่อนไหวของกุ้ง (Raungpan and Kitao, 1991)

Lavilla-Pitogo *et al.* (1990) ได้รายงานถึงสาเหตุการตายของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่เกิดขึ้นในฟาร์มอนุบาลในเกาะ Panay ประเทศฟิลิปปินส์ ว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* และ *V. splendis* ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้งในตัวกุ้งและน้ำตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่ง ซึ่งจากการทดลองแช่ลูกกุ้งกุลาดำระยะต่าง ๆ ด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดเรืองแสงที่แยกได้จากลูกกุ้งระยะ Postlarva ที่เป็นโรค ที่ระดับความเข้มข้นแบคทีเรีย 10^2 และ 10^3 cfu/ml. พบว่าลูกกุ้งกุลาดำทุกระยะ (Zoea Mysis และ Postlarva) มีอัตราการตายสูงกว่าลูกกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับการแช่ด้วยเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ภายใน 48 ชั่วโมง

Karunasagar *et al.* (1994) ยังพบว่า *V. harveyi* เป็นสาเหตุการตายของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในโรงเพาะฟักและอนุบาลในประเทศอินเดีย ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 70-90% โดยทำให้เกิดการตายอย่างรุนแรงในลูกกุ้งระยะ Zoea Mysis และ Postlarva ซึ่งพบว่าลูกกุ้งที่ป่วยจะแสดงอาการเรืองแสงเมื่อสังเกตโดยการใช้อัลตร้าไวท์ไลท์ การติดเชื้อดังกล่าวสามารถเกิดได้บริเวณแอ่งเลือด (haemocoel) ซึ่งสามารถตรวจพบแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมากส่งผลให้ลูกกุ้งตายในที่สุด ซึ่งมีรายงานการติดต่อของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงโดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่สามารถเจริญและตกค้างบริเวณท่อที่ใช้ในการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ผนังบ่ออนุบาล และท่ออากาศภายในบ่อเพาะและอนุบาลกุลาดำ

5.1.2 *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งโค้ง มีความยาว 1-3 ไมครอน กว้าง 0.4-0.5 ไมครอน สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม NaCl 2-4% แต่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl 3% เชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 5-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม 37.5 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 5-11 และช่วงที่เหมาะสม คือ 7.5-8.5 เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏบนผิวอาหาร

เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ โคโลนีทึบแสง มีจุดกลางโคโลนีสีเข้ม (Clair, 1970; Twedt, 1969) แบคทีเรียชนิดดังกล่าวสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งต่าง ๆ ทั้งในสภาพแวดล้อมแถบชายฝั่งทะเล เขตน้ำกร่อย ตะกอนดิน รวมทั้งปลาทะเล หอยและสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียในหลาย ๆ พื้นที่ทั่วโลก ซึ่งแบคทีเรียที่พบมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่อระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่ทำให้เกิดโรคร้ายในรูปร่าง (Enteropathogenic bacteria) สามารถสร้างเอนไซม์ฮีโมไลซิน ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงในคนแตก (hemolysis) (Miyamoto *et al.*, 1962) เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเหลวจะสร้างแฟลกเจลลัมที่มีเยื่อหุ้มขนาดใหญ่ 1 เส้น ติดอยู่กับส่วนของ Outer membrane ของเซลล์ อวัยวะนี้แบคทีเรียจะใช้ในการเคลื่อนที่ แบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังจากถูกถ่ายจากอาหารเหลวลงสู่อาหารแข็งโดยจะหยุดการแบ่งเซลล์และเริ่มยืดขยายตัวออกจากความยาวประมาณ 30 ไมครอน เป็น 40 ไมครอน พร้อมกับสร้างแฟลกเจลลัมจำนวนมาก ซึ่งมีโครงสร้างต่างไปจากโพลาร์แฟลกเจลลัม โดยพบว่าไม่มีส่วนหุ้ม เรียกว่า “lateral flagellum” เรียงรายอยู่รอบ ๆ เซลล์ ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียบนผิวอาหารแข็ง (Shinoda and Okamoto, 1977) ในทางตรงกันข้ามเมื่อย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเหลว แบคทีเรียจะเริ่มแบ่งเซลล์ พร้อมกันนั้นจะหยุดการสร้าง lateral flagellum และส่วนที่เหลือจะถูกสลัดให้หลุดออกไปในสภาพแวดล้อมดังกล่าว (Belas and Colwell, 1982)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถพบ *V. parahaemolyticus* โดยมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้งทะเลชนิดต่าง ๆ เช่น โรคติดเชื้อที่เกิดกับกุ้ง *Penaeus aztecus* (brown shrimp) บริเวณอ่าวเม็กซิโก (Vanderzant *et al.*, 1970) เช่นเดียวกับการเกิดโรคในกุ้งขาว *P. vannamei* (Boone) ในบริเวณพื้นที่อ่าว Guayaquil ประเทศเอกวาดอร์ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Chanratchakool (1992) และ Ruangpan (1995) ซึ่งทำการสำรวจชนิดแบคทีเรียจากพื้นที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย พบว่า *V. parahaemolyticus* จัดเป็นแบคทีเรียชนิดที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เด่นชัดที่สุด

5.1.3 *V. alginolyticus*

V. alginolyticus เป็นแบคทีเรียที่มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในทะเล และมักพบเสมอภายหลังการแยกชนิดของเชื้อจากปลา หอย และอาหารทะเลหลายชนิด (Chan *et al.*, 1989) และยังเป็นแบคทีเรียที่มักแยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเสมอ ๆ (กุลวรา, 2534; ศุภชัย, 2538 และ Ruangpan, 1995) อีกทั้งยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ ซึ่ง

สามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้เป็นปริมาณมากในส่วนของ Hepatopancreas และน้ำเลือด จากตัวอย่างของกุ้งที่ป่วย (Ruangpan, 1995) และจากการศึกษาของ ธนาทิพย์ และคณะ(2537) ได้ทำการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50% ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง คือ 5.1×10^5 cfu/ml. และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของกุ้งกุลาดำที่ตาย ภายหลังการฉีดด้วยสารละลายแบคทีเรีย พบว่ากุ้งที่ผ่านการฉีดมีการเกิดโนดูล (nodule formation) จำนวนมากล้อมรอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย โดยมีเม็ดเลือด (Haemocyte) เข้ามารวมกลุ่มเพื่อกำจัดเซลล์ที่ถูกทำลาย และยังพบการสะสมของเม็ดสี (Melanization) บริเวณที่เกิดบาดแผลอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อชนิด *V. alginolyticus* ยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศมาเลเซียและกุ้งขาว *P. vannamei* ที่เลี้ยงในบ่ออนุบาลในประเทศเอกวาดอร์เช่นกัน (Mohney *et al.*, 1994)

5.1.4 *V. anguillarum*

Disulvo *et al.* (1973) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. anguillarum* เป็นสาเหตุการตายของหอยนางรมยักษ์อ่อน (*Crassostrea gigas*) ในประเทศญี่ปุ่น เมื่อสกัดสารจากหอยที่ตายพบว่ามีสารพิษ (Enterotoxin) ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำและทนความร้อนได้ โดยเอนไซม์ที่ได้เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากแบคทีเรียดังกล่าวสังเคราะห์ขึ้น

5.1.5 *V. cholerae*

V. cholerae เป็นแบคทีเรียที่สามารถแพร่กระจายได้ในน้ำอุ่นที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ โดยเฉพาะชายฝั่งที่อยู่ใกล้ปากแม่น้ำ โดยเชื้อ *V. cholerae* ก่อให้เกิดอหิวาตกโรคในคน โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถหลั่งสารพิษ (Endotoxin) ซึ่งมีผลต่อระบบทางเดินอาหาร โดยสารพิษดังกล่าวสามารถกระตุ้นเยื่อบุลำไส้ของลำไส้เล็กให้หลั่งสารพวกเกลือแร่ เช่น น้ำ แร่ธาตุและความ เป็นกรดเป็นด่างในร่างกาย หากมีการสูญเสียมากเกินไปความสามารถที่ลำไส้เล็กจะดูดกลับเข้าไปได้ สารเหล่านี้จึงถูกขับออกมาทำให้เกิดอุจจาระร่วง (Hood *et al.*, 1983)

5.1.6 *V. fluvialis*

Fumiss *et al.* (1977) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. fluvialis* ได้จากแหล่งน้ำในธรรมชาติและให้ชื่อว่า *Marine Aeromonas* ต่อมาตรวจพบว่าเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของหอยที่เลี้ยงในรัฐ Louisiana และ Pacific Northwest ซึ่งสามารถแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุและมีการตั้งชื่อใหม่ภายหลังว่า Group EF- 6 (Hug *et al.*, 1980) และ *V. fluvialis* (Lee *et al.*, 1981) ตามลำดับ

5.1.7 *V. mimicus*

Kaneko and Colwell (1973) จัดเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. mimicus* เป็นแบคทีเรียน้ำเค็มประจำถิ่น (Normal marine flora bacteria) เช่นเดียวกับเชื้อ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* (Devis *et al.*, 1981) รายงานว่า *V. mimicus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ซึ่งผู้ป่วยจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ มีไข้ และอาจถ่ายเป็นเลือด เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตสารพิษที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารพิษจากเชื้อ *V. cholerae* (Cholera toxin)

5.1.8 *V. vulnificus*

แบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเส้นดำในกุ้งกุลาดำ (Black splint หรือโรค Melanosis) ถึงแม้จะไม่ทำให้เกิดการตายอย่างรุนแรงแต่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจพอสมควร เนื่องจากกุ้งที่เป็นโรคเส้นดำจะมีการสะสมของเม็ดสีเมลานินฝังลึกลงไปในส่วนของกล้ามเนื้อ เมื่อนำไปผ่านการประกอบอาหารจะเห็นเป็นสีดำแทรกอยู่ ไม่น่ารับประทาน และไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (Limsuwan, 1993) โดยอาการเส้นดำที่เกิดขึ้นมักจะพบในบริเวณกล้ามเนื้อบริเวณส่วนท้อง การติดเชื้อจะเป็นแบบเรื้อรัง เป็นผลให้กุ้งมีการตอบสนองโดยสร้างสารสีดำขึ้นในบริเวณนั้น (พรเลิศ และคณะ, 2537)

Holis *et al.* (1976) รายงานว่าแบคทีเรียชนิด *V. vulnificus* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสโดยเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า “ Lactose positive vibrio ” สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ ในปูและหอยนางรม โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารพิษแพร่กระจายไปยังกระแสโลหิตซึ่ง

ก่อให้เกิดการติดเชื้อภายในระบบหมุนเวียนโลหิต (Primary septicemia) โดยที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อทางบาดแผลหลังจากที่สัมผัสกับน้ำทะเลหรือสัตว์ทะเล และการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดดังกล่าวเข้าไปส่งผลให้มีอัตราการตายสูงถึง 50% (Johnson, 1968)

จากรายงานของ Alday-Sanz and Turnbull (1996) ทำการศึกษา การติดเชื้อของแบคทีเรียชนิด *V. vulnificus* biotype I ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่เป็นโรค ในกุ้งกุลาดำระยะก่อนเต็มวัย (juvenile) ซึ่งทำให้กุ้งได้รับเชื้อ 3 วิธี จากการฉีด การกินและการแช่ พบว่ากุ้งที่ได้รับเชื้อทั้ง 3 วิธี มีผลต่อกุ้งทดลองคล้าย ๆ กัน คือ แบคทีเรียจะเข้าทำลายบริเวณเยื่อเหงือก ผิวลำตัว ตลอดจนระยางค์ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการกระบวนการ Phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาดักจับแบคทีเรียและสามารถพบการสะสมตัวของเม็ดเลือดในบริเวณ Hepatopancreas ลำไส้ส่วนของไส้ติ่ง (Caecum) หัวใจและ Lymphoid organ

จากการศึกษาของ Chanratchakool (1992) พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่พบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงในจังหวัดสมุทรสาครและจันทบุรี ซึ่งถึงแม้จะพบได้ค่อนข้างยาก แต่ก็สามารถแยกแบคทีเรียชนิดนี้และพบอาการของโรคเลียนดำได้ในช่วงที่ความเค็มเหมาะสม ซึ่งตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษาลักษณะความเค็มของน้ำมีค่าสูงกว่าระดับที่เหมาะสมของแบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญได้เป็นผลให้ตรวจพบ *V. vulnificus* ได้น้อย นอกจากนี้ Bird (1992) ได้รายงานว่า *V. vulnificus* เป็นสาเหตุของการตายของคนที่เกิดขึ้นในมลรัฐ New South Wales ประเทศออสเตรเลียจากการบริโภคหอยนางรมที่มีการปนเปื้อนของ *V. vulnificus* เป็นผลให้ผู้บริโภคเกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงและเป็นสาเหตุให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตดังกล่าวอีกด้วย

5.1.9 *V. natriegenes*

V. natriegenes มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อชนิดนี้ได้ทั่วไปบริเวณเขตชายฝั่งทะเล ซึ่งเชื่อดังกล่าวสามารถใช้สารประกอบคาร์บอนในการเจริญเติบโตของโคโลนี และสามารถเจริญได้ในความเค็มช่วงกว้าง (Baumann et al., 1972)

5.1.10 *V. costicola*

Ventosa *et al.* (1982) พบว่าแบคทีเรียชนิด *V. costicola* ต้องการ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 2% สำหรับการเจริญเติบโตและระดับที่เหมาะสมที่สุดคือ 5%

6. การเกิดโรควิบริโอซิส (Vibriosis) ในกุ้งกุลาดำ

Vibriosis หมายถึง โรคที่เกิดแบบ Septicemia จากแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (พรเลิศ และคณะ, 2537) เมื่อแบคทีเรียแพร่เข้าสู่ระบบเลือด ทำให้มีอาการสีตัวจางลง มีการพ่นมว ของกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะกล้ามเนื้อท้อง การแข็งตัวของเลือดจะช้าลง การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่นประสบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคในระหว่างการเลี้ยง ทั้งนี้เป็นผลจากปริมาณสารอินทรีย์และอนินทรีย์มีสาเหตุจากการให้อาหารที่มากเกินไป (Over feeding) และสิ่งขับถ่ายจากตัวกุ้งเอง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำทำให้งุ้งต้องมีการปรับตัวส่งผลให้งุ้งเกิดสภาวะความเครียดและอ่อนแอ เกิดโรคได้ง่ายนอกจากนี้ปริมาณสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ยังเป็นแหล่งอาหารของเชื้อโรคต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ในน้ำเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ออกาสที่กุ้งจะได้รับเชื้อและเกิดโรคได้ง่ายขึ้น โดยกลุ่มที่เป็นสาเหตุที่พบได้เสมอ คือ โปรโตซัว เชื้อราและกลุ่มไวรัส ได้แก่ YHV และ WSSV ซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่มที่ได้สร้างความเสียหายอย่างหนักและรุนแรงที่สุด นอกจากนี้กลุ่มของแบคทีเรียที่มักก่อความเสียหายเสมอ ๆ ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Vibrio* spp. โดยเฉพาะวิบริโอจัดเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ก่อปัญหาเด่นชัดที่สุดในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยทำให้เกิดการตายอย่างกว้างขวางและสร้างความเสียหายต่อผลผลิตเป็นอย่างมาก (Alday -Sanz and Turnbull, 1996) และมักพบว่าปริมาณวิบริโอเพิ่มจำนวนสูงสุดในช่วงเดือนที่ 3-4 ซึ่งเป็นระยะท้าย ๆ ของการเลี้ยง (Ruangpan and Prapadsorn, 1996)

โรควิบริโอซิสที่เกิดขึ้นในกุ้งกุลาดำนั้นมีสาเหตุมาจากวิบริโอหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. damsela* (Nash *et al.*, 1992) ซึ่งจัดเป็นชนิดที่ก่อโรคในบ่อเลี้ยงและ *V. harveyi* เป็นชนิดที่ก่อโรคในลูกกุ้งวัยอ่อนในส่วนของโรงเพาะฟักและอนุบาล (Boonyaratapalin, 1990; Karunasagar *et al.*, 1994) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ก่อโรคแบบฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) (Mohny *et al.*, 1994; Pizarro and Alfaro, 1994) โดยลักษณะอาการของการติดเชื้อที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของชนิดเชื้อโรค โดยผลจากการติดเชื้อจะแสดงลักษณะอาการต่างกันไปเช่น การเกิดแผลกร่อนบริเวณ

