



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาลักษณะภายนอก ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในปูทะเล (Scylla sp.) ที่มีอาการอก-ท้องแดง

Study on Morphological, Bacterial Identification and Histology in Mud Crab (*Scylla* sp.) with Red Thoracic-Abdominal Syndrome

นามผู้วิจัย นางสาวจิรนนท์ อินทนาคม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ด. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์จันทนา กาญจนกุล, วท.ด. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีชน, Ph.D. )

ประธานสาขาวิชา

( รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะภายนอก ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ในปูทะเล  
(*Scylla* sp.) ที่มีอาการอก-ท้องแดง

Study on Morphological, Bacterial Identification and Histology in Mud Crab (*Scylla* sp.)  
with Red Thoracic-Abdominal Syndrome

โดย

นางสาวจิรนนท์ อินทนาคม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จිරนันท์ อินทนาคม 2553: การศึกษาลักษณะภายนอก ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และพยาธิสภาพของ เนื้อเยื่อในปูทะเล (*Scylla* sp.) ที่มีอาการอก-ท้องแดง ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์จินตนา สและน้อย, วท.ค. 93 หน้า

การศึกษาลักษณะของปูทะเลในเขตจังหวัดสมุทรสงครามและจันทบุรี ช่วงเดือนตุลาคม 2551 ถึง กุมภาพันธ์ 2552 จำนวน 100 ตัว พบปูทะเลที่มีลักษณะผิดปกติคือ บริเวณท้อง รยางค์ขา และก้ามมีสีน้ำตาล และสีแดง ก้ามเนื้อลำตัวมีสีขาวขุ่นจนถึงขาวอมชมพู มองเห็นเส้นการเรียงตัวของก้ามเนื้ออย่างชัดเจน เลือดมีสีแตกต่างกันซึ่งจัดแบ่งปูทะเลที่มีอาการดังกล่าวออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 เลือดใส กลุ่ม 2 เลือดสีส้มใส กลุ่ม 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเข็น กลุ่ม 4 เลือดสีส้มคล้ายสีชาเข็น และกลุ่ม 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน โดยกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มที่มีอาการค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากเลือดไม่แข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ อวัยวะภายในไม่คงรูป ตับมีสีเหลืองซีด เหงือกบวมพองและนูนกว่าปกติ ก้ามเนื้อโปรง การตอบสนองช้า และปูจะตาย ภายในเวลาอันรวดเร็ว เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย พบเชื้อแบคทีเรีย 9 ชนิด คือ *Shewanella putrefaciens* group, *Pasteurella multocida*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* 1, *Vibrio parahaemolyticus* 2, *Vibrio parahaemolyticus* 3, *Vibrio vulnificus*, *Grimontia hollisae* และ *Brevundimonas diminuta*

การศึกษายุทธศาสตร์ของเนื้อเยื่อปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง ในกลุ่มที่ 1 (เลือดใส) และกลุ่มที่ 2 (เลือดส้มใส) แสดงลักษณะการติดเชื้อ โดยพบเนื้อเยื่อหัวใจ ก้ามเนื้อ ตับ และเหงือก เกิดการตายของเซลล์พบ เม็ดเลือดรวมกลุ่มและแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก และพบการเกิดโนคูล และการสร้างเม็ดสีดำ บริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงฉีดกลับเข้าสู่ปูทะเลปกติเพื่อศึกษาการก่ออาการของปูที่ได้รับการฉีดเชื้อ พบว่าปูที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึง 168 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึง 168 เลือดมีการเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีส้มอ่อน ส่วนปูทะเลที่ได้รับการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึง 96 และเลือดมีลักษณะปกติ เมื่อเปิดกระดองเพื่อสังเกตอวัยวะภายในพบว่า เนื้อเยื่อลำตัวมีลักษณะผิดปกติ โดยพบแถบสีน้ำตาลขุ่นแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบกับปูทะเลปกติ จากการศึกษาสรุปได้ว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุให้มีการเปลี่ยนแปลงสีเลือดจากใสเป็นสีส้มอ่อน ซึ่งเป็นอาการของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2

---

ลายมือชื่อนิสิต

---

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Jeeranan Intanakom 2010: Study on Morphological, Bacterial Identification and Histology in Mud Crab (*Scylla* sp.) with Red Thoracic-Abdominal Syndrome. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Jintana Salaenoi, Ph.D. 93 pages.

External morphology of 100 mud crabs collected from Samut Songkhram and Chanthaburi Provinces during October 2008 to February 2009 was observed. There were many abnormal symptoms in those crabs including brown to red abdominal thorax, chela and joints. The muscle developed white to pinkish coloration. Haemolymph of those crabs were classified into five groups; transparent (group I), transparency orange (group II), translucent brown (group III), cloudy orange (group IV) and opaque white (group V). Crabs in group IV and V developed unclottable blood, impair internal organs, pale hepatopancreas, loose muscle and soft carapace. Those crabs were lethargic and died very fast. The bacterial isolates from heart, muscle, hepatopancreas and gill of the normal and infected mud crabs was identified into 9 species: *Shewanella putrefaciens* group, *Pasteurella multocida*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* 1, *Vibrio parahaemolyticus* 2, *Vibrio parahaemolyticus* 3, *Vibrio vulnificus*, *Grimontia hollisae* and *Brevundimonas diminuta*.

Histopathological study of the abnormal crabs group I (transparent) and group II (transparency orange) showed necrotic cells in heart tissue, muscle, hepatopancreas and gill. Hemocyte infiltration, nodule formation and melanization were also observed in the infected areas which indicated the immune response to infection.

Disease-free crabs were experimentally infected with *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from red thoracic-abdominal syndrome. It was found that *V. parahaemolyticus* infected crabs had decreased total hemocyte count from 6 hours to 168 hrs. and hemolymph color was changed from transparent to transparency orange from 48-168 hrs. *V. alginolyticus* infected crabs also had decreased total hemocyte count at 6-96 hrs. but hemolymph remained transparent as normal. Some part of the muscle from *V. alginolyticus* infected crabs developed light brownish coloration. Based from this result, it could be suggested that *V. parahaemolyticus* was the cause of red thoracic-abdominal (group II) syndrome in the mud crab classified by the development of transparency orange hemolymph after the reinfection.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินตนา สและน้อย อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทนา กาญจน์กมล และรองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์  
อารีย์ชน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริยัน รัชฎกิจจานุกิจ ประธาน  
การสอบ และศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี ทัศนาวจร ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำ และ  
ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยี  
ชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน  
คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ ภัทรจินดา หัวหน้า  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์  
สำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และเจ้าหน้าที่ทุกคนจากสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร วิทยาเขต  
กำแพงแสน และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง ที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำในการทำ  
วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลงด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ นายจันทังค์ อินทนาคม นางสาววรรณิ อินทนาคม ผู้ซึ่งมีพระคุณ  
สูงสุด พร้อมด้วยนางสาวจรรุวรรณ อินทนาคม และนายรัช กันทะหงษ์ ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุน  
ในการศึกษาและเป็นกำลังใจเสมอมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลุล่วงด้วยดี

จिरนนท์ อินทนาคม

ตุลาคม 2553

## สารบัญ

### หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	15
สรุป	73
ข้อเสนอแนะ	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	86
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	93

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปลักษณะของปุ๋ยมะลที่มีอาการท้องแดงทั้ง 5 กลุ่ม	24
2	ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๋ยมะลที่เกิดที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl	29
3	ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เลือดส้มใสที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl	29
4	ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เลือดใสที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl	30
5	ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็นที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl	31
6	ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 5 เลือดขาวขุ่นคล้ายน้ำมันที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl	31
7	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลปกติ (ตัวอย่างที่ 1)	32
8	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลปกติ (ตัวอย่างที่ 2)	32
9	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลปกติ (ตัวอย่างที่ 3)	33
10	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เลือดใส (ตัวอย่างที่ 1)	33
11	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เลือดใส (ตัวอย่างที่ 2)	34
12	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เลือดใส (ตัวอย่างที่ 3)	34
13	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 1)	35
14	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 2)	35
15	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 3)	36

## สารบัญตาราง (ต่อ)

## ตารางที่ หน้า

16	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 4)	36
17	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น (ตัวอย่างที่ 1)	37
18	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น (ตัวอย่างที่ 2)	37
19	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น (ตัวอย่างที่ 3)	38
20	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 5 เลือดขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน	38
21	ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง	43
22	จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	65
23	เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	66
24	จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	68
25	เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	68

## สารบัญภาพ

### ภาพที่ หน้า

1	ลักษณะของปฐะเลปกติ	18
2	ลักษณะของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดใส	19
3	ลักษณะของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดค้ำใส	20
4	ลักษณะของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดค้ำคล้ายสีชาดำเข็น	21
5	ลักษณะของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดค้ำคล้ายสีชาเข็น	22
6	ลักษณะของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดขาวขุ่นคล้ายน้ำนม	23
7	ลักษณะโคโลนิของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง	41
8	ลักษณะกล้ามเนื้อหัวใจในปฐะเลปกติ	47
9	บริเวณเนื้อเยื่อ myocardium ของกล้ามเนื้อหัวใจในปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1	47
10	ลักษณะของเนื้อเยื่อ myocardium ของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1	48
11	การตายของเนื้อเยื่อ myocardium ในปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1	48
12	ลักษณะของเนื้อเยื่อ myocardium ของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 พบการตายของเซลล์	49
13	ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจบริเวณเนื้อเยื่อ myocardium ของปฐะเลที่มี อาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2	49
14	ลักษณะของเม็ดเลือดรวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ myocardium ของ กล้ามเนื้อหัวใจที่เกิดการตาย (necrosis) ในปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2	50
15	ลักษณะกล้ามเนื้อลำตัวในปฐะเลปกติที่มีการจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ	51
16	ลักษณะของกล้ามเนื้อลายบริเวณลำตัวของปฐะเลปกติพบเม็ดเลือดอยู่ในช่องว่าง ระหว่างเนื้อเยื่อ	51
17	ลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1	52
18	ลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เกิดการตายของเซลล์ โดยพบเม็ดเลือดแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ	52
19	บริเวณเนื้อเยื่อของปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1	53