ส่วนภายนอกของร่างกาย เช่น เหงือก เปลือก ระบายค์ หรือเกิดการติดเชื้อภายในร่างกาย เช่น ทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ (enteritis) ตับ และตับอ่อนอักเสบ (Hepatopancreatitis) หรือเกิดการติดเชื้อในลักษณะที่เชื้อโรคแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยอาศัยระบบการหมุนเวียนของเลือด (Septicemia) และทำให้เกิดการตายในที่สุด (Liu, 1989)

องอาจ (2536) ตรวจพบอาการซีเหงือกมีสีดำและเกิดบาดแผลที่เปลือกชั้นคิวติเคิลและบริเวณส่วนปลาย Ventrolateral carapace บริเวณด้านท้องมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อยจากการแพร่กระจายของเมลาโนฟอร์บริเวณขาเดินและขาว่ายน้ำทำให้มีสีแดง เนื่องมาจากการแพร่กระจายของรงควัตถุเอริโทรฟอร์ และจะไม่กินอาหาร ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นภายนอกน้อยลงและเสียชีวิตไป ถึงแม้มีอาการดังกล่าวปรากฏส่วนใหญ่จะอยู่ตรงบริเวณขอบบ่อและจะตายในเวลาต่อมา การเปลี่ยนแปลงกับอวัยวะภายใน มีการอักเสบขึ้นที่ตับและตับอ่อน ลำไส้มีของเหลวคล้ายน้ำมันอยู่ภายใน ในกรณีการติดเชื้อบริเวณกล้ามเนื้ออาจเกิดจุดดำหรือรอยดำขึ้น (Ruangporn and Kitao, 1991)

ชลอ (2535) รายงานอาการของโรคตายเฉียบพลัน ซึ่งพบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ของกุ้งขนาดเล็กโดยที่อาการยังไม่แสดงออกมาให้เห็นเด่นชัดเหมือนกับกุ้งขนาดใหญ่ และจะพบได้หลังจากการเลี้ยงกุ้งประมาณ 25-30 วัน มักจะพบกุ้งตายตามขอบบ่อ ลักษณะของกุ้งตายไม่พบสิ่งผิดปกติบนลำตัวและเหงือก แต่หนวดมักจะขาดและไม่มีอาหารในลำไส้ โรคนี้สืบทอดมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ซึ่งเจริญได้ดีที่ความเค็มต่ำ และพบในช่วงฤดูฝน มักจะพบจุดสีดำหรือเส้นดำในกล้ามเนื้อ บริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกแต่ละปล้อง หรือบริเวณใต้เพนหางเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยมีเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (haemocyte) ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นมีการสร้างเมลานินรอบ ๆ

ลิลา (2530) ได้รายงานอาการของโรคเรืองแสงที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบในกุ้งแชบ๊วย กุ้งกุลาดำ และกุ้งก้ามกราม ส่วนใหญ่จะพบแพร่หลายในโรงเพาะฟักและอนุบาล โดยจะมีอัตราการตาย 70 -100% ขึ้นอยู่กับขนาดของลูกกุ้ง โดยจะมีการเรืองแสงในน้ำทะเลที่เลี้ยงลูกกุ้งและตัวกุ้งในเวลากลางคืน ซึ่งสามารถสังเกตได้จากมีเศษอาหาร ขยะ ตะกอน ติดตามระบายค์และตัวขาวขุ่น

กุลวรา (2534) ได้ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total Plate Count ;TPC) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.19×10^6 ถึง 3.33×10^6 cfu/ml. และปริมาณเชื้อไวรัสเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 0.65×10^2 cfu/ml. ถึง 1.22×10^4 cfu/ml. และยังพบว่า เมื่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อไวรัสอยู่ในระดับ 10^4 ถึง 10^6 และ 10^3 cfu/ml. ขึ้นไป ตามลำดับ กุ้งมักจะแสดงอาการของโรคออกมาให้เห็นและมักเกิดในช่วงคุณภาพน้ำไม่ดี โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งป่วยคือ *V. alginolyticus*, *V. harveyi* และ *Pseudomonas* sp. โดยกุ้งจะแสดงอาการระยางค์กร่อนดำ ขาวขุ่นและหางบวมน้ำมีเมลานินแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเหงือก เซลล์เหงือกตาย กุ้งมีอาการลอยหัวเกาะขอบบ่อและตาย นอกจากนี้ยังตรวจพบ Filamentous bacteria , Filamentous algae, *Zoothamnium* sp. , *Epistylis* sp., *Acineta* sp. และ *Euphelota* sp. เกาะตามเหงือก ผิวเปลือกและระยางค์อีกด้วย ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *Flavobacterium*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* และ *Pseudomonas* sp.

Prayitno and Latchford (1995) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคเรืองแสงอย่างรุนแรงในกุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักและอนุบาลในประเทศอินโดนีเซีย โดยพบว่า เชื้อก่อโรคคือ *V. harveyi* และ *Photobacterium phosphoreum* ซึ่งเชื่อดังกล่าวทำให้เกิดโรคในอาร์ทีเมียวัยอ่อนและกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในระดับ 10^4 และ 10^3 cfu/ml. ตามลำดับ และยังพบว่าความรุนแรงของ *V. harveyi* มีความสัมพันธ์กับอายุของลูกกุ้งกุลาดำ โดยความรุนแรงจะลดลงตามระยะของลูกกุ้ง ซึ่งจะเห็นได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของลูกกุ้งในระยะ zoea, mysis และ postlarva หลังจากการแช่เชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 25.28, 47.08 และ 51.50 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นแบคทีเรียที่ระดับ 10^3 และ 10^4 cfu/ml. ไม่มีผลต่อการเกิดโรคลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ยกเว้นในกุ้ง *P. indicus* ที่ความเข้มข้นแบคทีเรียเท่ากับ 10^3 cfu/ml. ทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามมีอัตราการรอดตายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และจากการศึกษาผลของความเค็มและความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* พบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงชนิด Sea Water Complex (SWC) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเค็ม 10 และ 15 พีพีที เมื่อนำกุ้งกุลาดำวัยอ่อนไปแช่มีผลทำให้อัตราการตายสูงกว่ากุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่แช่ด้วยแบคทีเรียที่เลี้ยงในความเค็ม 17 และ 20 พีพีที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นจริงที่การระบาดของโรคเรืองแสงในประเทศอินโดนีเซีย มักจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีความเค็มต่ำโดยเฉพาะหน้าฝน และยังพบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า

pH เท่ากับ 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลทำให้อัตราการตายของลูกกุ้งต่ำกว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร pH เท่ากับ 6.0, 7.2 และ 9.0 ตามลำดับ ในลูกกุ้งกุลาดำทุกระยะ ($P < 0.05$)

จากรายงานของ Nithimathachoke *et al.* (1995) พบว่าการเกิดโรคเรืองแสงในบ่อดินส่วนใหญ่จะเกิดในช่วงหลังจากปล่อยกุ้งแล้วเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยอาการเริ่มแรกกุ้งจะกินอาหารลดลง ว่ายเกยบริเวณผิวน้ำ และรวมตัวกันที่บริเวณขอบบ่อและจะพบการตาย 10-20% หลังจากแสดงอาการภายใน 5 วัน เชื่อกันว่าผลทำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณท่อของ hepatopancreas อย่างรุนแรง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการฟุ้งตัวและในบริเวณดังกล่าวยังพบปมของแบคทีเรียและเม็ดเลือด เกิดการรวมตัวของเม็ดสี (melanization) อยู่เป็นจำนวนมากและยังพบว่าการใช้ออกซิเตตราซัยคลิน และออกโซลิติกแอซิด ในการป้องกันรักษาไม่ได้ผลอีกด้วย ซึ่งภายหลังจากการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้จากกุ้ง พบว่าเป็นชนิด *V. harveyi* ที่เจริญให้โคโลนีสีเขียวบนอาหารเลี้ยงชนิด TCBS ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้และเชื้อดื้อต่อกอกซิเตตราซัยคลิน ผลจากการศึกษาความรุนแรงในการเกิดโรค พบว่าการฉีดเชื้อที่ความเข้มข้น 10^3 - 10^4 cfu/ml. ไม่สามารถทำให้กุ้งทดลองขนาด 10 กรัม ตายได้ ตรงกันข้ามกับการแช่กุ้งที่ความเข้มข้นของ *V. harveyi* 1.0 - 7.0×10^4 cfu/ml. สามารถทำให้กุ้งทดลองตาย 30-90% และ 40-100% สำหรับความเข้มข้น 10^5 - 10^6 cfu/ml. ภายใน 6 วัน และพบว่าเชื้อ *V. harveyi* ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเค็มต่ำกว่า 5 พีพีที และมีแนวโน้มว่าจะเจริญได้ดีเมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้นในช่วง 10-35 พีพีที

ศุภชัย (2538) ได้รายงานถึงปริมาณแบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า ตลอดช่วงการเลี้ยงมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วงระหว่าง 3.3×10^2 - 2.3×10^5 cfu/ml. ซึ่งแยกได้ทั้งสิ้น 135 สายพันธุ์ และสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียชนิด vibrio ได้ทั้งสิ้น 8 ชนิด คือ *V. harveyi* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ *Vibrio alginolyticus*, *V. damsela*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* type I, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ตามลำดับ และยังพบว่า 2 ใน 40 สายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาทดสอบมีการดื้อยาโดยการถ่ายทอด R-plasmid ต่อกอกซิเตตราซัยคลิน และมี 1 สายพันธุ์ จากจำนวน 20 พันธุ์ ที่มีการดื้อยาต่อคลอแรมฟินิคอล

Ruangpan (1995) ได้รายงานผลการศึกษาชนิดของแบคทีเรีย vibrio ในพื้นที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดได้ทั้งสิ้น 8 ชนิด จาก 96 สายพันธุ์ คือ *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis* biova I, *V. damsela*, *V. cholerae* 01 และ *V. fisheri* ซึ่งพบว่าปริมาณของแบคทีเรียรวมและปริมาณ vibrio ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่

ปล่อยกุ้งกุลาดำหนาแน่นสูงจะมากกว่าบ่อที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นต่ำกว่า คือมีปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสโอมีค่าอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^5 , 10^3 - 10^4 cfu/ml. และ 10^3 - 10^4 , 10^2 - 10^3 cfu/ml. ตามลำดับ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียเพิ่มปริมาณเป็น 10^4 - 10^5 cfu/ml. และสามารถคงตัวอยู่ประมาณ 1-2 สัปดาห์ จะทำให้กุ้งแสดงอาการของโรคและเกิดการตายขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียและคุณภาพน้ำ ตลอดระยะเวลาของการศึกษา

7. การแยกเชื้อสกุล *Vibrio* sp. ที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Vibrio sp. เจริญได้ดีบน Marine agar (MA) (Zobell, 1941) และ Blood agar (Lee *et al.* , 1981) ที่มี NaCl 2% อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส (Ferguson, 1991) พบลักษณะโคโลนีสีเหลืองน้อยกว่าสีเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เมื่อนำมาทดสอบการเกิดรงควัตถุ (pigmentation) สามารถทดสอบ Oxidase Catalase Tests ที่อายุ 18-24 ชั่วโมง พบว่าการเกิดรงควัตถุของโคโลนีให้ผลเป็นบวก เป็นการเพิ่มอัตราการรอดของแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจากการเกิดรงควัตถุที่แตกต่างกันของแบคทีเรียทำให้สามารถจำแนกลักษณะแบคทีเรียจากรงควัตถุของ Marine bacteria ได้ (Igarashi *et al.*, 1989)

Gilmour *et al.* (1975) ได้ทำการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนจากไข่อาร์ทีเมีย กระจกป้องกันและนำมาเป็นอาหารให้ลูกปลาวัยอ่อน สามารถตรวจพบเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. โดยไข่อาร์ทีเมียที่ไม่พบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียตามเวลา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งให้อาหารอื่นแทนไม่พบแบคทีเรีย (Microorganisms) ในกระเพาะอาหาร

Austin (1982) สามารถแยกแบคทีเรียสกุลไวรัสโอจากอาร์ทีเมียซึ่งตรวจพบ คือ *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. proteus*, *V. costecola*, *V. damsela*, *V. fischeri*, *V. nereis*, *V. mimicus*, *V. gazogenes*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. metchnikovii*, *V. natriegenes*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. pelagius*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* sp.

Ramaiah and Charndramohan (1993) รายงานการนับจำนวนแบคทีเรียเรืองแสงด้วยวิธี LBC (luminous bacterial count) และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด TVC (total viable counts) ที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียแรกฟักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด marine agar และ nutrient agar ที่เติม NaCl 1% w/v. ด้วยวิธี spread plating ซึ่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากโรงเพาะฟักกุ้ง *Litopenaeus vannamei* โดยใช้แถบจำแนกชนิดแบคทีเรียชนิด API 20 NE (Bio Merieux, 1992) ได้แก่ *Photobacterium damsela*, *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. pelagius*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. proteolyticus*

8. วิธีการป้องกันการเกิดโรคโดยใช้สารเคมี

8.1. ฟอर्मาลินฟอรัลลีน หรือฟอรัลลีนไฮด์

คุณสมบัติทางเคมี

ฟอรัลลีนสูตรทางเคมี คือ CH_2O เป็นสารละลาย มีส่วนประกอบ 37-40% (คิดเป็น 100%) ของก๊าซฟอรัลลีนไฮด์ในน้ำ มีเมธานอลผสมอยู่ประมาณ 10 -15% เพื่อป้องกันไม่ให้ฟอรัลลีนเปลี่ยนรูปเป็นพาราฟอรัลลีนไฮด์ ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่าฟอรัลลีน เป็นสารละลายใส ไม่มีสี แต่มีกลิ่นฉุน เป็นสารรีดิวซ์อย่างแรง (strong reducing agent) เมื่อสัมผัสอากาศจะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดฟอรัลลิก (formic acid) ค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 2.8 - 4.0 ฟอรัลลีนสามารถแตกตัวกับน้ำ แอลกอฮอล์ และอะซิโตน แต่ไม่สามารถใช้ร่วมกับแอมโมเนีย อัลคาไลน์ สารประกอบเจลาติน (gellatin) แทนนิน (tannin) ไบซัลไฟด์ (bisulfide) เกลือทองแดง เหล็ก เงิน ไอโอดีน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ฟอรัลลีนที่เก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4.4 องศาเซลเซียส จะเปลี่ยนรูปเป็นพาราฟอรัลลีนไฮด์ หรือเรียกว่าไตรออกซีเมททีลีน (trioxymethylene) ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนสีขาว การวิจัยต่อมาพบว่าฟอรัลลีนสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีลักษณะเซลล์กลม ซึ่งปกติแกรมบวกจะมีความทนทานน้อยกว่าแกรมลบ แสดงว่าฟอรัลลีนออกฤทธิ์ต่อเชื้อโรคไม่กว้างเพียงพอ (Wright and Snow, 1975) รายงานว่าฟอรัลลีนในระดับความเข้มข้นสูงถึง 2,000 พีพีเอ็ม (2 ซีซี/ลิตร) สามารถ

ฆ่าเชื้อ *Aeromonas liquefaciens* ที่ติดมากับไขปลาได้ นอกจากนี้ฟอรัมาลินความเข้มข้นยังมีผลต่อ แพลงก์ตอนและปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ

การใช้ฟอรัมาลินในการฆ่าเชื้อและยับยั้งเชื้อโรค

ฟอรัมาลินเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ป้องกันและกำจัดปรสิตจำพวกโปรโตซัว โมโนจีน เชื้อราและแบคทีเรีย (Kabata, 1985) นิยมใช้ในระดับที่เหมาะสมกับขนาดและชนิดของปลา (เต็ม ควง, 2529) สำหรับการใช้ฟอรัมาลินเพื่อกำจัดปรสิตเป็นเวลานาน มักใช้ในระดับความเข้มข้น 25 - 50 พีพีเอ็ม (กมลพร และสุปราณี, 2526)

วารินทร์ และ ทวีชัย (2540) ได้รายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพของฟอรัมาลิน เบนซัลโคเนียมคลอไรด์ และโพวิโดนไอโอดีนในการยับยั้งเชื้อไวรัส ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ น้ำ ในบ่ออนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ และไรน้ำเค็ม ซึ่งแบคทีเรียชนิดไวรัสที่ใช้ในการทดสอบ ประสิทธิภาพสารเคมี ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harvey* และ *Vibrio* spp. โดยการใช้สารเคมีในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ทดสอบในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำทะเล หรือ NaCl 3% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้น inoculate เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความหนาแน่น 10^5 cfu/ml. ลงในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่าระดับความเข้มข้นของฟอรัมาลินมีค่าผันแปรตามชนิดของเชื้อ และระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับสารเคมี โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ทั้งหมดอยู่ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 200 ถึง 400 พีพีเอ็ม โดยอัตราการตายของเชื้อ *V. alginolyticus* อยู่ในช่วงระดับความเข้มข้นฟอรัมาลิน 50 ถึง 100 พีพีเอ็ม *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม *V. fluvialis*, *V. harveyi* และ *Vibrio* spp. ในช่วงระหว่าง 25 ถึง 50 พีพีเอ็ม ซึ่งค่าความเป็นพิษต่อไวรัสในน้ำเกลือที่ใช้ทดลองมีค่าเท่ากันหรือมากกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับความเป็นพิษต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน

8.2 สารประกอบคลอรีน

คุณสมบัติของคลอรีน

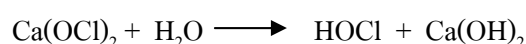
คลอรีนคือสารฆ่าเชื้อประเภท germicide ชนิด bactericide สามารถทำลายเซลล์ปกติของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) แต่อาจไม่ทำลายสปอร์ โดยสามารถลดจำนวนของจุลินทรีย์ให้เหลืออยู่ในระดับที่มีความปลอดภัย คลอรีนเป็นธาตุตัวหนึ่งในกลุ่มของฮาโลเจน และอยู่ในรูปของก๊าซคลอรีนที่มีสีเหลืองแกมเขียว จะอยู่ในสถานะของเหลวเมื่ออยู่ในที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15 องศาเซลเซียส คลอรีนถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1774 โดยนักเคมีชาวสวีเดน Kar Wilhelm Scheele (Laubusch, 1971) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไฮโดรคลอริกกับแมงกานีสออกไซด์ ซึ่งถูกทำให้เป็นของเหลวโดย Thomas Northmore ในปี ค.ศ. 1805-1806 สารประกอบคลอรีนหรือสารประกอบไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite) เกิดจากเกลือของคลอรีน ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) ซึ่งเป็นสารประกอบที่สามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นกัน $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ จะเป็นของแข็งสีขาวหรือเป็นผงที่เรียกอีกอย่างว่า bleaching powder หรือ chlorinated lime หรือชาวบ้านมักเรียกว่า ผงปูนคลอรีน โดยมีปริมาณ available chlorine ประมาณ 70% ซึ่งจะมีคลอรีนอิสระ (free available chlorine: FAC) อยู่ประมาณ 30% บางครั้งจะมีส่วนผสมของปูนขาวตั้งแต่ 3-5% สารประกอบไฮโปคลอไรต์เป็นสารฆ่าเชื้อชนิด anionic จะทำปฏิกิริยาร่วมได้ดีกับสารทำความสะอาดพวก detergent ที่เป็น anionic แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารทำความสะอาดที่เป็น cationic

ก๊าซคลอรีน โซเดียมไฮโปคลอไรต์และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ จะมีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยมีการแตกตัวแล้วให้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ดังสมการต่อไปนี้

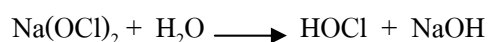
ก๊าซคลอรีน



แคลเซียมไฮโปคลอไรต์



โซเดียมไฮโปคลอไรท์



การใช้คลอรีนในการฆ่าเชื้อและยับยั้งเชื้อโรค

กรดไฮโปคลอรัสมีผลในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยการทำลายส่วนห่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเยื่อหุ้มสปอร์ (spore coat) โดยคลอรีนจะมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์และทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้โปรตีนตกตะกอน เมื่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ เมื่อเซลล์ขาดอาหารจึงทำให้ตายหรือหยุดการเจริญ

Herwig (1979) พบว่า สามารถใช้คลอรีนในการกำจัดเชื้อโรคของสัตว์น้ำได้เป็นอย่างดี โดยได้มีการทดลองการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสชนิด *Baculovirus penaei* ด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 5 และ 200 พีพีเอ็ม ที่เวลา 1 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 1,600 พีพีเอ็ม ที่เวลา 20 วินาที ตามลำดับ ในกรณีของไวรัสหัวเหลือง ต้องใช้ที่ความเข้มข้น 25 ถึง 30 พีพีเอ็ม นอกจากการใช้เพื่อยับยั้งไม่ให้ระบาดไปบ่อข้างเคียงแต่ต้องคำนึงถึงปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ

รุ่งทิวา (2541) รายงานว่า การใช้สารประกอบไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 พีพีเอ็ม สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่มีความหนาแน่นที่ระดับ 10^2 cfu/ml. ได้หมดภายใน เวลา 2 นาที ซึ่งจะพบปริมาณคลอรีนอิสระตกค้าง 16.13 และ 29.77 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

อรรณ (2541) รายงานการใช้คลอรีนและไตรคลอฟอนในการเตรียมน้ำเพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา พบว่า การใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำที่ระดับ 18 มก./ลิตร สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียรวมในบ่ออนุบาลได้ 99% ภายในระยะเวลา 3-12 ชั่วโมง และสามารถฆ่าเชื้อไวรัสได้ 100 % ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีการเตรียมน้ำโดยใช้ไตรคลอฟอนที่ระดับ 1 มก./ลิตร เมื่อตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียในน้ำหลังการฆ่าเชื้อไปแล้ว 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อนำปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมและปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในแต่ละสัปดาห์มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารทั้งสองชนิด พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และยังตรวจพบเชื้อไวรัสในน้ำหลังการใช้สารเคมีทั้งสองชนิด

ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* และ *V. vulnificus*

7.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide: H_2O_2)

คุณสมบัติทางเคมี

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารเคมีที่ประกอบด้วย ธาตุไฮโดรเจนและออกซิเจน อย่างละ 2 อะตอม มีสูตรทางเคมีเป็น H_2O_2 มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนโดยเปลี่ยนสีกระดาษลิตมัส จากสีน้ำเงินเป็นแดง เป็นสารที่ไม่ค่อยอยู่ตัว ถ้ามีค้างป่นอยู่เล็กน้อยหรือมีแพลทตินัมดำหรือ คอลลอยด์แพลทตินัมป่นอยู่ด้วยจะสลายตัวให้น้ำและออกซิเจน สามารถอยู่ตัวได้ดีขึ้นถ้ามีการเติม กรด H_2SO_4 หรือ H_3PO_4 หรือแอลกอฮอล์ กลีเซอรอลีน แคลเซียมคลอไรด์ กราฟาร์บิดูริกหรือไฟโร-กัลป์ลอล อย่างใดอย่างหนึ่ง สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมากจะเก็บไว้ในขวดที่ฉาบ ด้วยพาราฟิน เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อถูกผิวแก้วอาจสลายตัวได้ออกซิเจนได้บ้าง และ โดยทั่วไปสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีได้ (Snell and Ettore, 1971 อ้างโดย Talinli and Anderson, 1992)

การใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฆ่าเชื้อและยับยั้งเชื้อโรค

ปัจจุบันมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการควบคุมและกำจัดเชื้อโรคต่าง ๆ ใน สัตว์น้ำ เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสูง ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง สภาพแวดล้อมต่ำ โดยจัดสารดังกล่าวเป็นสารเคมีที่สามารถใช้กับสัตว์น้ำในระดับ 250-500 พีพีเอ็ม ในการควบคุมเชื้อราในทุกระยะและทุกชนิดของปลารวมถึงไข่ด้วย (Anonymous, 1994)

Sales (1992) ได้ทดลองใช้ส่วนผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโอโซน ในการ กำจัดเชื้อโรคในบ่อบำบัดน้ำ เปรียบเทียบกับการใช้คลอรีนและโอโซนเพียงอย่างเดียว พบว่าการ ใช้โอโซนร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัตรา 0.34 มก./ลิตร ที่สัดส่วน H_2O_2/O_3 เท่ากับ 0.5 มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ถึง 99.99% ดีกว่าการใช้โอโซนและคลอรีนเพียงอย่างเดียว การเติม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้โอโซนมีการสลายตัวช้าลง และยังเพิ่มประสิทธิภาพไฮโดรอกไซด์ใน การกำจัดเชื้อโรค

Asghari (1993) รายงานผลของการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และไวรัส (bacteriophage) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าไวรัส โดยมีผลให้เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียถูกทำลาย ส่งผลให้ปลดปล่อยเอนไซม์ lactate dehydrogenase และ Mg^{+} ในปริมาณสูง และยังพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีฤทธิ์ในการกำจัดไวรัสในกลุ่ม Lipid-containing phage ได้ดีและรวดเร็วกว่ากลุ่มที่เป็น Non-Lipid-containing phage และผลจากการใช้ตัวย่อยสลายเปอร์ออกไซด์ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *E. coli* ลดลง แต่กลับเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดไวรัสได้มากขึ้น กลไกดังกล่าวทำให้ได้ข้อสรุปว่า OH⁻ ไม่น่าจะเป็นองค์ประกอบหลักในการฆ่าเชื้อไวรัส แต่กลไกน่าจะมาจากความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Marking *et al.* (1994) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมี 24 ชนิด ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราในกลุ่ม *Saprolegnia* และกลุ่มที่พบเสมอในโรงเพาะฟักทั่วไป พบว่าสารเคมี 7 ชนิดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อราได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อไข่ปลา โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 พีพีเอ็ม มีผลต่อเชื้อราดังกล่าว แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทั้งในระยะ 15, 30 และ 60 นาที นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มอัตราการฟักของไข่

Gomez Gil *et al.* (1994) รายงานผลการใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนตัวอ่อนอาร์ทีเมีย (*Artemia nauplii*; *Artemia franciscana*) ซึ่งได้แก่ฟอร์มาลิน 70 มก./ลิตร เป็นเวลา 5 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (6% active chlorine) 5 มก./ลิตร ไอโอดีน (10%) 10 มก./ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6% 30 มก./ลิตร เป็นเวลา 5 นาที ออกซิเตตราซัยคลิน 10 มก./ลิตร และ ไนโตรฟูราโซน 5 มก./ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งการแช่สารเคมีที่เวลาและระดับดังกล่าวเป็นช่วงปลอดภัย โดยทำให้อาร์ทีเมียวัยอ่อนมีการตายต่ำกว่า 10% ภายหลังการแช่สารแล้วนำตัวอ่อนอาร์ทีเมียมาบดแล้วนำสารละลายไปตรวจสอบปริมาณ heterotrophic bacteria และ *Vibrio* spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Marine Agar และ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปรากฏว่ามีเพียงฟอร์มาลิน โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจ โดยกลุ่มที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีปริมาณ heterotrophic bacteria ปรากฏบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Marine Agar มีปริมาณเท่ากับ 5.0 cfu/nauplii เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 20 cfu/nauplii เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS มีปริมาณเท่ากับ 0.2 cfu/nauplii และในกลุ่มควบคุมมีปริมาณเท่ากับ 0.3 cfu/nauplii

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียที่เลี้ยงกระป๋อง 6 ตัวอย่าง
 - สหรัฐอเมริกา (USA) : USA- premium, USA- medium และ USA-low grade
 - จีน (China)
 - รัสเซีย (Russia)
 - อิหร่าน (Iran)
2. โหลทดลอง
3. Autoclave
4. Petri dish
5. Pipette
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. Triangle loop
8. Micropipette
9. Vial tube
10. Incubator
11. API 20 E (Bio Merieux)
12. น้ำเค็ม 30 พีพีที
13. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่
 - Plate Count Agar (PCA) + 2.5% NaCl
 - Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)
 - Nutrient Agar (NA) + 2.5% NaCl
 - Brain Heart agar (BHA) + 2.5% NaCl
14. สารเคมี ได้แก่
 - ฟอรัมาลิน (formalin) 37% w/w
 - แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (calcium hypochlorite) (65% active chlorine)
 - ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) 50% w/w

วิธีการทดลอง

1. การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียรวมและแบคทีเรีย *Vibrio* spp.

1.1 การศึกษาจำนวนแบคทีเรียรวมและแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในน้ำหลังการฟักไข่ อาร์ทีเมีย (24 ชั่วโมง)

- 1) สุ่มตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียกระป๋องที่มีจำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 6 ตัวอย่าง
- 2) นำไข่อาร์ทีเมียมาฟักในน้ำเค็ม 30 พีพีที ที่ปราศจากเชื้อ (Autoclaved seawater) อัตรา 5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 36 วัตต์ 2 หลอด และให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลาที่ทำการฟัก แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 3 ซ้ำ
- 3) นำน้ำที่ได้จากการฟักไข่อาร์ทีเมียที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า (Serial ten-fold dilution) ด้วยน้ำเกลือ 3% ให้ได้ความเข้มข้นจาก 10^{-1} ถึง 10^{-7} ใช้ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
- 4) คูดตัวอย่างน้ำในข้อ 3 ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ของแต่ละกลุ่มการทดลอง หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA+2.5% NaCl และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จานละ 1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น
- 5) กระจายตัวอย่างน้ำโดยใช้เทคนิค Spread plate method นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละกลุ่มการทดลอง ของแต่ละความเข้มข้น แล้วคำนวณค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิตร รายงานผลมีหน่วยเป็น cfu/ml.

1.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ปนเปื้อนกับอาร์ทีเมีย ระยะ Instar I

- 1) ฟักอาร์ทีเมียตามการทดลองข้อ 1.1 หลังจากอาร์ทีเมียฟักออกจากไข่ (ประมาณ 24 ชั่วโมง) เก็บเกี่ยวเฉพาะอาร์ทีเมียระยะ Instar I โดยกรองด้วยผ้ากรองขนาดตา 150 ไมครอน
- 2) สุ่มอาร์ทีเมียระยะ Instar I ในแต่ละกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง (vial tube) ซึ่งมีน้ำเกลือ 3% ปริมาตร 0.9 มล. จากนั้นนำมาเขย่าด้วย Vortex mixer ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3) กรองเอาเฉพาะสารละลายหลังการเขย่าและนับปริมาณแบคทีเรีย ตามขั้นตอนเหมือนวิธีการทดลองที่ 1.1 บันทึกปริมาณแบคทีเรียที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารทั้งสองชนิดและทำการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพการฟักและการปนเปื้อนแบคทีเรียของแหล่งอาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง

1.3 การศึกษาแบคทีเรียสกุลลิวรีโอที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียระยะ Instar I

- 1) เลือกตัวอย่างโคโลนีของแบคทีเรียที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS จากการทดลองที่ 1.1 โดยพิจารณาจากลักษณะภายนอก กลุ่มละ 10 โคโลนี
- 2) นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เลือกได้มาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BHA + 2.5% NaCl หรือ NA + 2.5% NaCl
- 3) แยกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและแถบแยกชนิดแบคทีเรีย API 20 E (Bio Merieux)

1.4 การศึกษาคุณภาพการฟักของอาร์ทีเมีย คัดแปลงจากวิธีของ Sorgeloos *et al.*, (1986)

- 1) ทำการเพาะฟักไข่อาร์ทีเมียโดยให้สภาพแวดล้อมและตามวิธีการทดลองที่ 1.1
- 2) สุ่มนับอาร์ทีเมียระยะ Instar I ทุก 1 ชั่วโมง ตั้งแต่แรกฟักจนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนอาร์ทีเมีย เพื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความพร้อมเพรียงในการฟัก
- 3) สุ่มไข่อาร์ทีเมียแต่ละกลุ่มการทดลองกลุ่มละ 250 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร หยด Lugol 's solution 2-3 หยด (เตรียมจากโปแตสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม และไอโอดีน 5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล. และโซเดียมอะซิเตต 5 กรัมในน้ำกลั่น 50 มล.) เพื่อให้ไข่อาร์ทีเมียเคลื่อนไหวแล้วนับจำนวนตัวอ่อน (Nauplius) บันทึกค่าเป็น N เพื่อใช้ในการคำนวณคุณภาพการฟัก
- 4) จากข้อ 2 หยดสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Chlorox) 5 – 6 หยด และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 หยด (เตรียมจาก 40 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล.) นับจำนวนตัวอ่อนอาร์ทีเมียผ่านกล้องจุลทรรศน์ในระยะต่าง ๆ คือ ระยะ Full cyst ระยะ Nauplius และระยะ Umbrella บันทึกค่าเป็น FC, N และ U ตามลำดับ

5) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟัก ประสิทธิภาพการฟักและความพร้อมเพรียงในการฟักดังนี้

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching Percentage = HP)

$$HP = [N / (N + U + FC)] \times 100$$

N แทน จำนวนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

U แทน จำนวนอาร์ทีเมียระยะ Umbrella

FC แทน จำนวนไข่อาร์ทีเมีย Full cyst

การคำนวณประสิทธิภาพการฟัก (Hatching Efficiency = HE)

$$HE = N \times 2,000 \text{ ตัว} / \text{ไข่ 1 กรัม} \quad (N = \text{จำนวนอาร์ทีเมียระยะ Instar I})$$

การคำนวณความพร้อมเพรียงในการฟัก (Time synchronize= Ts)

$$Ts = T90 - T10$$

T10 = ระยะเวลาจากเริ่มทำการเพาะฟักถึงเวลาที่ได้อ่อน 10% ของจำนวนทั้งหมด

T90 = ระยะเวลาจากเริ่มทำการเพาะฟักถึงเวลาที่ได้อ่อน 90% ของจำนวนทั้งหมด

2. การใช้สารเคมีในการลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนกับไข่อาร์ทีเมีย

2.1 การเตรียมสารเคมี

เตรียม Stock solution (10,000 พีพีเอ็ม) ของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด คือ ฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้น 37% (w/w) แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 65% (w/v) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 50% (w/w) โดยใช้น้ำความเค็ม 30 พีพีเอ็มมาแล้วแล้ว และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000 และ 3,500 พีพีเอ็ม โดยใช้ volumetric flask ขนาด 500 มล.