## สารบัญภาพ (ต่อ)

### ภาพที่ หน้า

20	บริเวณกล้ามเนื้อลำตัวของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2	53
21	บริเวณเซลล์ตับของปูทะเลปกติ	54
22	บริเวณเซลล์ตับในปูทะเลปกติมีการสะสมไขมันภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก บริเวณเยื่อผนังท่อ	55
23	บริเวณเซลล์ hepatopancreatic tubular ของเนื้อเยื่อตับในปูทะเลที่มี อาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1	55
24	บริเวณเซลล์ tubular epithelium ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1	56
25	บริเวณของเนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1	56
26	ลักษณะของเนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 มีเซลล์เม็ดเลือด ขาวใหญ่ภายในนิวเคลียส	57
27	ลักษณะเซลล์ตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1	57
28	เซลล์ hepatopancreatic tubules ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2	58
29	บริเวณเนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2	58
30	บริเวณเนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 พบเม็ดเลือดรวมกลุ่ม อยู่เป็นจำนวนมาก	59
31	ลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเลปกติ	60
32	ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกที่ถูกทำลายในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1	60
33	ลักษณะของเหงือกปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 พบเซลล์เม็ดเลือดสะสม อยู่ภายในช่องว่างของ gill stem เป็นจำนวนมาก	61
34	ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงใน กลุ่มที่ 1 พบการตายของเซลล์	61
35	ลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2	62
36	ลักษณะของ gill lamella ในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดความเสียหาย	62
37	บริเวณ gill stem ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดการสร้างเมลานิน	63
38	จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีด <i>V. parahaemolyticus</i>	66
39	ลักษณะของสีเลือดในปูทะเลที่ได้รับเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6-168	67

## สารบัญภาพ (ต่อ)

### ภาพที่ หน้า

40	จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	69
41	บริเวณท้อง ออก และรยางค์ขาในปูที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	70
42	ลักษณะเนื้อเยื่อลำตัวของปูที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	70

### ภาพผนวกที่

1	ลักษณะขาเดินของปูทะเลปกติ (A) และปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง (B)	87
2	รอยต่อระหว่างกระดูกกับจับปีงของปูที่มีอาการอก-ท้องแดงในระยะลอกคราบ	87
3	อาการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง	88
4	ลักษณะกล้ามเนื้อขาเดินของปูทะเลปกติ (A) และปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง (B)	88
5	ลักษณะกล้ามเนื้อลำตัวของปูทะเลปกติ (A) และปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง (B)	89

การศึกษาลักษณะภายนอก ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในปูทะเล  
(*Scylla* sp.) ที่มีอาการอก-ท้องแดง

Study on Morphology, Bacterial Identification and Histology in Mud Crab  
(*Scylla* sp.) with Red Thoracic-Abdominal Syndrome

คำนำ

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง รสชาติดี และมีราคาสูง จึงทำให้ปูทะเลเป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยมีการแปรรูปเป็นปูกระป๋องและปูปรุงแต่ง ปริมาณการส่งออกปูในช่วงปี พ.ศ. 2548 - 2550 เท่ากับ 8,749.44, 7,824.99 และ 12,584.89 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,164.77, 3,351.43 และ 3,725.00 ล้านบาท ตามลำดับ (กรมประมง, 2551) เมื่อความต้องการบริโภคปูทะเลเพิ่มสูงขึ้น ย่อมส่งผลทำให้ปูทะเลที่จับจากธรรมชาติมีปริมาณลดน้อยลง ดังนั้นจึงต้องมีการเพาะเลี้ยงปูทะเลเพิ่มมากขึ้น ปัญหาสำคัญที่มักพบในฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงปูทะเล ได้แก่ การขาดแคลนพันธุ์ปูทะเล จนต้องมีการนำเข้าพันธุ์ปูจากต่างประเทศ เช่น สหภาพมาบังคลาเทศ ปากีสถาน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบปัญหาการเกิดโรคในฟาร์มเลี้ยง จากรายงานพบว่ามีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (Davis and Sizenmore, 1982; Haryanti *et al.*, 2003) เชื้อรา (Boeger *et al.*, 2005) ไวรัส (Weng *et al.*, 2007) และปรสิต (Meyers *et al.*, 1987; Field and Appleton, 1995) จึงทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปูประสบกับความเสียหายในเชิงธุรกิจ และจากการรายงานของ Salaenoi *et al.* (2006) พบปูทะเลที่มีลักษณะผิดปกติ คือมีสีแดงบริเวณอก ท้อง ขี้อต่อ และก้าม กระดองไม่แข็งเหมือนปกติ กล้ามเนื้อหลวม โพรก ดับและเหงือกมีสีซีด ส่วนเลือดมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมและไม่แข็งตัว หลังจากนั้นปูจะตายลงในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นจึงทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปูทะเลต้องประสบกับความขาดทุน

รูปแบบการเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยส่วนใหญ่แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะคือ การเลี้ยงปูขุน มีรูปแบบการเลี้ยงตามธรรมชาติ โดยปล่อยให้ปูอาศัยอยู่รวมกันภายในบ่อดินที่มีพื้นเป็นโคลน เพื่อให้ปูสามารถหลบตัวได้เพื่อป้องกันการกินกันเอง ถัดมาคือการเลี้ยงปูนึ่ง ซึ่งเป็นการเลี้ยงปูที่มีกระดองแข็งให้เป็นปูที่มีกระดองนุ่มโดยนำไปใส่ตะกร้าพลาสติกซึ่งผูกติดกับท่อพลาสติกในลักษณะลอยเป็นแพในบ่อ ซึ่งมีทั้งการเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์และในบ่อดิน และสุดท้ายเป็นการเลี้ยงปูรวมกับการเลี้ยงกุ้งทะเล โดยปล่อยให้ทั้งกุ้งและปูอาศัยอยู่ร่วมกัน ซึ่งบริเวณที่ทำการเลี้ยงปูส่วนใหญ่เป็นบริเวณ

ป่าชายเลน ปากแม่น้ำ หรือบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง ในบางบริเวณที่เลี้ยงปู เกษตรกรมีการเปิดประตูให้น้ำจากภายนอกไหลเข้าสู่ภายในบ่อเลี้ยง โดยไม่มีการฆ่าเชื้อภายในบ่อ ทำให้ธาตุอาหาร สารเคมี หรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีขนาดเล็กรวมทั้งจุลชีพชนิดต่าง ๆ ไหลปะปนมากับน้ำเข้ามาในบ่ออาจส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายของปูได้ นอกจากนี้ในการเลี้ยงปูทะเลยังไม่มีการเลี้ยงแพะพันธุ์ที่สามารถผลิตลูกพันธุ์ปูให้เพียงพอต่อความต้องการในการนำมาเลี้ยงได้ เนื่องจากลูกปูจะมีอัตราการตายสูงในช่วงการอนุบาล นอกจากนี้เมื่อปูที่เลี้ยงมีขนาดโตขึ้นก็มีการจับขายจนหมด มิได้มีการเก็บไว้ทำพ่อแม่พันธุ์ และด้วยธรรมชาติของปูซึ่งเป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมก้าวร้าว ชอบต่อสู้กัน จึงไม่สามารถอนุบาลลูกปูวัยอ่อนได้ ดังนั้นปูทะเลที่เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นการนำลูกพันธุ์ที่ได้จากการจับจากธรรมชาติเป็นหลัก ซึ่งแตกต่างจากแพะเลี้ยงกึ่งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงแบบครบวงจรที่สามารถคัดสายพันธุ์จนได้สายพันธุ์ทนทานต่อโรคได้ ในการเลี้ยงปูจึงไม่สามารถควบคุมระบบการเพาะเลี้ยงได้อย่างในกึ่ง จากการที่คณะผู้วิจัยได้สำรวจปูในฟาร์มเลี้ยง พบปูที่มีอาการผิดปกติไปจากปูทั่วไป ดังนั้นจึงเกิดความสนใจในการศึกษาอาการผิดปกติ เนื่องจากอาการดังกล่าวก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก รวมทั้งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับอาการผิดปกติในปูทะเลในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อจักเป็นข้อมูลพื้นฐานอันอาจนำไปสู่การวินิจฉัยและหาวิธีป้องกันโรคที่จะเกิดในฟาร์มเลี้ยงปูของเกษตรกรได้ต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะภายนอก และลักษณะภายในของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง
2. จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดรวมและอาการผิดปกติที่พบในปูทะเลที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียที่จำแนกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

## การตรวจเอกสาร

### 1. ลักษณะทางชีววิทยาของปูทะเล

ปูทะเลจัดอยู่ใน Phylum Arthropoda Class Crustacea Subclass Malacostraca Order Decapoda Family Portunidae Genus *Scylla* (อนุวัฒน์ และคณะ, 2548) โดยในประเทศไทยพบปูทะเลสกุล *Scylla* 4 ชนิด คือ ปูดำ (*Scylla olivacea*) ปูเขียว (*S. serrata*) ปูขาว (*S. paramamosain*) และปูม่วง (*S. tranquebarica*) (ประคิษฐ์, 2549)

ลักษณะสำคัญของปูทะเล คือ มีกระดองเรียบและนูนรูปทรงคล้ายรูปหกเหลี่ยม ซึ่งร่างกายแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) ส่วนอก (thorax) และส่วนท้อง โดยส่วนหัวกับอกรวมกันเรียกว่า cephalothorax มีหนวด 1 คู่ มีรยางค์รอบปากจำนวน 6 คู่ มีขาเดิน 5 คู่ คือ ขาคู่แรกมีขนาดใหญ่เรียกว่า ขาก้าม (cheliped) ขาคู่ที่ 2 ถึงคู่ที่ 4 มีลักษณะแหลมเรียกว่า ขาเดิน (walking leg) และขาคู่ที่ 5 เรียกว่าขาว่ายน้ำ (swimming leg) ซึ่งมีลักษณะแบนคล้ายใบพายใต้กระดองมีแผ่นบาง ๆ เรียกว่า จับปิ้ง (abdomen) ในปูเพศเมียจะเป็นอวัยวะที่ใช้ในการอุ้มพุงไข่ นอกจากนี้จับปิ้งยังสามารถใช้ในการแยกเพศปู โดยจับปิ้งของปูเพศเมียจะมีลักษณะกว้างปลายมนกลมกว่าปูเพศผู้ซึ่งมีรูปร่างเรียวและแคบ กระดองปูทะเลมีลักษณะเป็นรูปไข่และมีหนามเรียงจากตาไปทางด้านซ้ายถึงขวาของกระดองด้านละ 9 อัน ตาของปูทะเลเป็นตารวม (compound eye) ประกอบด้วยตาเล็ก ๆ เป็นจำนวนมากซึ่งมีความรู้สึกไวต่อสิ่งเคลื่อนไหวอยู่รอบตัวและยังมีก้านตาช่วยในการชูลูกตาออกมาภายนอกป้า (Warner, 1977; อนุวัฒน์ และคณะ, 2548)