2.2 การดำเนินการทดลอง

2.2.1 การลดปริมาณแบคทีเรียด้วยสารเคมี

- 1) เตรียมอาร์ทีเมียระยะ Instar I (อายุประมาณ 24 ชั่วโมง) น้ำหนัก 0.1 กรัม
- 2) แช่อาร์ทีเมียที่เตรียมไว้ในสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ซึ่งเตรียมในข้อ 2.1 ในบีกเกอร์ ขนาด 200 มล. นาน 15 วินาที และกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารเคมี
- 3) หาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I หลังการฆ่าเชื้อ ตามวิธีการทดลองที่ 1.2
- 4) เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนกับตัวอย่างอาร์ทีเมีย หลังการล้างด้วยน้ำสะอาดและแช่สารเคมีทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

3. รายงานผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากการแช่ด้วยสารเคมีทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (อนันต์ชัย, 2535)

4. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการทดลอง เริ่มตั้งแต่ เดือนเมษายน 2547 ถึง เดือนตุลาคม 2548

ผลการทดลอง

1. การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียรวมและแบคทีเรีย *Vibrio* spp.

1.1 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนในไขอาร์ทีเมีย

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนในไขอาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่างจาก 4 แหล่งการผลิต ซึ่งได้แก่ USA (Premium, medium, low grade) จีน รัสเซีย และอิหร่าน

ผลจากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำหลังการเพาะฟักไขอาร์ทีเมีย จากตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ตัวอย่างไขอาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (premium grade) มีปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำหลังการฟักไขอาร์ทีเมียมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.45×10^8 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียรวมจากแหล่ง USA (medium grade) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.87×10^8 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียรวมจากแหล่ง USA (low grade) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.57×10^8 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียรวมจากจีน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.96×10^8 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียรวมตัวอย่างจากรัสเซียมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.07×10^8 cfu/ml. และปริมาณแบคทีเรียรวมจากอิหร่าน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.76×10^8 cfu/ml. ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำพบว่าไขอาร์ทีเมียจาก USA (premium grade) มีการปนเปื้อนแบคทีเรียต่ำที่สุด และพบว่าตัวอย่างจากอิหร่านมีการปนเปื้อนแบคทีเรียมากที่สุดและมีความแตกต่างทางสถิติระหว่างตัวอย่างอาร์ทีเมีย ($P < 0.05$)

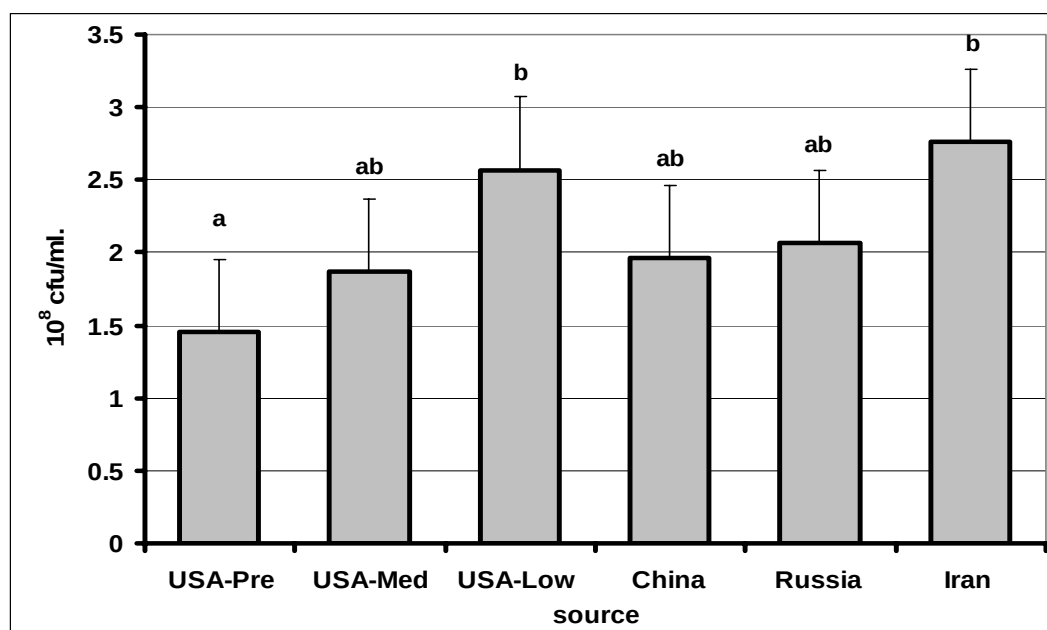
ผลจากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสในน้ำหลังการเพาะฟักไขอาร์ทีเมีย พบว่า ตัวอย่างไขอาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (premium grade) มีปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสในน้ำหลังการฟักไขอาร์ทีเมียมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.59×10^4 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสจากแหล่ง USA (medium grade) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.12×10^4 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสจากแหล่ง USA (low grade) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.46×10^4 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสจากจีนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.29×10^4 cfu/ml. ปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสตัวอย่างจากรัสเซีย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.28×10^4 cfu/ml. และปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสรวมจากอิหร่านมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.37×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสจากการเพาะฟักไขอาร์ทีเมีย พบว่า ไขอาร์ทีเมียจาก USA (premium grade) มีการปนเปื้อนแบคทีเรียต่ำที่สุดและ

ตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากอิหร่านมีการปนเปื้อนแบคทีเรียไวรัสโอมากที่สุดและมีความแตกต่างทางสถิติระหว่างตัวอย่างอาร์ทีเมีย ($P<0.05$)

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำฟักอาร์ทีเมีย

แหล่งตัวอย่าง	Total bacteria ($\times 10^8$ cfu/ml.)			
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย
USA-Pre	1.27	1.18	1.89	1.45 ± 0.38^a
USA-Med	2.10	1.80	1.69	1.87 ± 0.17^{ab}
USA-Low	2.93	2.73	2.05	2.57 ± 0.37^b
China	2.15	1.87	1.84	1.96 ± 0.14^{ab}
Russia	2.38	2.05	1.78	2.07 ± 0.24^{ab}
Iran	2.637	2.97	2.66	2.76 ± 0.15^b

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)



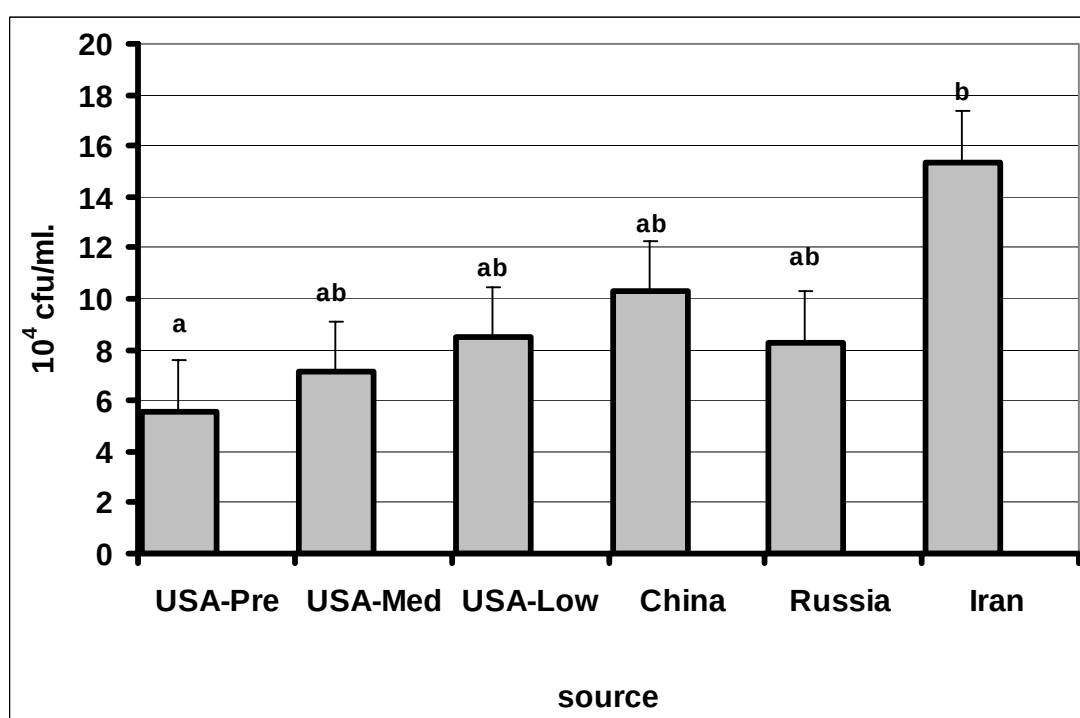
ภาพที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำฟักไข่อาร์ทีเมีย

หมายเหตุ	USA-Pre	= Premium grade	USA-Med	= Medium grade
	USA-Low	= Low grade	China	= China grade
	Russia	= Russia grade	Iran	= Iran grade

ตารางที่ 2 ปริมาณไวรัสโณในน้ำฟักอาร์ทีเมีย

แหล่งตัวอย่าง	Total <i>Vibrio</i> ($\times 10^4$ cfu/ml.)			
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย
USA-Pre	4.66	6.10	6.0	5.59 ± 0.80^a
USA-Med	9.53	3.73	8.10	7.12 ± 3.02^{ab}
USA-Low	6.50	8.63	10.23	8.46 ± 1.87^{ab}
China	7.06	14.73	9.06	10.29 ± 3.98^{ab}
Russia	10.50	5.06	9.26	8.28 ± 2.85^{ab}
Iran	12.63	15.83	17.63	15.37 ± 2.53^b

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโณในน้ำฟักไขอาร์ทีเมีย

1.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสโอที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

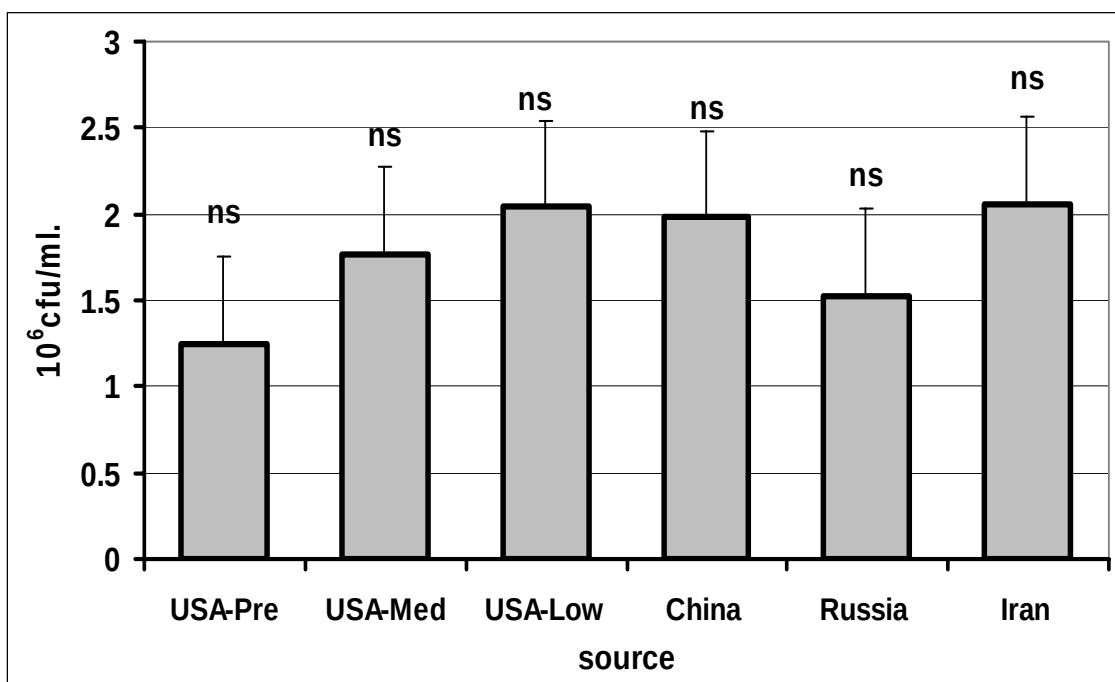
ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสโอที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I ทั้ง 6 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งการผลิต ซึ่งได้แก่ USA (premium, medium, low grade) จีน รัสเซีย และ อิหร่าน

ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I พบว่า อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (premium grade) มีปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.25×10^6 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (medium grade) มีปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.77×10^6 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (low grade) มีปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.04×10^6 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากจีน มีปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.98×10^6 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากรัสเซียมีปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.53×10^6 cfu/ml. และ อาร์ทีเมียจากอิหร่านมีปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.06×10^6 cfu/ml. (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างตัวอย่างอาร์ทีเมีย ($P > 0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียรวมปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

แหล่งตัวอย่าง	Total bacteria ($\times 10^6$ cfu/ml.)			
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย
USA-Pre	1.27	0.96	1.54	1.25 ± 0.29^{ns}
USA-Med	2.19	1.52	1.61	1.77 ± 0.36^{ns}
USA-Low	1.65	2.52	1.97	2.04 ± 0.44^{ns}
China	2.32	1.98	1.65	1.98 ± 0.33^{ns}
Russia	1.48	0.65	2.47	1.53 ± 0.91^{ns}
Iran	2.08	1.94	2.16	2.06 ± 0.11^{ns}

* ns แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ย ($P > 0.05$)



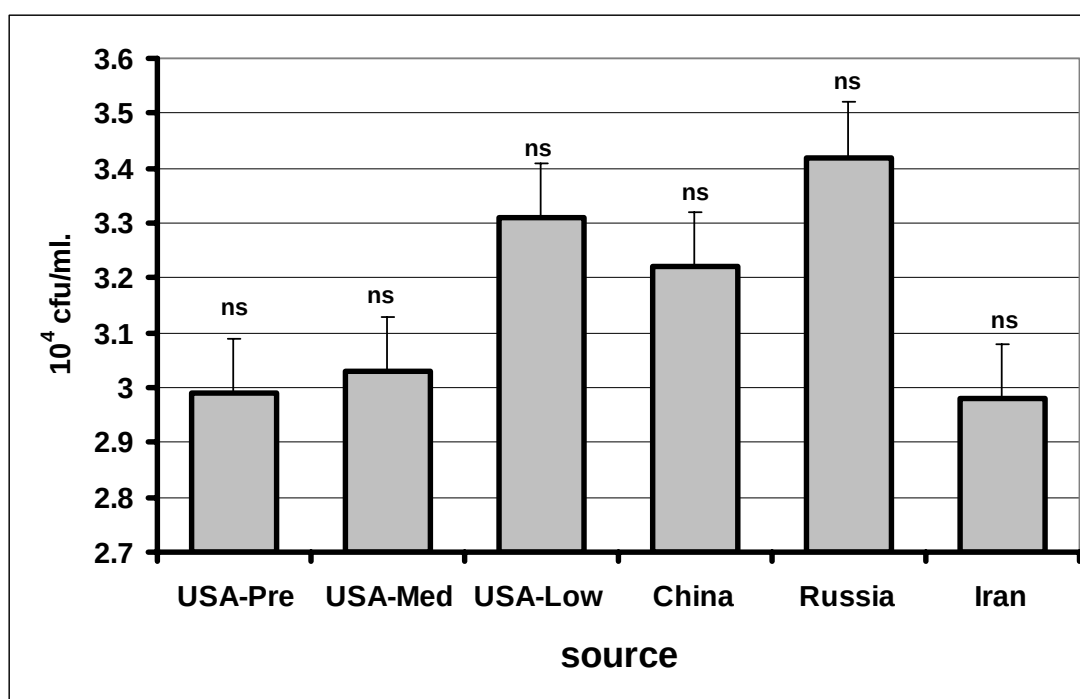
ภาพที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียรวมปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

ปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I พบว่า อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (premium grade) มีปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.99×10^4 cfu/ml. อาร์ทีเมีย จากแหล่ง USA (medium grade) มีปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.03×10^4 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (low grade) มีปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.31×10^4 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากจีนมีปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.22×10^4 cfu/ml. อาร์ทีเมียจากรัสเซียมีปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.42×10^4 cfu/ml. และอาร์ทีเมียจากอิหร่านมีปริมาณแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.98×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ ดังตารางที่ 4 ภาพที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบวibriโอที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I จากการเพาะฟักไข่อาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณการปนเปื้อนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4 ปริมาณไวรัสโพนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

แหล่งตัวอย่าง	Total <i>Vibrio</i> ($\times 10^4$ cfu/ml.)			
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	เฉลี่ย
USA-Pre	2.66	2.87	3.45	2.99 ± 0.30^{ns}
USA-Med	2.95	2.85	3.28	3.03 ± 0.16^{ns}
USA-Low	3.21	3.58	3.13	3.31 ± 0.18^{ns}
China	4.17	2.37	3.13	3.22 ± 0.63^{ns}
Russia	3.45	3.35	3.47	3.42 ± 0.05^{ns}
Iran	4.21	1.99	2.72	2.98 ± 0.82^{ns}

* ns แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ย ($P > 0.05$)



ภาพที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโพนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

1.3 การศึกษาสกุลไวรัสที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียระยะ Instar I

ผลการศึกษาเชื้อแบคทีเรียสกุลไวรัส โดยตรวจพบการปนเปื้อนจากไข่และตัวอ่อนอาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถเคลื่อนที่และสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและมอลโตสได้ โดยเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ซึ่งชนิดที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสจะให้โคโลนีสีเขียว ส่วนชนิดที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสจะให้โคโลนีสีเหลือง ส่วนที่เหลืองเป็นเชื้อที่แสดงปฏิกิริยาแปรผัน (Variable reaction) จะให้ทั้งโคโลนีสีเหลืองและโคโลนีสีเขียว แบคทีเรียชนิดที่แยกได้ส่วนใหญ่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl อยู่ 0-3% และจากการทดสอบทางชีวเคมีและ API (20E) (Bio Merieux) สามารถจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้เป็น 5 ชนิด คือ *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสกุลไวรัสทั้ง 5 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนไข่และอาร์ทีเมียระยะ Instar I

คุณสมบัติที่ทดสอบ	1	2	3	4	5
Gram staining	-	-	-	-	-
TCBS	Y	Y	Y	G	G
Motile	+	+	+	+	+
Cytochrome Oxidase	+	+	+	+	+
Luminescent	-	-	+	-	-
Oxidase reaction	+	+	+	+	+
O/F test	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	-	+
Tryptic Sugar Iron	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+
MR/VP	+	-	-	-	+
Decarboxylase Reaction					
- Arginine	-	-	-	-	-
- Lysine	+	+	+	+	+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

คุณสมบัติที่ทดสอบ	1	2	3	4	5
Voges-Proskauer	+	-	-	-	-
H ₂ S on TSI	-	-	-	-	-
Citrate utilization	d	+	+	d	d
Acid from sugar					
- Glucose	+	+	+	+	+
- Mannitol	+	-	+	+	+
- Arabinose	d	-	d	d	-
- Lactose	-	-	-	-	d
- Sucrose	+	+	+	-	-
- Mannose	d	d	+	+	+
Orthonitrophenyl Galactosidase (ONPG)	-	+	+	-	-
Growth in NaCl (%)					
0%	-	+	-	-	-
3%	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	d
8%	+	+	d	+	-
10%	+	-	-	-	-

หมายเหตุ1 = *V. alginolyticus* 2 = *V. cholerae* 3 = *V. harveyi*4 = *V. parahaemolyticus* 5 = *V. vulnificus*

+ หมายถึง มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างให้ผลเป็น positive

- หมายถึง มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างให้ผลเป็น negative

d หมายถึง 11-89 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างให้ผลเป็น positive

Y หมายถึง Yellow colony

G หมายถึง Green colony

1.4 การศึกษาคุณภาพการฟักของไข่อาร์ทีเมีย

ผลการศึกษาคุณภาพการฟักไข่อาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่างโดยนำไข่อาร์ทีเมียมาฟักในน้ำเค็ม 30 พีพีที อัตรา 5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ ขนาด 36 วัตต์ และให้อากาศผ่านหัวทรายตลอดเวลาที่ทำการฟัก และทำการศึกษาคุณภาพการฟักตามวิธีของ (Sorgeloos *et al.*, 1986)

จากการศึกษาคุณภาพการฟักไข่อาร์ทีเมีย คือ ประสิทธิภาพการฟัก (HE), เปอร์เซ็นต์การฟัก (HP) และ ความพร้อมเพรียงในการฟัก (Ts) จากตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (premium grade) มีคุณภาพการฟัก (HE, HP และ Ts) เฉลี่ยเท่ากับ 255,000 ตัว/กรัม, 85.71% และ 4.7 ชั่วโมง ตามลำดับ ไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (medium grade) มีคุณภาพการฟัก เฉลี่ยเท่ากับ 246,250 ตัว/กรัม, 74.43% และ 5.2 ชั่วโมง ตามลำดับ ไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (low grade) มีคุณภาพการฟัก เฉลี่ยเท่ากับ 131,250 ตัว/กรัม, 66.18 % และ 5.1 ชั่วโมง ตามลำดับ ไข่อาร์ทีเมียจากจีนมีคุณภาพการฟัก เฉลี่ยเท่ากับ 251,250 ตัว/กรัม, 84.93 % และ 5.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ไข่อาร์ทีเมียจากรัสเซียมีคุณภาพการฟัก เฉลี่ยเท่ากับ 156,250 ตัว/กรัม, 75.15 % และ 5.3 ชั่วโมง ตามลำดับ และไข่อาร์ทีเมียจากอิหร่าน มีคุณภาพการฟัก เฉลี่ยเท่ากับ 102,500 ตัว/กรัม, 70.49% และ 5.3 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งผลคุณภาพการฟักไข่แต่ละตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพการฟักของไข่อาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่า ไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (premium grade) มีประสิทธิภาพการฟักเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การฟักเฉลี่ย และความพร้อมเพรียงในการฟักเฉลี่ยสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างแหล่งอื่น ($P < 0.05$) ในขณะที่ พบว่าไข่อาร์ทีเมียจากอิหร่านมีประสิทธิภาพการฟักเฉลี่ยต่ำที่สุด ไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA (low grade) เปอร์เซ็นต์การฟักเฉลี่ยต่ำที่สุด และ ไข่อาร์ทีเมียจากจีนมีความพร้อมเพรียงในการฟักเฉลี่ยต่ำที่สุด แตกต่างจากตัวอย่างแหล่งอื่น ($P < 0.05$)

ตารางที่ 6 คุณภาพการฟักของไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งต่าง ๆ

Source	(HE)	(HP)	(Ts)
USA-pre	255,000 ^a	85.71 ^a	4.7 ^a
USA-med	246,250 ^a	74.43 ^b	5.2 ^b
USA-low	131,250 ^b	66.18 ^c	5.1 ^b
China	251,250 ^a	84.93 ^a	5.5 ^b
Russia	156,250 ^c	75.15 ^b	5.3 ^b
Iran	102,500 ^b	70.49 ^{bc}	5.3 ^b

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. การศึกษาประสิทธิภาพของฟอร์มาลิน แคลเซียมไฮโปคลอไรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสกุลวibriโอที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฟอร์มาลิน แคลเซียมไฮโปคลอไรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I ที่ระดับความเข้มข้น 0,1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000 และ 3,500 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 15 วินาที

การศึกษาศักยภาพการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนตัวอ่อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I พบว่า กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่ในน้ำผสมสารเคมีมีการปนเปื้อนแบคทีเรียรวมและวibriโอเท่ากับ 3.09×10^6 และ 4.4×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ลดการปนเปื้อนโดยแช่ในสารเคมีเป็นเวลา 15 วินาที พบว่า หลังการแช่ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 6 ความเข้มข้นข้างต้น พบปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.16×10^2 , 4.8×10^2 , 4.3×10^2 , 3.53×10^2 , 2.6×10^2 และ 2.33×10^2 cfu/ml. ตามลำดับ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.35×10^2 , 0.25×10^2 , 0.09×10^2 , 0.02×10^2 , 0.01×10^2 และ 0 cfu/ml. ตามลำดับ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.73×10^2 , 8.10×10^2 , 3.96×10^2 , 1.83×10^2 , 1.50×10^2 และ 1.1×10^2 cfu/ml. ตามลำดับ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียสกุลวibriโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.16×10^2 , 0.09×10^2 , 0.01×10^2 ,

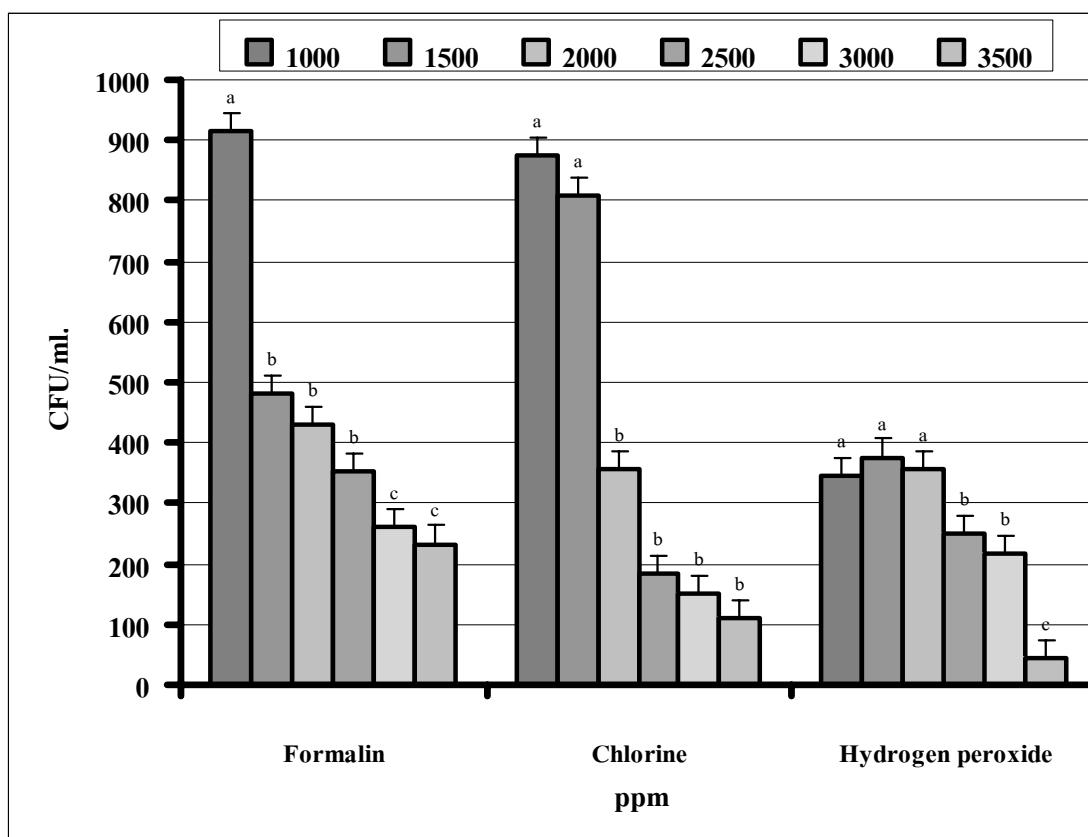
0.0033×10^2 , 0 และ 0 cfu/ml. ตามลำดับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ปริมาณแบคทีเรียรวมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.46×10^2 , 3.76×10^2 , 3.56×10^2 , 2.50×10^2 , 2.16×10^2 และ 0.43×10^2 cfu/ml. ตามลำดับ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียสกลูวิริโอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.16×10^2 , 0.043×10^2 , 0.0033×10^2 , 0, 0 และ 0 cfu/ml. ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 7 และ 8 ภาพที่ 5 และ 6

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ในการลดปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียสกลูวิริโอ โดยภาพรวมแล้ว พบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ทำให้ประสิทธิภาพการลดการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น สามารถลดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้ ซึ่งในทุกระดับความเข้มข้นไม่ทำให้อาร์ทีเมียระยะ Instar I เกิดการตาย เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อกับโรควิริโอ พบว่า สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพลดการปนเปื้อนแบคทีเรียสูงที่สุดและสารละลายคลอรีนมีประสิทธิภาพการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียสูงกว่าสารละลายฟอร์มาลิน โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถลดการปนเปื้อนจากเชื้อวิริโอได้หมด คือที่ 2,500, 3,000 และ 3,500 พีพีเอ็ม ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ และฟอร์มาลิน ตามลำดับ แสดงไว้ในตารางที่ 7 และ 8 ภาพที่ 6 และ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ปนเปื้อนหลังแช่อาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด

Conc.	PCA agar (CFU/ml.)		
	Formalin	Chlorine	Hydrogen peroxide
0	3.09×10^6	3.09×10^6	3.09×10^6
1000	916.67 ± 97.13^a	873.33 ± 85.05^a	346.67 ± 224.8^a
1500	480 ± 45.83^b	810 ± 85.44^a	376.67 ± 289.19^a
2000	430 ± 52.92^b	396.67 ± 47.26^b	356.67 ± 168.03^a
2500	353.33 ± 110.15^b	183.33 ± 58.6^b	250 ± 110^b
3000	260 ± 170.59^c	150 ± 30^b	216.67 ± 433.86^b
3500	233.33 ± 117.19^c	110 ± 10^b	43.33 ± 35.12^c

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

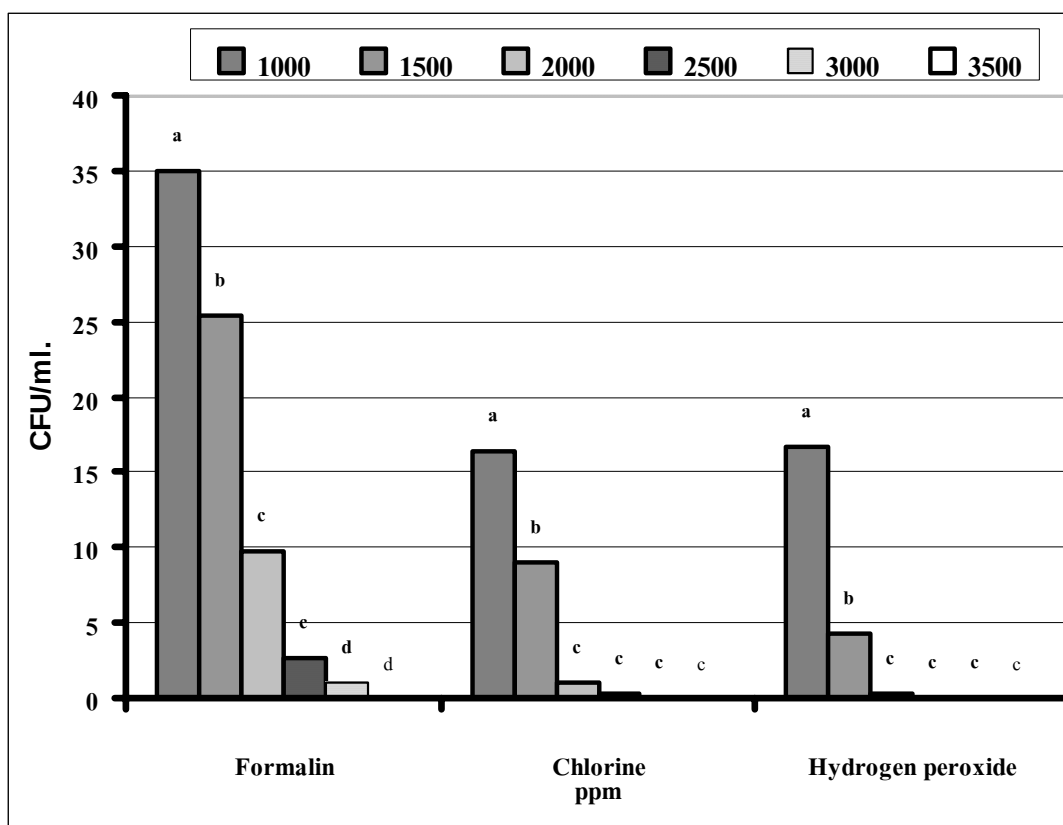


ภาพที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียรวมหลังแช่อาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด

ตารางที่ 8 ปริมาณไวรัสโหลหลังแช่อาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด

Conc.	TCBS agar (CFU/ml.)		
	Formalin	Chlorine	Hydrogen peroxide
0	4.4×10^4	4.4×10^4	4.4×10^4
1000	35 ± 5^a	16.33 ± 0.58^a	16.67 ± 2.52^a
1500	25.33 ± 3.51^b	9 ± 2.646^b	4.33 ± 2.52^b
2000	9.67 ± 1.53^c	1 ± 1^c	0.33 ± 0.58^c
2500	2.67 ± 0.58^c	0.33 ± 0.58^c	0^c
3000	1 ± 1^d	0^c	0^c
3500	0^d	0^c	0^c

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโอหลังแช่อาร์ทีเมียระยะ Instar I ด้วยสารเคมีแต่ละชนิด

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมีย

1.1 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมีย

จากผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียจากทั้ง 6 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งการผลิต ซึ่งได้แก่ USA (premium, medium, low grade) จีน รัสเซีย และ อิหร่าน พบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสในน้ำที่ได้หลังการเพาะฟักไข่อาร์ทีเมียที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณสูงมากโดยมีค่าปริมาณเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.45×10^8 - 2.76×10^8 cfu/ml. และ 5.59×10^4 - 15.37×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การปนเปื้อนจากแบคทีเรียรวมและไวรัสเพิ่มมากขึ้นเมื่อคุณภาพการฟักลดลง โดยพบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมของ USA-premium มีปริมาณเฉลี่ยต่ำที่สุด รองมาได้แก่ไข่อาร์ทีเมียจาก USA-medium จีน และรัสเซีย ตัวอย่าง อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA-low และ อิหร่านมีปริมาณการปนเปื้อนแบคทีเรียมากที่สุด เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียรวม (ตารางที่ 1 และ 2) พบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ปนเปื้อนมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาร์ทีเมียสามารถเป็นพาหะของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดในสกุลไวรัส ที่เป็นอันตรายกับสัตว์น้ำวัยอ่อน สอดคล้องกับการศึกษาของ Austin and Allen (1982) ซึ่งตรวจพบปริมาณแบคทีเรียจากไข่อาร์ทีเมียสายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย (Californian brine shrimp) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PCA และ TCBS ซึ่งพบว่าปริมาณแบคทีเรียมีจำนวนเท่ากับ 2.3×10^5 เซลล์ต่อไข่อาร์ทีเมีย 1 กรัม โดยตรวจพบแบคทีเรียจากเปลือกไข่อาร์ทีเมียและน้ำที่ได้หลังการเพาะฟักไข่ด้วย ในขณะที่การศึกษาของ Lopez-Torres and Lizarraga-Partida (2001) รายงานการตรวจแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจำนวน 26 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Zobell และ TCBS Agar พบว่าปริมาณแบคทีเรียมีจำนวนระหว่าง 10^6 - 10^8 cfu/ml.

จากการศึกษาครั้งนี้การปนเปื้อนน่าจะมาจากปัจจัยหลายปัจจัย แม้ว่าอาร์ทีเมียที่สามารถออกไข่ต้องอยู่ในน้ำที่มีความเค็ม 150 พีพีทีขึ้นไป ซึ่งระดับความเค็มดังกล่าวเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่การปนเปื้อนของไข่อาร์ทีเมียอาจเกิดมาจากหลายขั้นตอน เช่น การเก็บรวบรวม การล้างทำความสะอาดไข่ ตลอดจนเครื่องมือและภาชนะในการเก็บรวบรวมย่อมสามารถส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

จากการศึกษาครั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียเปรียบเทียบกับคุณภาพการฟัก ตัวอย่างจากแหล่ง USA –premium, medium และจีน จึงน่าจะมีความเหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ประโยชน์ในการอนุบาลสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งต่าง ๆ กันย่อมมีความแตกต่างกันทั้งแง่กระบวนการผลิต อายุของไข่ ฤดูกาล ตลอดจนชุดการนำเข้าสินค้าย่อมส่งผลให้มีค่าแตกต่างจากการทดลอง

1.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I

จากผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมีย Instar I จากตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งการผลิต ได้แก่ USA (premium, medium, low grade) จีน รัสเซีย และ อิหร่าน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมีย Instar I พบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.25×10^6 - 2.06×10^6 และ 2.98×10^4 - 3.42×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 3 และ 4) แม้ว่าคุณภาพการฟักของแต่ละตัวอย่างจะมีความแตกต่างกันก็ตาม นั้นแสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนอาร์ทีเมียสามารถเป็นพาหะเชื้อแบคทีเรียได้แม้ว่าจะมีคุณภาพการฟักแตกต่างกันก็ตาม ซึ่งจากปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับอาร์ทีเมียในปริมาณดังกล่าว สามารถก่อให้เกิดโรคต่อสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียรวมที่ตรวจพบมีปริมาณเฉลี่ยสูงมากสามารถก่อโรคต่อสัตว์น้ำได้ ซึ่งการศึกษาของ กุลวรา (2534) รายงานว่า ปริมาณเชื้อไวรัสเพียง 10^3 cfu/ml. มักทำให้กุ้งกุลาดำแสดงอาการของโรคให้เห็นแต่ต้องขึ้นอยู่กับคุณภาพน้ำด้วย ซึ่งจากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียสกุลไวรัสที่ปนเปื้อนตัวอ่อนอาร์ทีเมียจำนวน 26 ตัวอย่างของ Lopez-Torres and Lizarraga-Partida (2001) พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะพบมากเมื่อระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังการฟัก เนื่องจากระหว่างการฟักอาร์ทีเมียได้หลังสารอินทรีย์จำพวกกลีเซอรอล ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้แบคทีเรียโดยเฉพาะไวรัสสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ จากการทดลองผู้ทดลองทำการเก็บเกี่ยวตัวอ่อนอาร์ทีเมียโดยใช้แสงล่อ จากนั้นใช้สายยางดูดตัวอ่อนบริเวณก้นโหลผ่านตะแกรง ทำให้โอกาสที่ตัวอ่อนอาร์ทีเมียจะปนเปื้อนแบคทีเรียจากการสัมผัสน้ำหลังการเพาะฟักค่อนข้างสูง ส่งผลให้ปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนตัวอ่อนอาร์ทีเมียมีค่าไม่แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำหลังการเพาะฟักแล้วมีค่าประมาณ 10^8 cfu/ml. ซึ่งปริมาณดังกล่าว เมื่อสัมผัสตัวอ่อนอาร์ทีเมียในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวสามารถทำให้เกิดการปนเปื้อน ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียรวมปนเปื้อนตัวอ่อนค่าประมาณ 10^6 cfu/ml.

1.3 การศึกษาสกุลวิบริโอที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียระยะ Instar I

จากผลการศึกษาชนิดแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ปนเปื้อนไข่อาร์ทีเมียและอาร์ทีเมียระยะ Instar I พบว่าเชื้อสกุลวิบริโอสามารถเจริญบนอาหารชนิด TCBS ให้โคโลนีสีเหลืองและสีเขียว สามารถจำแนกชนิดได้เป็น 5 ชนิด ดังนี้ *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยมีรายละเอียดผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอทั้ง 5 ชนิด (แสดงไว้ในตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Austin and Allen (1982) Lopes-Torres and Lizarraga-Partida (2001) และ Ramaiah and Charndramohan (1993) ซึ่งได้รายงานชนิดและแยกชนิดเชื้อ *Vibrio* จากอาร์ทีเมีย ซึ่งตรวจพบอย่างน้อย 25 ชนิด คือ *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. proteus*, *V. costecola*, *V. damsela*, *V. fischeri*, *V. nereis*, *V. mimicus*, *V. gazogenes*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. metchnikovii*, *V. natriegenes*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. pelagius*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* และ unknown spp. นอกจากนี้ศุภชัย (2538) รายงานว่าการศึกษาแบคทีเรียจากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบเชื้อวิบริโอ จำนวน 135 สายพันธุ์ซึ่งจำแนกได้ 8 ชนิด ได้แก่ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* type I, *V. anguillarum*, *V. damsela* และ *V. cholerae* ซึ่งจากการตรวจพบเชื้อวิบริโอจำนวนมากนั้น สามารถเป็นตัวบ่งบอกถึงอันตรายในการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำได้เพราะมีวิบริโอหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคกุ้ง ซึ่งจากการศึกษาของชลอ (2531) รายงานว่า กุ้งที่มีอายุ 1 เดือน ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียที่ค่อนข้างรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ มักตรวจพบบ่อย ๆ ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยเฉพาะ *V. harveyi* ซึ่งมีผลทำให้อัตราการรอดของกุ้งลดลงโดยเฉพาะลูกกุ้งวัยอ่อน สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

จากผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่า การเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TCBS เป็นคุณสมบัติประการแรกในการแยกกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ได้โคโลนีสีเหลือง สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยไม่ใช้ออกซิเจนได้ กลุ่มที่ 2 เป็นพวกที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ได้โคโลนีสีเขียวไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในสภาวะขาดออกซิเจนได้ และกลุ่มที่ 3 เป็นพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และสามารถแปรผันได้แล้วแต่สายพันธุ์ (variable reaction) มีทั้งโคโลนีสีเหลืองและเขียวซึ่งมีอยู่ชนิดเดียวคือ *V. harveyi*

แบคทีเรียกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยไม่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ *V. alginolyticus* และ *V. cholerae* โดยแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างกันตรงที่ *V. cholerae* จะไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลแมนนิทอลในสภาพขาดออกซิเจนได้ ในขณะที่ *V. alginolyticus* สามารถย่อยสลายได้

แบคทีเรียกลุ่มที่ 2 ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในสภาวะที่ขาดออกซิเจนได้ ได้แก่ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยแบคทีเรียทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน ต่างกันตรงที่ *V. parahaemolyticus* ให้ผลเป็นลบในการทดสอบปฏิกิริยา MR-VP test

แบคทีเรียกลุ่มที่ 3 มีลักษณะทางชีวเคมีที่แปรผัน (variable reaction) เมื่อทดสอบการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสจึงเกิดโคโลนีได้ทั้งสีเขียวและเหลือง ทำให้ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งทีกล่าวมาข้างต้น ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อชนิดเดียวคือ *V. harveyi* ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มีคุณลักษณะพิเศษ คือ สามารถเรืองแสง (luminescence) ในสภาพต่าง ๆ เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ luciferase ซึ่งกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของอัลดีไฮด์ และฟลาโวโมโนนิวคลีโอไทด์ให้ได้น้ำ กรดอินทรีย์และปล่อยพลังงานออกมา ซึ่งมีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร มีสีเขียวแกมเหลือง (Ziegler and Baldwin, 1981) การจำแนกสามารถเปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมีกับกลุ่มที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลซูโครสซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง มีความใกล้เคียงกับลักษณะของ *V. alginolyticus* แต่จะแตกต่างกันตรงที่ *V. alginolyticus* จะให้ผลบวกในการทดสอบปฏิกิริยา MR-VP test สอดคล้องกับการจำแนกเชื้อ *V. harveyi* ของ Jiravanichpaisal *et al.* (1994) พบว่าการจำแนกชนิดของ *V. harveyi* จำเป็นต้องใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีเกือบทั้งหมด เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ซึ่งอาจทำให้เข้าใจผิดได้

1.4 การศึกษาคุณภาพการฟักของอาร์ทีเมีย

จากการศึกษาคุณภาพการฟักไข่อาร์ทีเมียทั้ง 6 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งการผลิต ได้แก่ USA (premium, medium, low grade) จีน รัสเซีย และอิหร่าน พบว่า ตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งต่าง ๆ มีประสิทธิภาพการฟักมีค่าอยู่ระหว่าง 102,500 - 255,000 ตัว/กรัม เปอร์เซ็นต์การฟักมีค่าอยู่ระหว่าง 66.18 - 85.71% และความพร้อมเพรียงในการฟักมีค่าอยู่ระหว่าง 4.7-5.5 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากคุณภาพการฟักของตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่าอาร์ทีเมียจากแต่ละแหล่งผลิตมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ดังตารางที่ 6) โดยเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพการฟัก พบว่าไข่อาร์ทีเมียจาก

แหล่ง USA-premium มีคุณภาพดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การฟักสูงกว่าไอาร์ทีเมียจากแหล่งจีน รัสเซีย และอิหร่านตามลำดับ ดังนั้นการพิจารณาเลือกใช้ไอาร์ทีเมียในการเพาะฟักและอนุบาล ตัววัยอ่อนควรพิจารณาตามแหล่งผลิต คุณภาพการฟัก และ การปนเปื้อนแบคทีเรียก่อนทำการ เพาะฟักเพื่อความเหมาะสมและปลอดภัยต่อการใช้งานต่อไป

2. การศึกษาประสิทธิภาพของฟอร์มาลิน แคลเซียมไฮโปคลอไรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสกุล vibrio ที่ปนเปื้อนไอาร์ทีเมียระยะ Instar I

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียรวมและ vibrio จากไอาร์ทีเมียระยะ Instar I โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมและ vibrio ที่ปนเปื้อนไอาร์ทีเมียบefore การแช่สารมีปริมาณเท่ากับ 3.09×10^6 และ 4.4×10^4 cfu/ml. ตามลำดับ แต่หลังจากแช่ไอาร์ทีเมียในสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 15 วินาที พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อ vibrio ได้ทั้งหมดของสารละลายฟอร์มาลิน สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ และ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีค่าเท่ากับ 3,500, 3,000 และ 2,500 พีพีเอ็ม ตามลำดับ โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ vibrio ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 2,500 พีพีเอ็ม สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมและ vibrio ได้เกือบหมด ซึ่งเหลือแบคทีเรียรวมและ vibrio 250 และ 0 cfu/ml. ตามลำดับ รองลงมาแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม ซึ่งเหลือแบคทีเรียรวมและ vibrio 150 และ 0 cfu/ml. ตามลำดับ และฟอร์มาลินที่ระดับความเข้มข้น 3,500 พีพีเอ็ม ซึ่งเหลือแบคทีเรียรวมและ vibrio 233 และ 0 cfu/ml. ตามลำดับ โดยการลดการปนเปื้อนดังกล่าวสามารถลดปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนได้มาก ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อย่อมลดอัตราการเสี่ยงต่อการก่อโรคต่อตัววัยอ่อน สอดคล้องกับการทดลองของ Gomez Gil *et al.* (1994) ซึ่งรายงานผลการทดลอง การใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ในการฆ่าเชื้อโรคที่ติดต่อกับกับตัวอ่อนไอาร์ทีเมียโดยใช้ฟอร์มาลิน 70 มก./ลิตร เป็นเวลา 5 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (6% active chlorine) 5 มก./ลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (10%) 10 มล./ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (6%) 30 มล./ลิตร เป็นเวลา 5 นาที ออกซิเตตราไซคลิน 10 มก./ลิตร และ ไนโตรฟูราโซน 5 มก./ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งมีเพียงฟอร์มาลิน โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ จากผลการทดลองจะพบว่า ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารเคมีทั้ง 3 ชนิดจะต้องใช้ความเข้มข้นในการทำละลายเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนไอาร์ทีเมียบefore สูงแต่ใช้ในระยะเวลาสั้นเพียง 15 วินาที เนื่องจากไอาร์ทีเมียวัยอ่อนมีความอ่อนแอและ ไม่สามารถทนต่อสารเคมีเป็นเวลานานได้ อีกทั้งการใช้งานในการปฏิบัติงานจำเป็นต้องใช้ตัวอ่อนไอาร์ทีเมียที่

มีชีวิต ดังนั้นการลดการปนเปื้อนโดยการแช่สารที่มีความเข้มข้นสูงแต่ใช้ระยะเวลาสั้นลงย่อมเป็น การลดการตายของตัวอ่อนอาร์ทีเมียอีกทั้งยังเป็นการลดขั้นตอนและเวลาในการฆ่าเชื้อ ก่อนนำไป อนุบาลสัตว์น้ำต่อไป

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่ระดับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ที่มีต่ออาร์ทีเมีย ระยะ Instar I พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายฟอร์มาลิน สารละลายแคลเซียม ไฮโปคลอไรท์และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 4,500, 5,700 และ 3,000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ จะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของปลายระยางค์และทำให้อาร์ทีเมียเกิดการ ตายในเวลาต่อมา และจากการทดสอบความเป็นพิษดังกล่าวพบว่า สารละลายฟอร์มาลิน สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับที่ใช้ในการลด การปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือที่ความเข้มข้น 3,500, 3,000 และ 2,500 พีพีเอ็ม ตามลำดับ จึงไม่เป็นอันตรายกับอาร์ทีเมียระยะ Instar I