ปูทะเลเป็นสัตว์ออกหากินในเวลากลางคืนโดยออกจากการที่หลบซ่อน หลังจากพระอาทิตย์ตกดินไปแล้วประมาณ 1 ชั่วโมง และเข้าที่หลบซ่อนก่อนพระอาทิตย์ขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือหลังจากนั้นประมาณ 30 นาที เป็นสัตว์ที่กินเนื้อเป็นอาหาร ซึ่งอาหารที่ปูกินได้แก่ ปลา กุ้ง หอยฝาเดียว หอยสองฝา พวกหนอนต่าง ๆ ตลอดจนตัวอ่อนของแมลง และซากสัตว์ที่ตายแล้ว นอกจากนี้ปูจะชอบกินปูด้วยกันเองมากที่สุด (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545)

ปูทะเลพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในป่าชายเลนและชายฝั่งทะเลแถบอินโดแปซิฟิก เรื่อยมาจนถึงหมู่เกาะคาโรไลน์ มหาสมุทรแปซิฟิก จีน และญี่ปุ่น (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545) ส่วนในประเทศไทยพบปูทะเลแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณพื้นที่ที่เป็นป่าชายเลนและบริเวณปากแม่น้ำ ทั้งชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยและชายฝั่งทะเลอันดามัน (ชลธิ, 2539) จังหวัดที่พบการแพร่กระจายของ

ปูทะเลได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด ระยอง ชลบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร ระนอง และ พังงา เป็นต้น (อนุวัฒน์ และคณะ, 2548) ส่วนถิ่นอาศัยของปูทะเลที่พบในประเทศไทยพบทั้งกลุ่มที่อาศัยอยู่ในรู และกลุ่มที่อาศัยอยู่ในพื้นทรายหรือใน โคลนตามชายฝั่งทะเลที่ต่ำกว่าระดับน้ำขึ้นน้ำลง ตามบริเวณที่มีหญ้าทะเล หรือในป่าเสม (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545)

ปูทะเลเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์จะออกไปวางไข่ในทะเล หลังจากนั้นประมาณ 10-15 วันไข่ก็จะฟักออกเป็นตัวอ่อน โดยลูกปูวัยอ่อนระยะนี้จะลอยลอยอยู่ในทะเลตามกระแสน้ำและคลื่นลม โดยแบ่งพัฒนาการออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะซุเอีย (zoea) เป็นระยะที่ลูกปูมีรูปร่างไม่เหมือนพ่อแม่ และแม่ รยางค์ว่ายน้ำยังไม่เจริญเติบโต บริเวณส่วนอกมีหนามที่ส่วนหลัง 1 อัน กรี 1 อัน และ ค้านข้าง 2 อัน ลูกปูวัยอ่อนในระยะนี้มีพัฒนาการ 5 ชั้น และมีการลอกคราบ 5 ครั้ง จากนั้นจะเข้าสู่ระยะเมกาโลปา (megalopa) เป็นระยะที่รยางค์ว่ายน้ำทั้ง 5 คู่เริ่มทำงาน ก้ามพัฒนาดี มีลักษณะคล้ายปูมากขึ้น ตัวอ่อนในระยะนี้เริ่มอพยพเข้าใกล้ชายฝั่งทะเลมากขึ้น หลังจากอยู่ในระยะนี้ประมาณ 5-7 วัน ลูกปูก็จะลอกคราบเป็นลูกปูที่มีรูปร่างเหมือนพ่อแม่และแม่ เรียกว่า ลูกปูขนาดเล็ก (crab instar) และอพยพเข้ามาหากินและหลบซ่อนตัวอยู่ในบริเวณป่าชายเลนและเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย หลังจากนั้นปูเพศเมียที่สมบูรณ์เพศและผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์จะอพยพออกสู่ทะเลเพื่อวางไข่ซึ่งเป็นวัฏจักรสืบต่อไป (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545; ชลธิ, 2539)

ปูทะเลเจริญเติบโตโดยอาศัยการลอกคราบ เนื่องจากกระดูกของปูเป็นสารประกอบพวกไคตินและหินปูนที่มีความเหนียวและแข็งมาก จึงไม่สามารถยืดขยายตัวออกไปได้ ปูจะสร้างเปลือกใหม่ขึ้นมาแทนที่ก่อนจะสลัดเปลือกเก่าออกทิ้ง ระยะเวลาในการลอกคราบของปูจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุและขนาดของปู ปูที่ลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ นั้น กระดองจะนิ่มและเย็น ต่อมากระดองจะค่อย ๆ ตึงและแข็งตัวขึ้น โดยระยะนี้ปูมีความอ่อนแอมากที่สุด เคลื่อนไหวไม่ได้ จึงจำเป็นต้องหาที่หลบซ่อนตัวเพื่อให้พ้นจากศัตรู (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545)

## 2. การเลี้ยงปูทะเลในเชิงพาณิชย์

การเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยนั้นมีหลายรูปแบบ ได้แก่ การเลี้ยงปูทะเลในบ่อดิน บ่อซีเมนต์หรือที่เรียกว่าการเลี้ยงปูขุน และการเลี้ยงปูน้ำในกระชังหรือการเลี้ยงปูน้ำในตะกร้าแขวน และการเลี้ยงปูน้ำในระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนในถังไฟเบอร์กลาส

การเลี้ยงปูทะเลในบ่อดินเป็นการหาพันธุ์ปูทะเลที่จับมาจากธรรมชาติแต่ยังไม่ได้ขนาดและน้ำหนักที่ต้องการเพื่อจำหน่าย โดยนำมาเลี้ยงในบ่อช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วจึงจับขาย จากการศึกษาของบังอร และคณะ (2539) พบว่าการเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเลให้มีไข่นอกกระดองในบ่อดิน แม่ปูทะเลสามารถพัฒนาไข่จนกระทั่งปล่อยไข่ออกนอกระดองได้ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 15.4% แต่สามารถฟักไข่เป็นตัวอ่อนได้เพียง 6.2% ส่วนการศึกษาของโชคชัย และคณะ (2541) ทดลองเลี้ยงปูทะเลที่ได้จากโรงเพาะฟักมาเลี้ยงในบ่อดิน โดยมีอัตราการปล่อยลูกปูทะเล 3 และ 6 ตัวต่อตารางเมตร พบว่าการปล่อยลูกปูที่มีความหนาแน่น 3 ตัวต่อตารางเมตร ลูกปูมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนการศึกษาของรัชฎา (2543) ที่เลี้ยงปูทะเลในบ่อดินที่มีความหนาแน่น 1 ตัวต่อตารางเมตร พบว่าปูมีอัตราการรอด 60.78 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเฉลี่ย 100-720 กรัม ซึ่งให้ผลตอบแทนต่อเกษตรกรสูงสุด

จากการศึกษาการเลี้ยงปูทะเลให้มีไข่นอกกระดองในบ่อซีเมนต์โดยใช้ทรายเป็นวัสดุรองพื้น และมีหลังคาคลุมบ่อของบังอร (2538) พบว่าปูทะเลมีปริมาณไข่แก่นอกกระดอง 45.98% ซึ่งสามารถฟักเป็นตัวได้ 30.36% สอดคล้องกับการทดลองของสุรชาติ และคณะ (2538) ที่เลี้ยงปูทะเลเพศเมียระยะเพศชั้นที่ 3 ที่ยังไม่มีไข่หรือมีไข่ในกระดอง ที่ใช้ทรายเป็นวัสดุรองพื้นบ่อและมีระบบน้ำไหลเวียน พบว่าแม่ปูสามารถสร้างไข่ในกระดองได้มากกว่า 75% ของช่องว่างในลำตัวเฉลี่ย 34.67 ตัว จากจำนวนปูที่เลี้ยงทั้งหมด 40 ตัว และพบว่าปริมาณไข่ที่ติดอยู่นอกกระดองของแม่ปูทะเลที่ทรายเป็นวัสดุรองพื้นมากกว่าแม่ปูที่ไม่มีทรายเป็นวัสดุรองพื้น ส่วนการเลี้ยงปูทะเลที่มีไข่เกิน 40% ของช่องว่างในลำตัวให้มีไข่และปล่อยไข่ออกนอกระดอง พบว่าปูที่เลี้ยงโดยมีทรายเป็นวัสดุรองพื้นมีไข่ติดนอกระดอง 37.78% และยังสามารถสร้างไข่และปล่อยไข่ออกนอกระดองได้อีกเป็นครั้งที่ 2 ซึ่งใช้เวลาห่างจากการปล่อยไข่ครั้งแรกเฉลี่ย  $36.67 \pm 7.23$  วัน โดยใช้เวลาในการฟักไข่ 7-14 วัน ที่ระดับอุณหภูมิ 25-31 องศาเซลเซียส (สุรชาติ และ เอกพงษ์, 2543) ส่วนความถี่ที่เหมาะสมในการเลี้ยงปูทะเลเพศเมียไข่แก่คือ 35 ส่วนในพัน ซึ่งให้ผลผลิตปูไข่นอกกระดองสูงสุด 53.33% ส่วนบังอร และ โชคชัย (2545) ได้เพาะพันธุ์ปูทะเลแบบพัฒนาโดยวิธีเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 20 ตารางเมตร พบว่าผลิตปูไข่นอกกระดอง 45.41% รวม 277 ตัว จากจำนวนแม่ปูทะเลทั้งหมด 610 ตัว และมีอัตราการตายของปูทะเลไข่นอกกระดองก่อนฟักเป็นตัวเท่ากับ 9.34% จากจำนวนแม่ปูทั้งหมด

การเลี้ยงปูนิ่มเป็นการเลี้ยงปูที่มีกระดองแข็งไปจนกระทั่งเกิดการลอกคราบแล้วจึงเก็บเกี่ยว โดยไม่รอให้กระดองปูแข็งตัว โดยการเลี้ยงปูในตะกร้าพลาสติกซึ่งแขวนไว้กับราวไม้ภายในบ่อเลี้ยงปู กระบวนการเลี้ยงให้ปูลอกคราบเพื่อจะได้เป็นปูนิ่มนั้นมีวิธีการหลายรูปแบบ เช่น การนำปูกระดองแข็งปกคิตที่มีก้ามและขาครบมาเลี้ยงหรือจะใช้ปูทะเลที่สูญเสียขาค้ำและขาเดิน (autolactomy) เหลือเฉพาะขาว่ายน้ำ 1 คู่ มาเลี้ยงซึ่งจากการศึกษาของวิวรรณ และ วัฒนา (2543)

พบว่าการนำปูทะเลที่สูญเสียรยางค์ก้ามและขาเดิน (เหลือเฉพาะขาว่ายน้ำ) มีอัตราการลอกคราบ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาเลี้ยงในกระชังโดยให้อาหาร 1 วันต่อครั้ง ใช้เวลาในการเลี้ยงให้ลอกคราบ  $19.42 \pm 1.87$  วัน ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงปูขาวที่อุณหภูมิต่ำให้สลัดก้ามและขาเดินทิ้ง พบว่ามีอัตราการรอดตายและใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงจนลอกคราบเป็นปูเต็มเร็วที่สุด (วิวรรณ, 2546)

นอกจากนี้การเลี้ยงปูเต็มในระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนเป็นวิธีการเลี้ยงในบริเวณที่มีพื้นที่จำกัด โดยเลี้ยงปูในถังไฟเบอร์กลาสที่ออกแบบให้ภายในแบ่งเป็นห้องเล็ก ๆ สำหรับเลี้ยงปูทะเลห้องละ 1 ตัว ภายในถังจะมีน้ำหมุนเวียนและถ่ายเทอยู่ตลอดเวลา น้ำที่ผ่านออกมาจากถังเลี้ยงจะผ่านระบบดักตะกอนแล้วเข้าสู่ระบบกรองให้สะอาด จากนั้นจึงสูบน้ำที่สะอาดหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่อีกครั้ง (ชลธิ, 2539)

### 3. ปัญหาในการเลี้ยงปูทะเล

เนื่องจากปูทะเลเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ อีกทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเนื้อ มีรสชาดีดี ทำให้ปูทะเลได้รับความนิยมในการบริโภค ดังนั้นความต้องการของตลาดจึงมีปริมาณ มากขึ้นเป็นลำดับ การจับปูทะเลจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ย่อมไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังกล่าวได้ จึงได้มีการเพาะเลี้ยงปูทะเลขึ้นเพื่อให้ได้ปูทะเลที่มีคุณภาพและปริมาณตามความต้องการ ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงปูทะเลได้แก่ การขาดแคลนพันธุ์ปูในบางฤดูกาล ซึ่งในปัจจุบันปูขนาดเล็กที่ได้จากธรรมชาติมีแนวโน้มว่ามีจำนวนลดลงทำให้ไม่สามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545) ปัญหาการลักขโมย การตลาดซึ่งถูกกำหนดราคาซื้อขายโดยแพที่รับซื้อสัตว์น้ำ ทำให้ในช่วงที่มีปูปริมาณมากราคาปูจะลดลงจนผู้เลี้ยงประสบการขาดทุน ศัตรูของปู และการกินกันเองหรือทำร้ายกันเองของปู นอกจากนี้ยังเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และปรสิต เป็นต้น จึงทำให้อัตราการรอดตายต่ำ

### 4. จุลชีพที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในปูทะเล

จุลชีพที่พบว่าเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียได้แก่ ปรสิต แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส โดยพบว่าปรสิตที่สำคัญคือ *Hematodinium* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่ม dinoflagellate จากรายงานของ Meyers *et al.* (1987) พบว่า *Hematodinium* sp. เป็นปรสิต ที่พบในปูชนิด tanner crab (*Chionoecetes bairdi*) บริเวณ Alaska โดยปรสิตชนิดนี้ทำให้เลือดและเนื้อเยื่อของปูเกิดการเปลี่ยนแปลง และพบว่าเนื้อปูจะมีรสขมเมื่อนำมาปรุงอาหาร ส่วน Field and Appleton (1995) ศึกษากุ้งมังกรชนิด Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) ที่อาศัยอยู่บริเวณ Clyde sea

ของสก็อตแลนด์ ซึ่งพบปรสิตคล้ายกับ *Hematodinium* โดยปรสิตจะเข้าสู่ร่างกายผ่านทาง haemoceol จากนั้นจึงแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตับ เหงือก กล้ามเนื้อ และ หัวใจ ผ่านทาง haemal spaces ซึ่งส่งผลทำให้เนื้อเยื่อของอวัยวะดังกล่าวเกิดความเสียหาย ส่วน Taylor and Khan (1995) รายงานว่าปูชนิด snow crab (*Chionoecetes opilio*) ที่พบ *Hematodinium* ในร่างกายปริมาณมากส่งผลให้ปูเป็นโรค bitter crab disease (BCD) ซึ่งปูจะมีอาการเป็นอัมพาต และ เลือดมีสีขาวคล้ายน้ำมัน นอกจากนี้ *Hematodinium* ยังก่อให้เกิดโรค pink crab disease (PCD) ในกุ้ง มังกร Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) snow crab (*Chionoecetes opilio*) velvet swimming crab (*Necora puber*) tanner crab (*Chionoecetes bairdi*) blue crab (*Callinectes sapidus*) และ edible crab (*Cancer pagurus*) ซึ่งทำให้ปูตายลงอย่างรวดเร็ว โดยในปูที่พบ *Hematodinium* จำนวนมาก ส่งผลให้บริเวณกระดองมีสีชมพู (Stentiford *et al.*, 2002; Stentiford *et al.*, 2003 และ Stentiford and Shields, 2005) นอกจากนี้บริเวณ Newfoundland ของประเทศแคนาดา พบ *Hematodinium* ในปู ชนิด snow crab (*Chionoecetes opilio*) ซึ่งอวัยวะภายใน อาทิ เช่น ตับ และเหงือกถูกทำลายและยังพบ สปอร์ของ *Hematodinium* ภายในเนื้อเยื่อทำให้ปูมีการติดเชื้ออย่างรุนแรงและตายลงในที่สุด (Wheeler *et al.*, 2007)

สำหรับในประเทศไทยนั้นยังไม่มีรายงานการพบ *Hematodinium* sp. ในปูแต่จากรายงานของ Salaenoi *et al.* (2006) พบว่าปูทะเลที่มีอาการท้องแดงจะมีกระดองแข็งน้อยกว่าปูทะเลปกติ บริเวณท้อง รยางค์ก้าม และขา มีสีแดง อวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ เหงือกและกล้ามเนื้ออยู่กันอย่าง หลวม ๆ เลือดมีสีส้มจนถึงสีน้ำตาลและเลือดไม่แข็งตัวเมื่อปล่อยทิ้งไว้

สำหรับโรคในปูที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรัง Davis and Sizenmore (1982) รายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. ในปูชนิด blue crab (*Callinectes sapidus*) ที่แยกเชื้อได้จากเลือดและกระดอง คือ *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่พบเป็นประจำในปูทะเลและเชื้อมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน Vogan *et al.* (2002) จำแนกเชื้อแบคทีเรียในปูชนิด edible crab (*Cancer pagurus*) ที่เป็นโรค shell disease syndrome พบว่าบริเวณกระดองของปูที่เป็นโรคมักมีบาดแผลเป็นจุดสีดำ ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. เนื่องจากเชื้อ *Vibrio* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) เพื่อย่อยสลายไคตินบริเวณเปลือกของปู และเมื่อนิโค extracellular product (ECP) เข้าสู่ตัวปูทำให้ปูตาย เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดและระบบประสาทถูกทำลายซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Costa-Ramos and Rowley (2004) ที่ทดลองฉีด ECP ของเชื้อ *Pseudoalteromonas atlantica* ที่แยกได้จากปูชนิด edible crabs เข้าสู่ปูปกติ พบว่าปูปกติจะมีอาการเป็นอัมพาต ไม่มีการยืดหดก้ามตาและตายลงอย่าง

รวดเร็วกว่าในเวลา 60-90 นาที เนื่องจากระบบประสาทถูกทำลาย เมื่อเปิดกระดองออกเพื่อตรวจดูอวัยวะภายในพบว่า ภายใน tubules ของเนื้อเยื่อตับเกิดความเสียหาย และจากการศึกษาของสุธี (2548) พบว่าปูทะเลที่มีอาการท้องแดงจะมีอาการแข็งขี้ม เคลื่อนที่ช้าและตายในที่สุด เมื่อนำเลือดมาตรวจพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของสีเลือดโดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ สีส้ม สีส้มขาวและ สีขาว คล้ายน้ำนมตามลำดับ เมื่อศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่า ปูทุกระยะที่เป็นโรคมักมีการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งหรือแท่งโค้งงอ และในระยะที่เลือดมีสีขาวคล้ายน้ำนมมีการติดเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 2 ชนิด