สรุป

1. การศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำที่ใช้ฟักอาร์ทีเมีย พบว่า ตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA-premium มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียรวมและไวรัสोन้อยที่สุด และตัวอย่างไข่อาร์ทีเมียจากแหล่งอิหร่านมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียรวมและไวรัสโอบามากที่สุด
2. การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียรวมและเชื้อไวรัสโอบาของอาร์ทีเมียระยะ Instar I จากแหล่งต่างกันไม่แตกต่างกัน
3. คุณภาพการฟักของไข่อาร์ทีเมียจากแหล่ง USA-premium มีคุณภาพการฟักดีที่สุด และคุณภาพการฟักมีความสัมพันธ์กับระดับการปนเปื้อนจากน้ำหลังการฟัก
4. ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสกุลไวรัสโอบาที่ปนเปื้อนตัวอ่อนอาร์ทีเมียมี 5 ชนิด ดังนี้ *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*
5. การลดปริมาณเชื้อไวรัสโอบาที่ปนเปื้อนอาร์ทีเมียระยะ Instar I ของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2,500 พีพีเอ็ม โดยการแช่ที่ระยะเวลา 15 วินาที มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 พีพีเอ็ม และประสิทธิภาพต่ำที่สุดคือสารละลายฟอร์มาลิน ซึ่งต้องใช้ระดับความเข้มข้น 3,500 พีพีเอ็ม

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาปริมาณแบคทีเรียและเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในไขอาร์ทีเมีย ควรศึกษาตัวอย่างไขอาร์ทีเมียจากแหล่งอื่น ๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน
2. ควรนำเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไขอาร์ทีเมียแต่ละแหล่งมาทดสอบการเกิดโรคในสัตว์น้ำวัยอ่อน
3. การใช้สารเคมีเพื่อการควบคุมแบคทีเรีย *Vibrio* spp. นั้นควรใช้ในสภาพที่ไม่มีสารอินทรีย์ เช่น ไข่อาร์ทีเมียด้วยใช้น้ำสะอาด เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียสูงกว่าสภาพที่มีสารอินทรีย์สูง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2534. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, น. 197-213. ใน รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2534. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- กมลพร ภวภูตานนท์ และ สุปราณี ชินบุตร. 2526. **ปรสิตตัวน้ำจืดของไทย**. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2531. โรคเลียนดำในกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง (6) :517-522.
- _____. 2535. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. บริษัทฐานเศรษฐกิจ จำกัด, กรุงเทพฯ.
- จิตชาติ ชิตมน. 2538. ผลของคลอรีนต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในระบบน้ำหมุนเวียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เต็มดวง พึ่งขจรบุญ. 2529. ความเป็นพิษและผลของฟอร์มาลินในระดับที่ไม่ทำให้ปลาตายต่อปลาน้ำจืดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธนาทิพย์ แหลมคม, ชลอ ลิมสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์ราชกุล. 2537. การศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนิกแอซิดในการป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ, น. 511-516. ใน รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2537. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ. 2542. การศึกษาพิษเฉียบพลันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) วัยอ่อนและประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* (*Vibrio* spp.) และแพลงก์ตอนพืชบางชนิดที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรเลิศ จันทร์รัฐชกุล, เจ เอฟ เทอร์นบอด และ ชลอ ลิมสุวรรณ. 2537. **คู่มือการเลี้ยงและการป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ**. สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ, กรมประมง, เกษตรกลางบางเขนจตุจักร, กรุงเทพฯ.

รุ่งทิวา อิศรางพร. 2541. **การเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella typhimurium***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. **คู่มือการเลี้ยงแพลงค์ตอน**. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิดา เรืองเป็น, ชัยวุฒิ สุตทองคง และ ชุบถรัตน์ ศรีแก้ว. 2539. แบคทีเรียเรืองแสงในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำจังหวัดสงขลา, น. 111-112. ใน **บทคัดย่อสัมมนาวิชาการประจำปี 2539**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

———. 2530. โรคกุ้งทะเล: โรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตและตัวเกาะอาศัยภายนอก, น. 27-36. ใน **โรคกุ้งทะเลและการใช้เคมีภัณฑ์**. เอกสารประกอบการสัมมนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลครั้งที่1. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วารินทร์ ธนาสมหวัง และทวีชัย สุไพวัลย์. 2540. ประสิทธิภาพของฟอร์มาลิน เบนซัลคลอเนียมคลอไรด์ และโพวิโดนไอโอดีนในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ที่แยกจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) น้ำบ่ออนุบาล และไรน้ำเค็ม. **เอกสารวิชาการฉบับที่18/2540**. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรสาคร กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง.

ศุภชัย ประภัสสร. 2538. **แบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio* spp. ต่อยาต้านจุลชีพ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนันต์ ต้นสุตะพานิช. 2543. **ความรู้เกี่ยวกับอาร์ทีเมีย**. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจะเชิงเตรา. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2535. **สถิติวิเคราะห์**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

องอาจ เลหาวินิจ. 2536. โรคไวรัสโอในกุ้ง. **นิตยสารสัตว์น้ำ** 4(43): 61-64.

อรรรรณ เรืองเดชกรณ์. 2541. **ผลการใช้คลอรีนและไตรคลอฟอนในการเตรียมน้ำเพื่อเลี้ยงกุ้ง
กุลาดำแบบพัฒนา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Aldayz-Sanz, V. and J.F. Turnbull. 1996. Study on the pathogenesis of *Vibrio* infection in
Penaeus monodon Fabricius, p9. In R.L. Creswell (ed.). **Book of Abstract of World
Aquaculture 96**. January 29 -2 February, 1996. Bangkok, Thailand.

Anonymous. 1994. FDA updates drug enforcement list. **Wat. Farm. J.** 8(7): 10, 13.

Asghari, A. 1993. **The inactivation of bacteria and viruses by hydrogen peroxide**. Ph. D.
Thesis, University of Florida, Florida.

Austin, B. and A.D. Allen. 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*).
Aquaculture 26: 369–383.

Blake, P.A., M.M. Merson, R. F. Weaver, D. G. Holis and P.C. Heuble. 1970. Disease caused by
a marine *Vibrio* clinical characteristics and epidermiology. **N. Engl. J. Med.** 300: 1-5.

Baumann, L., P. Baumann, M. Mendel and R. D. Allen. 1972. Taxonomy of aerobic marine
eubacteria. **J. Bacteriol.** 110: 402-429.

Belas, M.R. and R.R. Colwell. 1982. Scanning electron microscope observation of the swarming
phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Bacteriol.** 150: 956-959.

Bio Merieux. 1992. **Analytical Profile Index**, 5th eds, U.S.A.(ed.) France.

- Bird, P. 1992. *Vibrio vulnificus* and the Sydney rock oyster. NSW Oyster Programme, N.S.W. Department of Health. Cited N. Wongchinda. pp. 168-177. **In Proceeding the Seminar on Fisheries 1994.** Department of Fisheries Bangkok, Thailand.
- Boonyaratpalin, S. 1990. Shrimp larval disease. 158-172. *In* M.B. New, H. de Saran and T. singh (eds). **Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming.** INFOFISH, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Casalvieri, J. A. 1994. **Mechanism of intracellular survival of phagocytized Microorganisms. (*Listeria monocytogenes*).** Ph. D. Thesis, Rutgers State Univ., New Jersey.
- Chan, K., M.L.Y. Lenn and G.L. French. 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic *Vibrios* associated with seafood in HongKong. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 57-64.
- Chanratchakool, P. 1992. **Studies on biology, pathogenicity and prophylaxis of vibriosis in juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius).** Ph.D. Thesis, Univ., Stirling.
- Clair, R. A. L. 1970. Isolation and identification of *Vibrio alginolyticus* from clinical specimen. **J. Public Health Lab** 28: 82-92.
- Clegg J. S. and F. P. Conte. 1980. A review of the cellular and developmental biology of *Artemia*, pp. 193-206. *In* Persoone G., P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jasper (Eds). **The brine shrimp *Artemia*.** Vol 2. Universa Press, Watteren Belgium.
- Cowan, S. T. 1975. **Cowan and Steel's Manual for Identification of Media Bacteria.** Cambridge Univ. Press, London.

- Devis, B. R., G.R. Fanningm, J.M. Maddenn, A.G. Sterigemalt, H.B. Bradford, H.L.Smith and D. Brenner. 1981. Characterization of biochemically a typical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. **J. Clin. Microbiol.** 14(6): 631-639.
- Disulvo, L. H, J. Blecka and R. Zebal. 1973. *Vibrio anguillarum* and lethal motality in a California coastal shellfish hatchery. **Appl. Env. Microbiol.** 35(1): 219-221.
- Ferguson, H.W. 1991. Overview of finfish disease in an aquacultural setting. *In* Fish Health Management in Asia-Pacific. Asian Development Bank Network of Aquaculture Centers in Asia Pacific. **ADB Agriculture Development Report Series No.1.**
- Fumiss, A. L., J. V. Lee and T. J. Donovan. 1977. Group of a new *Vibrio*. **Lancet II**: 565-566.
- Gatesoupe, F. J. 1993. Bacillus sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *In*: S. J. Kaushik and P. Luquet, Editors, Fish Nutrition in Practice, 4th Int. Symp. **Fish Nutrition and Feeding**, 24–27 June 1991.
- Gilmour A., M.F. McCallum and M.C Allan. 1975. Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from canned eggs of the California brine shrimp (*Artemia salina*). **Aquaculture** 6:221–231.
- GomezGil-RS, B., F. A. Abreu-Grobois, J. Romero-Jarero and M. Herrera-Vega. 1994. Chemical disinfection of *Artemia* nauplii. **J. World Aqua. Soc.** 25(4): 579-583.
- Herwig, N. 1979. **Handbook of Drugs and Chemicals Used in the Treatment of Fish Diseases**. Charles C. Thomas. Publisher, Springfield.

- Holis, D. G., R. E. Weaver, C. N. Bader and C. Thornsbery. 1976. Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. **J. Clin. Microbiol.** 3: 425-431.
- Hose, J.E. and D.V.Lightner, 1980. Absence of formaldehyde residues in penaeid shrimp exposed to formalin. **Aquaculture.** 21:197–201.
- Hood. M. A., G. E. Ness, G.F. Rodrick and N. J. Blakes. 1983. Effect of storage on Microbiol foods of two commercially important shellfish species *Crassostrea virginica* and *Mercennaria campechinesis*. **ENV. Microbiol.** 45(4): 1221-1228.
- Hug, M. I., A. K.M. J. Alam, J. J. Brenner and G. K. Horris. 1980. Isolation of *Vibrio* like group, EF-6 from patient with diarrher. **J. Clin. Microbiol.** 11(6): 621-624
- Igarashi, M. A., H. Segugita,, and Y. Deguchi. 1989. Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. **Nippon Suisan Gakkaishi.** 55: p.2045
- Itou, T.,T. Iida and H. Kawatsu. 1997. The importance of hydrogen peroxide in phagocytic bactericidal activity of Japanese eel neutrophils. **Fish Patho.** 32 (2) : 121-125.
- Johnson, P. T. 1968. A new medium for maintenance of marine bacteria. **J. Invertebr. Pathol.** 11: 144-148.
- Jiravanichpaisal, P., T. Miyazaki and C. Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *penaeus monodon*. **J. Aquat. Anim. Health.** 6: 27-35.
- Kabata. Z. 1985. **Parasites and Disease of Fish Culture in Tropics.** Taylor and Francis, London.

- Kaneko, T. and R. Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. **J. of Bacteriology** 113: 24-32.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture** 128: 203–209.
- Laubusch, E.J. 1971. Chlorination and other disinfection process, pp. 158-124. In The American Water Work Association, Inc. **Water Quality and Treatment**. Mc Graw - Hill BookCompany, New York.
- Lavilla - Pitogo, C. R., M. C. L. Baticados, E. R. Cruz - Lacierda and L. D. Pena. 1990. Occurrence of luminous bacteria disease of *Penaeus monodon* larvae in Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.
- Lee, J. V., P. Shread, A. L. Fumiss and T. N. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (synonym group F *Vibrios*, group EF-6). **J. Appl. Bacteriol.** 50: 73-94.
- Leger, Ph., D.A. Bengtson, P. Sorgeloos, K.I. Simpson and A.D. Beck. 1987. The nutrition of *Artemia*: a review. pp.357-372. In Sorgeloos P., D.A. Bengtson, W. Declair and E. Jaspers(Eds). **Artemia research and its applications**. Vol 3. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- Lightner, D.V. 1988. *Vibrio* disease of penaeid shrimp, pp. 42-47. In C. J. Sinderman and D. V. Lightner (eds). **Disease Diagnosis and Control on the Culture of Penaeid Prawn /Shrimp**. Iloilo City, Philippines.
- Limsuwan, C. 1993. Disease of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius in Thailand, pp. 1-23. In D. M. Akiyama (ed.). **Tech. Bull. Amer. Soybean Assoc.**

- Liu, C. 1989. Shrimp disease, prevention and treatment, pp. 64-82. In D. M. Akiyama(ed.). **Proceeding of the Southeast Asia Shrimp Farm Management Workshop**. American Soybean Association, Singapore.
- Lopez-Torres, M. A. and M. L. Lizarraga -Partida. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. **Aquaculture** 194: 11–20.
- Marking, L.L., J. J. Rach and T. M. Schreier. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. **Prog. Fish-Cult.** 56: 225-231.
- Miyamoto, Y., K. Nakamura and K. Takisawa. 1962. Seasonal distribution of *Oceanomonas* spp. halophilic bacteria in the coastal sea. Its significance in epidemiology and marine Industry. **Jap. J. Microbiol.** 6: 141-158.
- Mohney, L. L., D. V. Lightner and T. A. Bell. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian Pond - Reared *Penaeus vannamei* (Crustacean: decapod). **J. World Aqua. Sci.** 25(1): 116-125.
- Nash, G., C. Nithimathachoke, C. Tungmundi, A. Arkarajiamorn, P. Prathanpipat and P. Ruamthaveesub. 1992. Vibriosis and its control in pondreared *Penaeus monodon* in Thailand, pp. 143-155. In M. Shariff, R. R. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.). **Disease in Asian Aquaculture I**. Asian Fisheries Society, Philippines.
- Nithimathachoke, C. , P. Pratanpipat, K. Thongdaeng, B. Withayachumnarnkul and G. Nash. 1995. Luminous bacterial infection in pond reared *Penaeus monodon*. Asian Shrimp Culture Council . **Asian Shrimp News 3rd Quarter** (23): 1-3.
- Piper, R.G., I.B. McElwain, L.E. Orme, J.P. Mc Craren, L.G.Fowler, J.R.Leonard, 1982. **Fish Hatchery Management**. US Fish and Wildlife Service, Washington, DC.

- Pizarro, F. and J. Alfaro. 1994. Reproductive performance of *Penaeus stylirostris* females injected with heat-killed *Vibrio alginolyticus*. **J. World Aqua. Soc.** 25(4): 576-578.
- Prayitno, S. B. and J. W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture** (132): 105-112.
- Ramaiah, N. and D. Chandramohan. 1993. Ecological and laboratory studies on the rate of luminous bacteria and their luminescence in coastal pollution surveillance. **Mar. Pollut. Bull.** (26): 190-201.
- Ruangpan, L. 1995. **Study on marine *Vibrio* isolated from culture shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand.** Ph. D. Thesis, Kagoshima Univ., Kagochima, Japan.
- Ruangpan, L. and Kitao. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. **J. Fish Dis.** 14: 383-388.
- Ruangpan, L. and S. Prapadsorn. 1996. Bacterial flora in the sediments of black tiger shrimp ponds, p. 348. *In* R. L. Creswell (ed.). **Book of Abstract of World Aquaculture**, 96. January 29-2 February. Bangkok, Thailand.
- Sales, C L. 1992. **Investigation of the combined use of ozone and hydrogen peroxide (Perozone) as disinfectant in Bangkok water treatment plant.** M. S. Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok.
- Shinoda, S. and K. Okamoto. 1977. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. **J. Bacterial** (129): 266 - 271.

Snell, F. D. and L. S. Ettre. 1971. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis 14: 7.

Interscience, New York. Cited I. Talinli and G. K. Anderson. 1992. Interference of hydrogen peroxide on the standard COD test. **Wat. Res.** 26(1): 107-110.

Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Lager, W. Tackaert and D. Vesichele. 1986. **Manual for culture and use of brine shrimp *Artemia* in Aquaculture.** *Artemia*. Reference Center, Rozier 44, B-9000, University of Ghent, Belgium.