ส่วนโรคในปูที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสนั้น Chen *et al.* (2000) ได้ทดลองฉีดเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) เข้าในปูชนิด *S. serrata* ในระยะ benthic larvae ซึ่งตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่าหลังจากได้รับเชื้อ WSSV 15 วัน ปูมีอัตราการตายสูงถึง 43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปูที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อนั้นมื่ออัตราการตาย 20% และจากการยืนยันผลด้วยวิธี *in situ* hybridization พบเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อของลูกปูทะเลเหมือนกับที่พบในกุ้ง นอกจากนี้ทางตอนใต้ของประเทศไทยยังพบเชื้อไวรัสชื่อ mud crab reovirus (MCRV) ที่แยกเชื้อมาจากฟาร์มเลี้ยงปูทะเล ซึ่งเชื่อดังกล่าวมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 นาโนเมตร จะแพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายของปูบริเวณ ตับ เหงือก และลำไส้ จากนั้นจะพัฒนาตัวเองเป็นไวรัสในไซโตพลาสซึม โดยปูที่เป็นโรคนั้นจะไม่กินอาหารและไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งที่มีกระตุ้น นอกจากนี้อวัยวะภายใน เช่น ตับ และเหงือก เกิดการตายของเซลล์แบบ necrosis (เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตายแบบ necrosis นี้ ทั้งนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลาย ทำให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์รวมทั้งเอนไซม์ถูกปล่อยออกมา ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ที่อยู่ข้างเคียงถูกทำลายไปด้วยและเกิดการอักเสบขึ้นในบริเวณนั้น) เมื่อนำเชื้อเข้าสู่ร่างกายของปูโดยการฉีดและให้กินเชื้อ (MCRV) พบว่าปูมีการตาย 100 % (Weng *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ Boeger *et al.* (2005) พบว่าเชื้อราในไฟลัม Ascomycota เป็นสาเหตุทำให้ปูชนิด mangrove crab (*Ucides cordatus*) ที่อยู่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล เป็นโรค lethargic crab disease (LCD) โดยปูมีอาการแข็งขี้ม และจากการศึกษาทางพยาธิวิทยา พบว่ามี hyphae conidia และ codiophores กระจายอยู่ทั่วไปภายในเนื้อเยื่อ และจากการได้ศึกษา ระดับโมเลกุลพบว่าเชื้อรานี้จัดอยู่ในไฟลัม (phylum) Ascomycota และชั้นไฟลัม (subphylum) Pezizomycotina

Andersen *et al.* (2000) พบโรค rust spot shell disease ในปูชนิด *S. serrata* ที่อาศัยอยู่บริเวณรัฐ Queensland ของประเทศออสเตรเลีย โดยบริเวณกระดองจะเกิดบาดแผลเป็นจุดสีดำ และ

จากการสำรวจจำนวน 673 ตัว พบว่าเป็นโรคดังกล่าวถึง 82.9% เมื่อศึกษาทางพยาธิวิทยาพบว่า ภายในเซลล์เกิดช่องว่างในชั้นเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้แก่ upper endocuticle adhesive epithelium และพบกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมตัวเป็นกลุ่ม ๆ (island) ใน fibrous connective tissue (Fe) ที่อยู่ระหว่าง endocuticle และ attached muscle และเซลล์ epidermis และ internal cuticular เกิดความเสียหาย

## 5. ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่มครัสเตเชีย (crustacean) สัตว์ในกลุ่มนี้จะมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific immune) ที่เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) (Bachere *et al.*, 2000) ดังนั้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ปูทะเลจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมนั้นด้วยระบบภูมิคุ้มกัน 2 แบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) โดยอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดเป็นหลัก (Smith *et al.*, 2003; Rowley and Powell, 2007)

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ เป็นระบบการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญมี 3 ชนิด คือ hyaline cell, small granular และ large granular (Hose *et al.*, 1990; Clare and Lumb, 1994) ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์มี 3 กระบวนการหลัก คือ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) อาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิด hyaline cell โดยเซลล์เม็ดเลือดจะยึดส่วนของไซโทพลาซึมออกมาโอบล้อมสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กเกิดเป็นฟาโกโซม (phagosome) จากนั้นไลโซโซม (lysosome) จะทำหน้าที่ย่อยสลายสิ่งแปลกปลอม (Clare and Lumb, 1994) ส่วนกระบวนการ encapsulation เป็นกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เช่น ปรสิตร โดยอาศัยเม็ดเลือดชนิด small และ large granule (Clare and Lumb, 1994; Smith *et al.*, 2003) ขณะที่กระบวนการ nodule formation เป็นกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่และมีปริมาณมาก โดยอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูล ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้ามารวมกันกลางเซลล์ (Smith *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ฟีโนลออกซิเดส (phenoloxidase) ซึ่งจะทำงานร่วมกับเมลานิน ช่วยในการทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Johansson and Soderhall, 1989; Clare and Lumb, 1994; Smith *et al.*, 2003; Rowley and Powell, 2007) ซึ่ง

Tanner *et al.* (2006) ศึกษากิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในปูชนิด *C. sapidus* พบว่าเมื่อปูอยู่ในสภาพออกซิเจน และค่า pH ลดต่ำลง ส่งผลทำให้กิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส ลดลง

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) อาศัยการทำงานของเม็ดเลือดในการผลิตสารโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น สารต้านแบคทีเรีย (antibacterial peptide) (Smith *et al.*, 2003; Rowley and Powell, 2007)

Jayasankar and Subramoniam (1999) รายงานว่าสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial protein) ซึ่งแยกได้จาก seminal plasma ของปูชนิด *S. serrata* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Cytophaga sp.*, *V. furnissi* และ *Alteromonas sp.* ได้ ส่วน Huang *et al.* (2006) รายงานว่าพบสารต้านแบคทีเรียชนิดใหม่คือ scygonadin ที่แยกได้จาก seminal plasma ของปูทะเล โดยมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ Relf *et al.* (1999) ศึกษารูปแบบโปรตีนจากเม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูล (granular hemocytes) ในปูชนิด shore crab (*Carcinus maenas*) พบโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุล 11.5 kDa สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Planococcus citreus* และ *Micrococcus luteus*

การแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ถือเป็นกลไกที่สำคัญในการป้องกันเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย และเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดออกจากร่างกายเมื่อได้รับบาดแผล (Clare and Lumb, 1994) การศึกษาในแมงดาทะเลชนิด *Tachypleus trihypleus* พบโปรตีน 5 ชนิด ที่ทำให้เลือดเกิดการแข็งตัวคือ serineproteinase zymogen factor C, B, G, proclotting enzyme และ clottable protein เมื่อถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) factor C จะเปลี่ยนเป็น factor C\* จากนั้นจึงไปกระตุ้น factor B ให้กลายเป็น factor B\* ในขณะที่  $\beta$ -1,3 glucan จะกระตุ้น factor G กลายเป็น factor G\* จากนั้น factor B\* และ factor G\* จะทำงานร่วมกับ proclotting enzyme กลายเป็น clotting enzyme ซึ่งกระตุ้นให้ coagulogen เกิดการเปลี่ยนแปลงของไปเป็น coagulin จับตัวกันเป็นร่างแหทำให้เลือดแข็งตัวไม่สามารถไหลออกจากร่างกาย (Nakamura *et al.*, 1989; Iwanaga, 1998; Seki *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Yeh *et al.* (1998) ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดกึ่งกุลาคำ โดยแยก clottable protein จากน้ำเลือด ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดจาก transglutaminase (TGase) ทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) กระตุ้นให้เกิด clotting protein เกิดการแข็งตัวของเลือด

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การศึกษาลักษณะภายนอกของปูทะเลที่มีอาการท้องแดง

#### 1.1 การเก็บตัวอย่างปูทะเล

เก็บตัวอย่างปูทะเลจากฟาร์มเลี้ยงปูในจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดจันทบุรีช่วงเดือนตุลาคม 2551 ถึงกุมภาพันธ์ 2552 จำนวน 22 ตัว เพื่อนำมาสังเกตลักษณะภายนอกของตัวปู ได้แก่ สีของกระดอง รยางค์ขาเดิน เป็นต้น สังเกตพฤติกรรมเมื่อปูถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า และเจาะเลือด (haemolymph) เพื่อดูสีเลือด โดยใช้สีเลือดเป็นเกณฑ์ในการจัดแบ่งกลุ่มปู ปูที่มีสีเลือดเหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสามารถแบ่งปูออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มเลือดใส กลุ่มเลือดส้ม ใส กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาเย็น และกลุ่มเลือดสีขาวคล้ายน้ำนม จากนั้นทำความสะอาดบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ด้วย 70% ethanol แล้วใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 ซึ่งทำให้ชุ่มด้วย 10% trisodium citrate (เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด) เจาะเลือดปูบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ตามวิธีการของ Salaenoi *et al.* (2006) เก็บตัวอย่างเลือดปูใส่ในหลอดทดลองจากนั้นนำเลือดมาตรวจหาระยะเวลาในการแข็งตัวของเลือด ก่อนเก็บอวัยวะภายในให้นำปูแช่ในน้ำที่เย็นจัดเป็นเวลาประมาณ 1 นาทีเพื่อให้ปูสลบแล้วจับตัวปูให้แห้งด้วยผ้าที่สะอาด จากนั้นเปิดกระดองปูออกเพื่อตรวจสอบอวัยวะภายใน ได้แก่ ความคงรูปของเหงือก (gill) ตับ (hepatopancreas) กล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) แล้วจึงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

### 2. การตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

#### 2.1 การแยกเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

ตัวอย่างปูทะเลสภาพปกติและปูทะเลที่มีอาการท้องแดงถูกนำมาแยกเชื้อจากอวัยวะที่ต้องการศึกษา ได้แก่ หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับ เหงือก และเลือด ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic technique) ลงบนอาหาร TSA (Tryptic Soy Agar) ที่เติม 1.5% NaCl และอาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีเดี่ยว ๆ และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันถ่ายเชื้อลงบน slant ของอาหาร TSA พร้อมทั้งเจียรนาศเชื้อกำกับไว้ จากนั้นเก็บเป็น stock culture เพื่อทำการแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

## 2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยพิจารณาจาก ลักษณะของโคโลนี การข้อมแกรม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้จากปุทะเลปกติและปุทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20E และส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

## 3. การทดสอบฉีดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

### 3.1 การเตรียมตัวอย่างปุทะเล

นำตัวอย่างปุทะเลปกติที่มีขนาดความกว้างของกระดองประมาณ 8.4-10 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 130-230 กรัม มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเลี้ยงในภาชนะที่ใส่น้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 ppt เพื่อปรับสภาพก่อนทำการทดลองประมาณ 3 วัน โดยให้อาหารเป็นปลาทะเลสดสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ วันละ 1 ครั้ง และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ก่อนทำการทดลองจะฉีดให้อาหารปุทะเลเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง และแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยในแต่ละชุดการทดลองใช้ปุทะเลจำนวน 5 ตัว คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $5.98 \times 10^8$  CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $1.01 \times 10^9$  CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 3 ฉีด 0.85% NaCl (ชุดควบคุม)

### 3.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบการฉีดเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* มาเลี้ยงลงบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl จากนั้นเลือกโคโลนีที่ขึ้นเดี่ยว ๆ ซึ่งมีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงลงในอาหาร TSB ที่เติม 1.5% NaCl นำไปปั่นผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง  $0.14 \pm 0.005$  ซึ่งเทียบได้กับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ประมาณ  $10^8$  และ  $10^9$  CFU/ml ตามลำดับ จากนั้นดูดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติก นำไปปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็วรอบ

6,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที คูดสารละลายอาหาร TSB ที่เติมสารละลาย 0.85% NaCl ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อล้างเซลล์ออกจากเนื้ออาหาร TSB แล้วคูดสารละลาย 0.85% NaCl ที่ ต่อมาจึงเติมสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีเชื้อแบคทีเรียแล้วผสมให้เข้ากัน นำสารละลายเชื้อที่ได้ฉีดเข้าไปในปุ๊ทะเลปกติบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แทนสารละลายเชื้อแบคทีเรีย หลังจากฉีดสารละลายเชื้อเป็นเวลา 6, 12, 24, 48, 96 และ 168 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนับจำนวนเม็ดเลือดรวม (total hemocytes count)

### 3.3 การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes count)

เตรียมตัวอย่างเลือดปุ๊ทะเล โดยใช้เอทานอล 70% ทำความสะอาดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 โดยใช้เข็มเบอร์ 21 ฉะเลือดปุ๊บริเวณโคนขาเดิน นำเลือดที่ได้เก็บในหลอดพลาสติกที่มี 10% trisodium citrate (อัตราส่วน 1:1) บรรจุอยู่ หลังจากนั้นข้อมเม็ดเลือดด้วยสารละลาย 0.15 % trypan blue ในสารละลาย 2.6% NaCl แล้วจึงนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ haemocytometer คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้ในหน่วยเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ( $\text{cell}/\text{mm}^3$ )

## 4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อปุ๊ทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

นำปุ๊ทะเลปกติและปุ๊ทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีเลือดใส จำนวน 2 ตัว และกลุ่มที่มีเลือดส้ม จำนวน 2 ตัว มาแช่ในน้ำที่เย็นจัดเป็นเวลาประมาณ 1 นาที เพื่อให้ปุ๊สลบแล้ว ซับตัวปุ๊ให้แห้งด้วยผ้าที่สะอาด จากนั้นเปิดกระดองออกเพื่อเก็บอวัยวะภายในได้แก่ หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับ และเหงือก และแช่ในน้ำยาเดวิสสัน (Davison) นานประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดแบ่งแต่ละเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร บรรจุไว้ใน embedding cassette นำมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์และเติมพาราฟิน โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor โดยใช้เวลาประมาณ 15 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นเนื้อเยื่อมาวางไว้ในพิมพ์ทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน นำแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้ไปลอยในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซ้อนแผ่นเนื้อเยื่อวางบน สไลด์และอุ่นไว้บน slide warmer อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ข้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin แล้วพ่นกด้วยน้ำยา permount พร้อมด้วยปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ หลังจากนั้นนำสไลด์มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแต่ละอวัยวะต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

## ผลและวิจารณ์

### 1. สภาพแวดล้อมภายในฟาร์มเลี้ยงปู

ตัวอย่างปูทะเลเก็บจากฟาร์มเลี้ยงปูทะเลในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 2 ฟาร์ม และอำเภอคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 2 ฟาร์ม โดยฟาร์มตั้งอยู่ในพื้นที่บริเวณป่าชายเลน ซึ่งเป็นเขตนํ้ากร่อยจนถึงนํ้าเค็ม ซึ่งมีรูปแบบการเลี้ยง 2 แบบ คือ การเลี้ยงปูนิ่มและการเลี้ยงปูขุน โดยการเลี้ยงปูเพื่อทำเป็นปูนิ่มจะเลี้ยงในตะกร้าพลาสติกซึ่งอยู่ในบ่อดินที่มีความลึกของระดับนํ้าไม่เกิน 2 เมตร ตะกร้าพลาสติกสำหรับเลี้ยงปูถูกมัดติดกันเป็นแพยึดอยู่บนเสาไม้ ซึ่งตะกร้าพลาสติกทำด้วยโพลีเอธิลีนขนาด 23x26x20 เซนติเมตร ภายในตะกร้าบรรจุปูตะกร้าละ 1 ตัว โดยตะกร้าที่เลี้ยงปูส่วนหนึ่งจะจมอยู่ในนํ้าประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงของตะกร้า ปูที่ปล่อยลงเลี้ยงในตะกร้าเป็นปูกระดองแข็ง และมีการให้ปลาสับเป็นอาหาร วันละครั้ง ซึ่งระยะเวลาในการเลี้ยงปูกระดองแข็งเพื่อให้ลอกคราบเป็นปูนิ่มใช้เวลาไม่เกิน 30 วัน ส่วนการเลี้ยงปูขุนเป็นการปล่อยปูลงเลี้ยงในบ่อดินที่มีลักษณะเป็นดินโคลนเพื่อให้ปูมีพื้นที่ในการฝังตัวสำหรับหลบซ่อน โดยเกษตรกรปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติจนได้ขนาดที่ต้องการจึงจับไปจำหน่าย

ลักษณะฟาร์มเลี้ยงปูในแต่ละบริเวณพบว่าสภาพแวดล้อมแตกต่างกันไป บางฟาร์มอยู่ในเขตที่เป็นแหล่งนํ้าธรรมชาติที่มีการถ่ายเทหมุนเวียนนํ้าค่อนข้างดี การจัดการฟาร์มค่อนข้างดี สะอาด จำนวนปูที่มีอาการผิดปกติพบเป็นจำนวนน้อย บางฟาร์มตั้งอยู่ในเขตที่มีการถ่ายนํ้าไม่ค่อยดี ทำให้เกิดการสะสมของตะไคร่นํ้าเกาะอยู่ตามตัวปู ตะกร้าพลาสติกสำหรับเลี้ยงปู และแพพลาสติก ไม่มีการจัดการขยะมูลฝอย และพบซากปูที่ตายเนื่องจากไม่ลอกคราบและปูที่มีอาการผิดปกติจำนวนมาก โดยในระหว่างการเลี้ยงเกษตรกรมีการเติมนํ้าชีวภาพ (EM) เพื่อปรับสภาพนํ้าภายในบ่อให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเกษตรกรยังมีการเลี้ยงปูรวมกับการเลี้ยงกุ้งทะเลภายในบ่อเดียวกันอีกด้วย

### 2. ลักษณะภายนอกและภายในของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

จากการสำรวจฟาร์มเลี้ยงปูทะเลในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี และอำเภอคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม ช่วงเดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2552 จำนวน 100 ตัว พบปูทะเลที่มีลักษณะแตกต่างจากปูปกติอย่างชัดเจน คือบริเวณอก ท้อง ข้อต่อ และรอยง่ามขาของปู มีสีแดง และสีเหลืองปนนํ้าตาล อวัยวะภายในมีลักษณะไม่คงรูป ก้ามเนื้อ โพรก ลักษณะของสีเนื้อและก้าม มีสีขาวปนจนถึงสีชมพูอ่อน ซึ่งปูที่มีอาการรุนแรงและก้ามไม่สามารถเคลื่อนไหวได้และตายลง

อย่างรวดเร็ว เลือดมีสีตั้งแต่ใสจนถึงสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตามระดับความรุนแรงของความโรค คือ ในปฏ 100 ตัว แบ่งออกเป็น กลุ่มเลือดใส จำนวน 35 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-350 กรัม ขนาดความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 8.70-8.94 เซนติเมตร กลุ่มเลือดส้มใส จำนวน 31 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-440 กรัม ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 9.60-12.96 เซนติเมตร กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น จำนวน 4 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 150-260 กรัม ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 8.56 -11.05 เซนติเมตร กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาเย็น จำนวน 2 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 220-230 กรัม ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 9.75- 10.05 เซนติเมตร และกลุ่มเลือดขาวคล้ายน้ำมันจำนวน 1 ตัว น้ำหนัก 250 กรัม ความกว้างของกระดอง 10.20 เซนติเมตร ส่วนปฏิกิตจำนวน 27 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-250 กรัม ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 9.60-10.50 เซนติเมตร ซึ่งมีรายละเอียด (ภาพที่ 1-6) ดังนี้

ปูทะเลปกติบริเวณอก-ท้อง ข้อต่อ และรอยก้นขาเดินมีสีขาว เลือดใส (เมื่อสัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า) เลือดแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 นาที กล้ามเนื้อลำตัวใส เนื้อแน่น อวัยวะภายในได้แก่ ตับ เหงือก หัวใจ สดและคงรูป เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นปฏิกิตการชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว มีการเคลื่อนไหวร่างกายได้ดีและรวดเร็ว (ภาพที่ 1 )

ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่ม 1 เลือดใสจนถึงสีฟ้าอ่อน บริเวณท้องทั้งหมดมีสีเหลืองปนสีน้ำตาล รอยต่อระหว่างลำตัวและรอยก้นขาเดินมีสีน้ำตาล เมื่อมองผ่านรอยต่อระหว่างรอยก้นขาเดินกับลำตัวเห็นกล้ามเนื้อสีขาวขุ่น ตับมีสีเหลืองอ่อน เหงือกและหัวใจคงรูปคล้ายปูทะเลปกติ เนื้อแน่น กล้ามเนื้อลำตัวและกล้ามเนื้อขาเดินมีสีขาวขุ่นและสีชมพูอ่อน มองเห็นแนวเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน การแข็งตัวของเลือดใช้เวลา 2-3 นาที เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นปฏิกิตการชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว มีการเคลื่อนไหวได้ดีและรวดเร็ว (ภาพที่ 2 )

ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่ม 2 เลือดสีส้มใส บริเวณท้องมีสีชมพู รอยต่อระหว่างลำตัวและรอยก้นขาเดินมีสีชมพู มองเห็นเนื้อขาวขุ่น อวัยวะภายใน เช่น ตับและหัวใจมีสีซีดกว่าปกติ เหงือกนึ่ม กล้ามเนื้อ โพรกแต่อวัยวะภายในต่าง ๆ มีลักษณะปกติ ส่วนกล้ามเนื้อลำตัว และกล้ามเนื้อขาเดินมีสีขาวขุ่นมองเห็นแนวเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน การแข็งตัวของเลือดใช้เวลาประมาณ 6 นาที เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นปฏิกิตการชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว เคลื่อนไหวได้ดีและรวดเร็ว (ภาพที่ 3 )