Sorokin, D. Y. 1991. Peroxide mechanism of nitrite oxidation in heterotrophic bacteria. **Microbiol.** 60 (1): 4-9.

Spain, J. C., J. D. Milligan, D. C. Downey and J. K. Slaughter. 1989. Excessive bacterial decomposition of H₂O₂ during enhance biodegradation. **Ground Wat.** 27 (2) : 163-167.

Taylor, M. J., H. F. Cross, A. A. Mohammed, A. J. Trees and A. E. Briance. 1996. Susceptibility Of *Brugia malayi* and *Onchocera lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide. **Parasitology** 112 (3) : 315-322.

Twedt, R. H. 1969. Morphological, cultural, biochemical and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related culture isolated in the United States. **J. Bacterio** 198: 511-518.

Vos, J. 1979. Brine Shrimp (*Artemia salina*) inoculation in tropical salt ponds: **A preliminary guides for use in Thailand. Report on Consulting in FAO/UNDP: THA/75/008.** project Bangpakong Chachoengsao, Thailand.

Vanderzant, C., R. Nickelson and J.C. Parker. 1970. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Gulf Coast shrimp. **J. Milk Food Technol.** 33(4): 161 -162.

- Ventosa, A., E. Quessada, F. Rodrigues-Valera, F. Riuz-Verrguro and A. Romas-Cormenzana. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. **J. Gen. Microbiol.** 128: 1959-1968.
- Wright, L. D. and J. R. Snow. 1975. The effect of six chemicals for disinfection of largemouth bass eggs and fry. **Prog. Fish -Cult.** 34 (4): 213-217.
- Yasuda, K. and .T. Kitao. 1980. Bacterial flora in the digestive tracts of prawn, *Penaeus japonicus*. **Aquaculture** (19): 229- 234.
- Ziegler, M. M. and T. O. Baldwin. 1981. Biochemical bacterial bioluminescence. **Curr. Top. Bioenerg.** Cites G. Schmetterer, P. Wolk and J. Ethai. 1986. **Expression of luciferases.**
- Zobell, C. E. 1941. Studies on marine bacteria: I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. **J. Mar. Res.** 4 (1941): 42-75.

ภาคผนวก

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีสำหรับแบคทีเรียในครอบครัว vibrio

1. Oxidase test

เป็นการตรวจหา Cytochrome C oxidase (Indophenol oxidase) โดยจะ oxidize 1% Tetramethyl-p-phenyl enediamine dihydrochloride ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง

การเตรียม Kovac's oxidase reagent

- Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 5 กรัม
- น้ำกลั่น 50 กรัม
- เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีทดสอบ

- 1) วางกระดาษกรองในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 2) หยด Kovac's oxidase reagent ลงบนกระดาษกรอง 1-2 หยด
- 3) ใช้ loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบจากโคโลนี ลงบนกระดาษกรองที่หยด Kovac's oxidase reagent ไว้แล้วโดยระวังมิให้ loop สัมผัสกระดาษกรอง เพราะจะทำให้เกิดผลบวกเทียม (false positive) ขึ้นได้

การอ่านผล

ผลบวก เชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มขึ้นภายใน 10 วินาที

ผลลบ เชื้อไม่เปลี่ยนสี หรือเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อนๆ โดยใช้เวลานานกว่า 10 วินาที

2. Oxidation- fermentation test (O-F test)

เป็นการทดสอบระบบการใช้น้ำตาลของเชื้อว่าเป็นชนิดที่ต้องอาศัยออกซิเจน (oxidation) หรือไม่ต้องอาศัยออกซิเจน (Fermentation)

การเตรียม

- เตรียมอาหารทดสอบเชื้อ O-F basal medium ตามวิธีการที่แนบมากับสารเคมี
- น้ำตาลกลูโคส
- Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ

- 1) Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดยการstab ทั้ง 2 หลอด
- 2) หยด Sterile paraffin (Fermentation) ลงใน O/F medium 1 หลอด อีก 1 หลอดไม่ต้องหยด(oxidation)
- 3) Inoculate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเปลี่ยนสี

การอ่านผล

การใช้น้ำตาลแบบ Oxidation หลอดที่หยด Paraffin (F-tube) ไม่มีการเปลี่ยนสี (-) ส่วนหลอดที่ไม่ได้หยด Paraffin (O-tube) มีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (+) (O/F = +/-)

การใช้น้ำตาลแบบ Fermentation หลอดที่หยด Paraffin (F-tube) และหลอดที่ไม่ได้หยด Paraffin (O-tube) มีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (+) (O/F = +/-)

ไม่มีการใช้น้ำตาล ไม่มีการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นทั้ง 2 หลอด (O/F = -/-)

3. VP Test (Voges -Prokauer test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการให้ Acethyl-methyl carbinol(acetoin) เป็น end product จาก Glucose fermentation

การเตรียม

- ชั่งสารตามวิธีการที่แนบมากับขวดสารเคมี เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์
- แบ่งใส่หลอดทดลอง Autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ

- 1) ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Vp medium
- 2) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง
- 3) หยด Solution A โดยใช้ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร/ 2.5 มิลลิลิตร
- 4) หยด Solution B โดยใช้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร/ 2.5 มิลลิลิตร
- 5) เขย่าแรง ๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที ก่อนอ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก broth เปลี่ยนเป็นสีชมพู ภายใน 10-15 นาที

ผลลบ broth ไม่มีสีชมพูหรือสีแดงเกิดขึ้น

การเตรียม reagent

1. Solution A 5 % Alpha-naphthol solution

-Naphthol 5 กรัม

-Ethanol absolute 95 กรัม

2. Solution B 40 % KOH

- KOH 40 กรัม - น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. Decarboxylase test (lysine, ornithine, arginine)

เป็นการทดสอบหาเอนไซม์ Decarboxylase ของเชื้อในการจะ Decarboxylase amino acid ชนิดต่างๆ โดยให้สารผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียซึ่งทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่าง

เริ่มต้น ในสถานะที่ไม่มี O_2 เชื้อจะใช้น้ำตาล glucose ทำให้เกิดกรดขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดการเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ต่อมาถ้าเชื้อมีเอนไซม์ดีคาร์บอกซิลเลสก็จะใช้กรดอะมิโน ที่มีอยู่ในอาหารทำให้เกิดแอมโมเนียขึ้น pH จะเป็นด่าง อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง

การเตรียม

- 1) ตามวิธีการที่แนบมากับขวดสารเคมี และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1%
 - Decarboxylase base
 - Amino acid (lysine, ornithine, arginine) 0.5 %
 - Control ไม่ต้องใส่ amino acid ต่าง ๆ
 - autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การทดสอบ

- 1) Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นหลอด control, lysine, ornithine, arginine
 - 2) ปิดทับด้วย Sterile paraffin ให้สูงจากหน้าผิวอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร
 - 3) Incubate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง
- การอ่านผล (ต้องเทียบกับ control แต่ถ้า control เป็นสีม่วงจะอ่านผลไม่ได้)

การอ่านผล

ผลบวก control tube = เหลือง

Amino acid = ม่วง

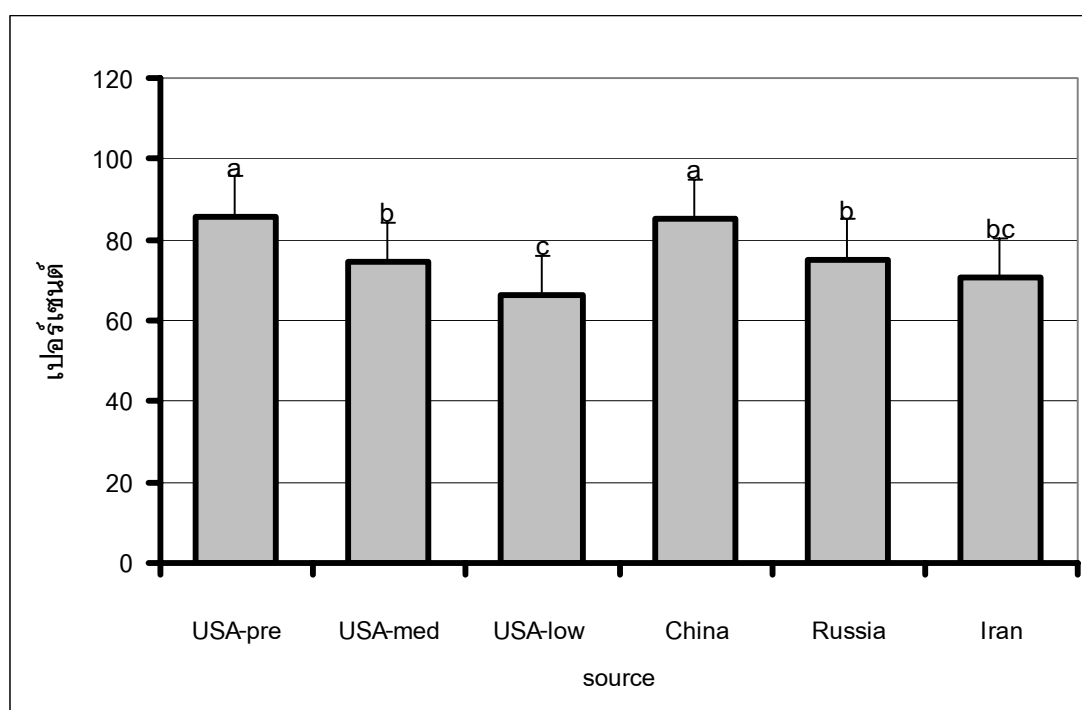
ผลลบ control tube = เหลือง

Amino acid = เหลือง

ตารางผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching Percentages) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ

Source	Hatching Percentages (HP)			Average
	Rep1	Rep2	Rep3	HP
USA-pre	84.62	87.33	85.19	85.71 ^a
USA-med	73.16	77.38	72.75	74.43 ^b
USA-low	64.18	67.08	67.27	66.18 ^c
China	85.34	83.65	85.8	84.93 ^a
Russia	74.83	72.35	78.26	75.15 ^b
Iran	72.62	63.46	75.39	70.49 ^{bc}

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

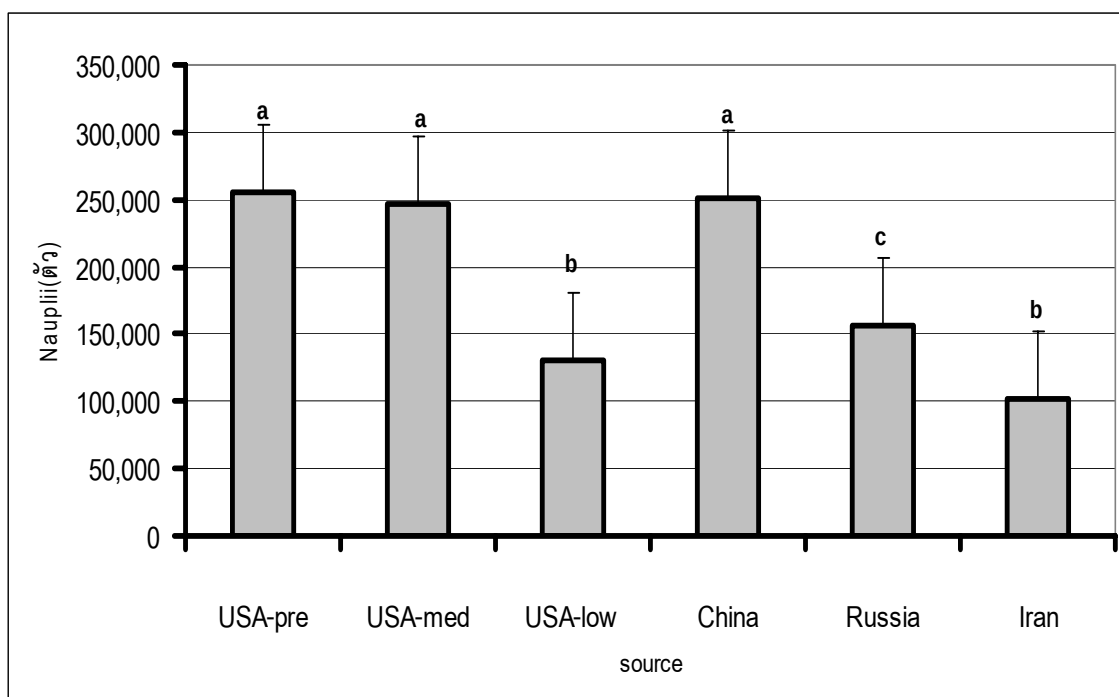


ภาพผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching Percentages) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ

ตารางผนวกที่ 2 ประสิทธิภาพการฟัก (Hatching Efficiency) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ

	Hatching Efficiency (HE)			Average
Source	Rep1	Rep2	Rep3	HE
USA-pre	247,600	260,350	257,050	255,000 ^a
USA-med	247,100	246,700	244,950	246,250 ^a
USA-low	131,300	128,900	133,550	131,250 ^b
China	254,000	250,200	249,550	251,250 ^a
Russia	156,850	155,950	155,950	156,250 ^c
Iran	102,500	102,100	102,900	102,500 ^b

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

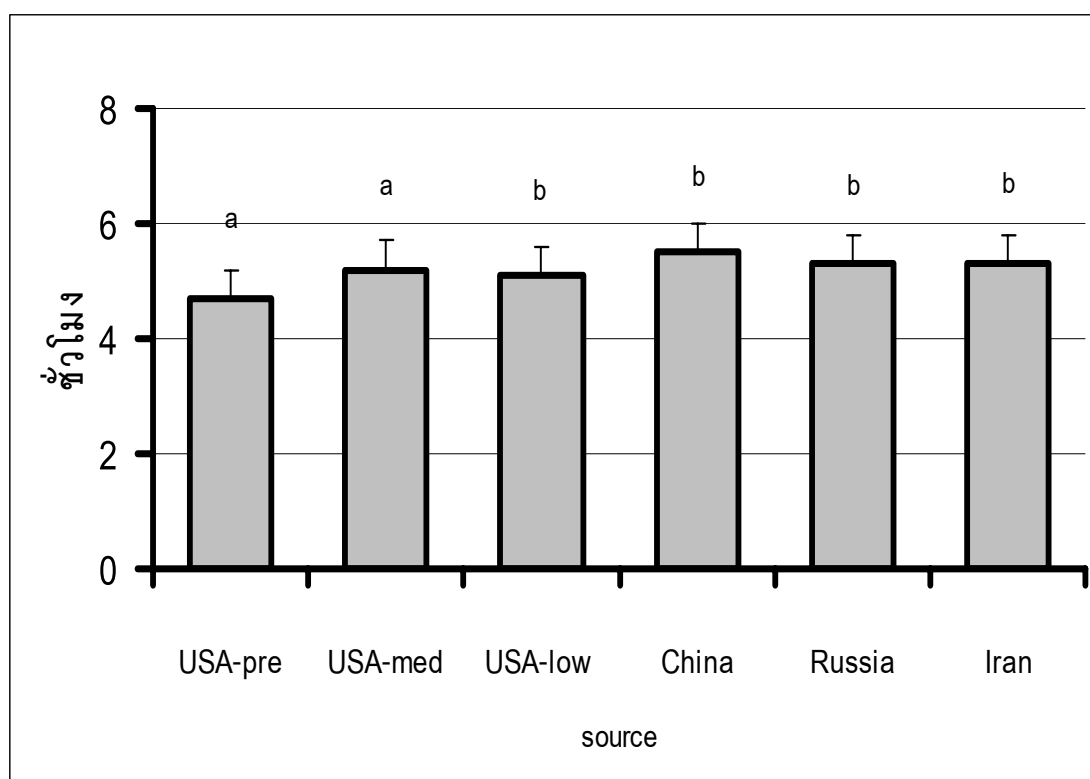


ภาพผนวกที่ 2 ประสิทธิภาพการฟัก (Hatching Efficiency) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่างๆ

ตารางผนวกที่ 3 ความพร้อมเพรียงในการฟัก (Time synchronize) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ

	Hatching Rate (HR)			Average
Source	Rep1	Rep2	Rep3	HR
USA-pre	4.60	4.70	4.80	4.7 ^a
USA-med	4.90	5.50	5.20	5.2 ^b
USA-low	5.00	5.20	5.00	5.1 ^b
China	5.60	5.40	5.60	5.5 ^b
Russia	5.20	5.30	5.30	5.3 ^b
Iran	5.30	5.4	5.30	5.3 ^b

*ตัวอักษรกำกับค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพผนวกที่ 3 ความพร้อมเพรียงในการฟัก (Time synchronize) ไข่อาร์ทีเมียแหล่งต่าง ๆ