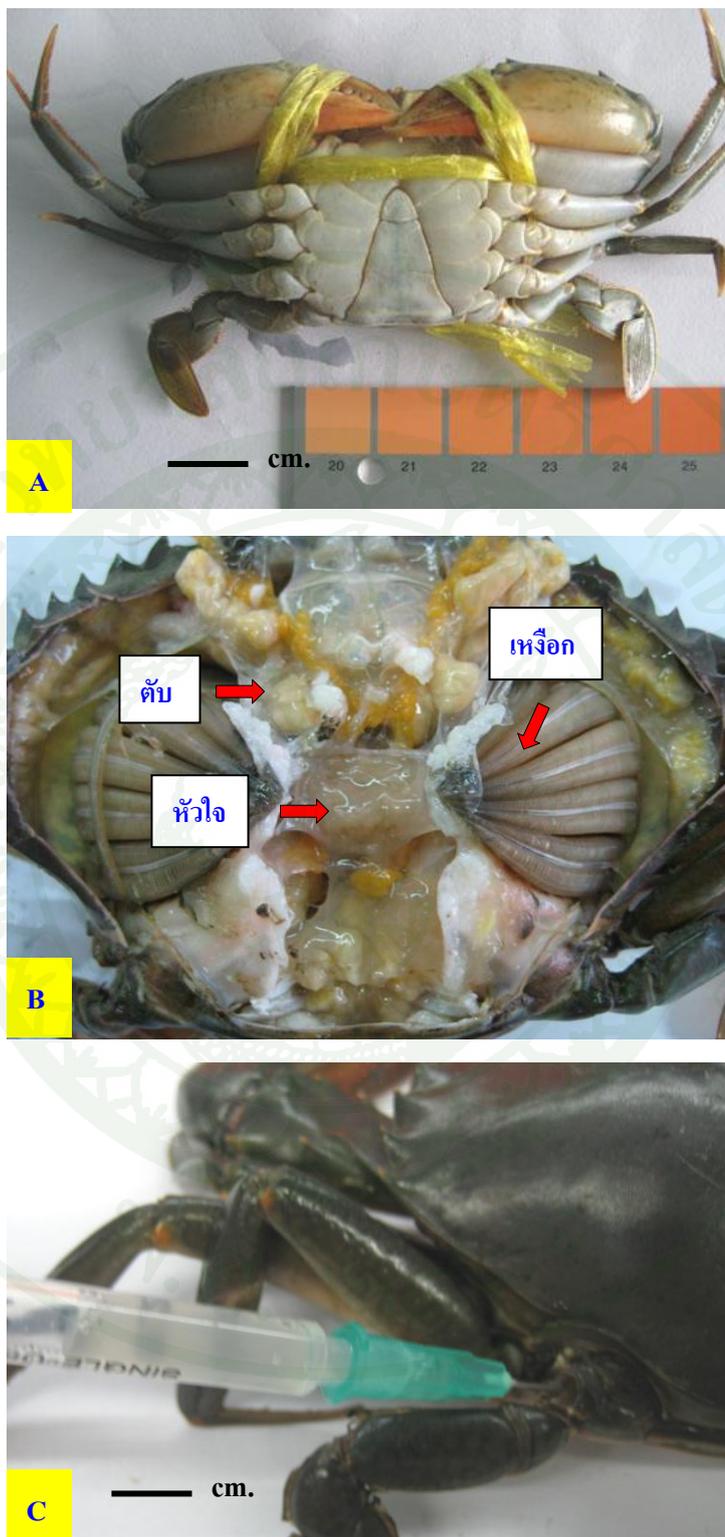
ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่ม 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น บริเวณท้องมีสีเหลืองปนสีน้ำตาลเข้ม รอยพับระหว่างลำตัวและรอยก้นขาเดินมีสีน้ำตาล เมื่อมองผ่านช่องระหว่างลำตัวและ

รยางค์ขาเดินเห็นกล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น อวัยวะภายใน เช่น ตับ หัวใจ เหงือก มีเลือดสีส้มคล้ายสีชาดำ เย็นกระจายอยู่ทั่วอวัยวะ เหงือกนุ่มกว่าปกติ กล้ามเนื้อโพรงมากขึ้น การจัดเรียงตัวของกล้ามเนื้อ มองเห็นเป็นเส้นชัดเจน กล้ามเนื้อลำตัวและกล้ามเนื้อที่ก้ามมีสีขาวขุ่นการแข็งตัวของเลือดใช้เวลา ประมาณ 13 นาที ปูมีการเคลื่อนไหวและมีการตอบสนองต่อสิ่งที่กระตุ้นได้อย่างปกติ (ภาพที่ 4)

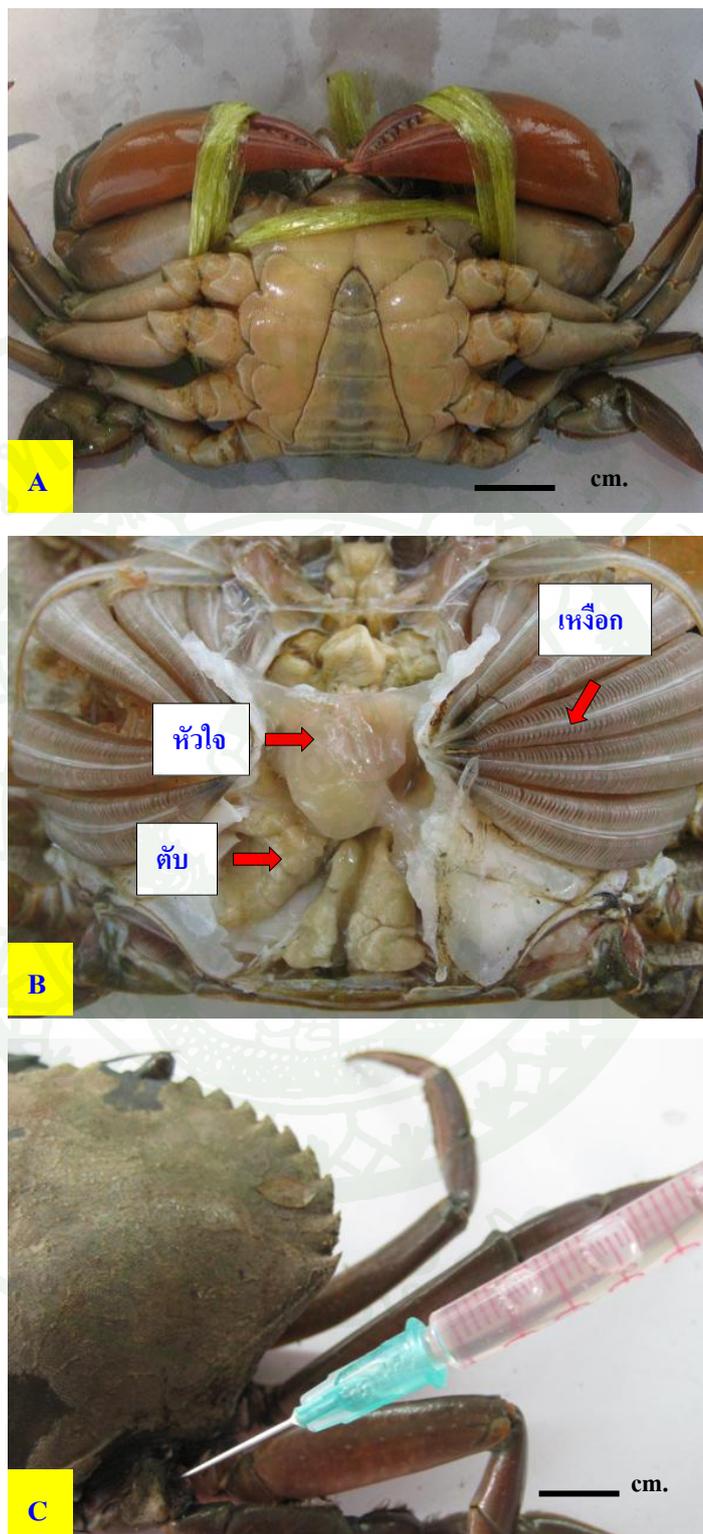
ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่ม 4 เลือดสีส้มคล้ายสีชาเย็น บริเวณท้องและมีสีแดงเป็น แถบ ๆ รยางค์ขาเดินและก้ามมีสีแดง อวัยวะภายในมีความผิดปกติ เช่น ตับมีสภาพและ หัวใจไม่คง รูป เหงือกนุ่มกว่าปกติ เลือดสีชาเย็นกระจายทั่วอวัยวะภายใน กล้ามเนื้อโพรง และเลือดไม่มีการ แข็งตัวเมื่อวางทิ้งไว้ ระยะเวลาปูเริ่มมีการตอบสนองและเคลื่อนไหวช้าลง (ภาพที่ 5)

ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่ม 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม บริเวณท้องมีสีแดงปนส้ม รอยต่อระหว่างลำตัวและรยางค์ขาเดินมีสีน้ำตาล ปูในระยะนี้มีอาการรุนแรงมากที่สุด เนื่องจากปูจะมีชีวิตอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมงก็ตายลง เมื่อเปิดกระดองออกจะพบอวัยวะภายในมีเลือดสีขาวขุ่นคล้าย น้ำนมกระจายอยู่ทั่วไป กล้ามเนื้อเหลว โพรง เลือดไม่มีการแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ ปูจะอยู่นิ่ง เคลื่อนไหวช้ามากจนถึงไม่สามารถเคลื่อนไหวร่างกายได้ เมื่อสัมผัสก้านตามีการตอบสนองช้า (ภาพที่ 6)

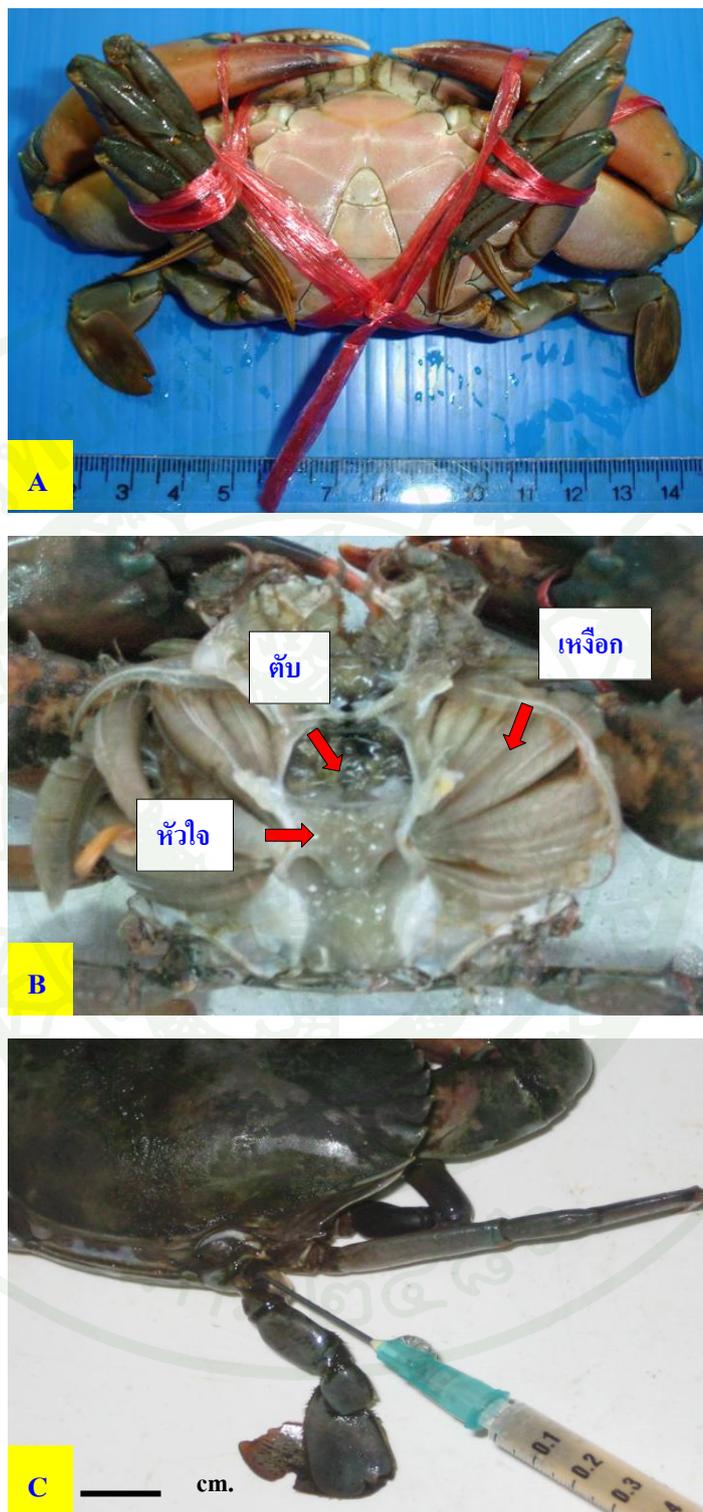
ซึ่งลักษณะของปูทะเลทั้ง 5 กลุ่ม สรุปได้ดังตารางที่ 1



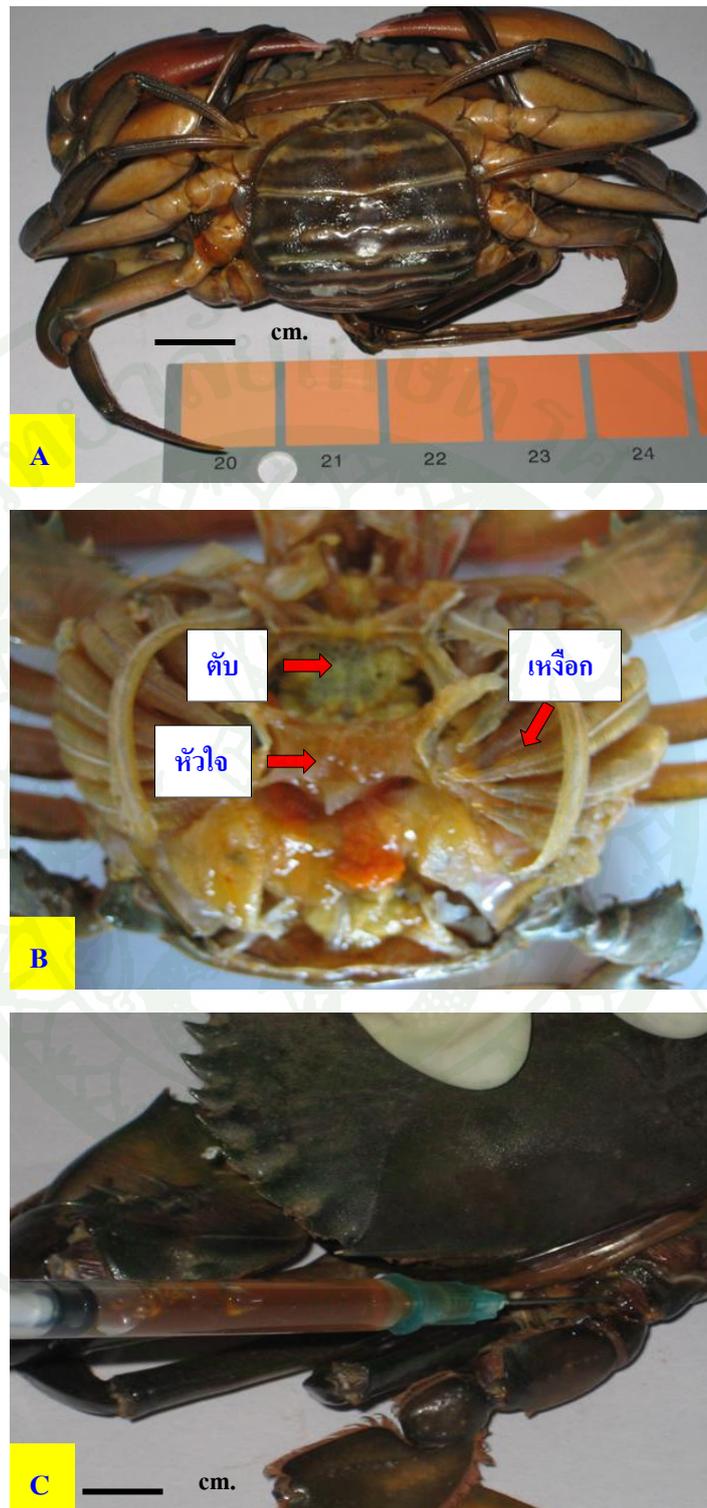
ภาพที่ 1 ลักษณะของปูทะเลปกติซึ่งบริเวณท้องมีสีขาว (A) อวัยวะภายในปกติ (B) และเลือดใส (C) เมื่อสัมผัสอากาศจึงเปลี่ยนเป็นสีฟ้า



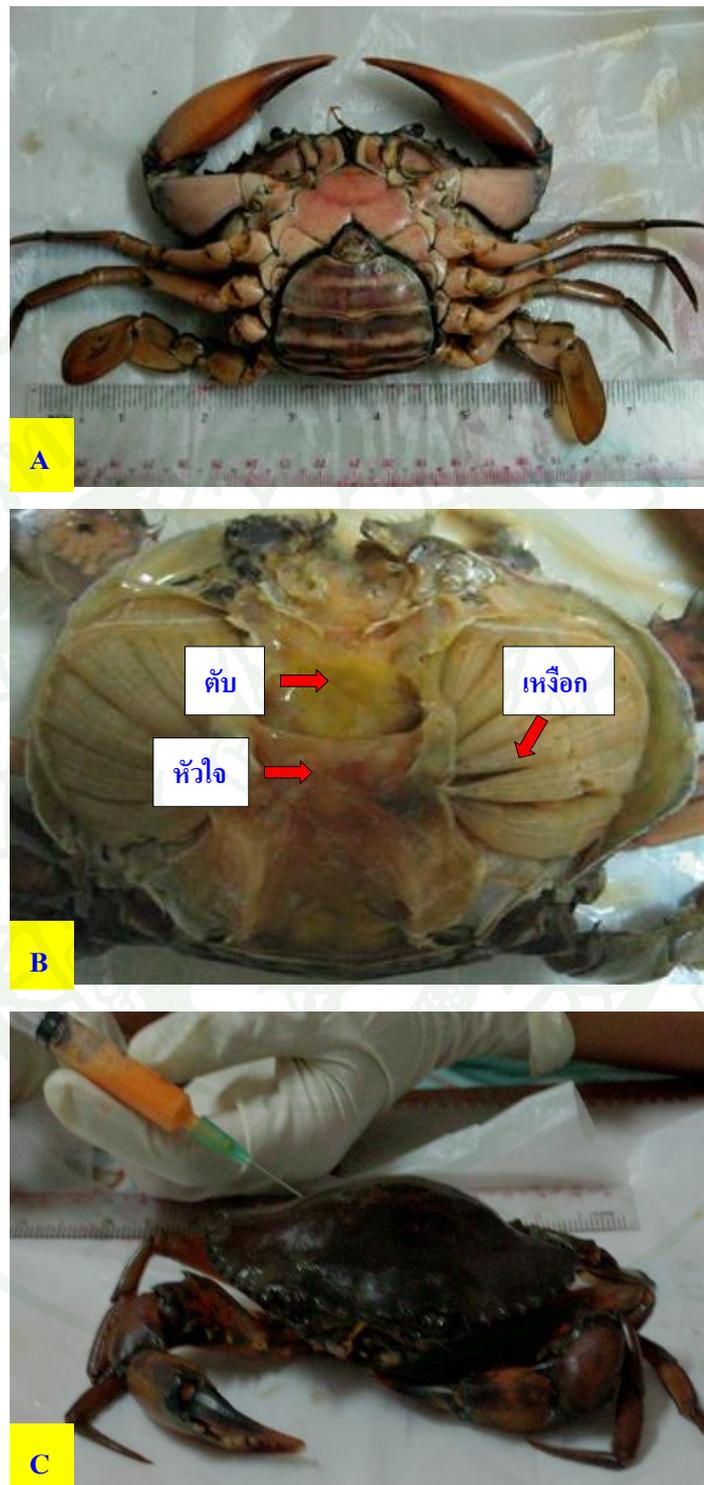
ภาพที่ 2 ลักษณะของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดใส (กลุ่ม 1) ซึ่งบริเวณท้องมีสีน้ำตาล (A) อวัยวะภายในปกติ (B) และเลือดใส (C) เมื่อสัมผัสอากาศจึงเปลี่ยนเป็นสีฟ้า



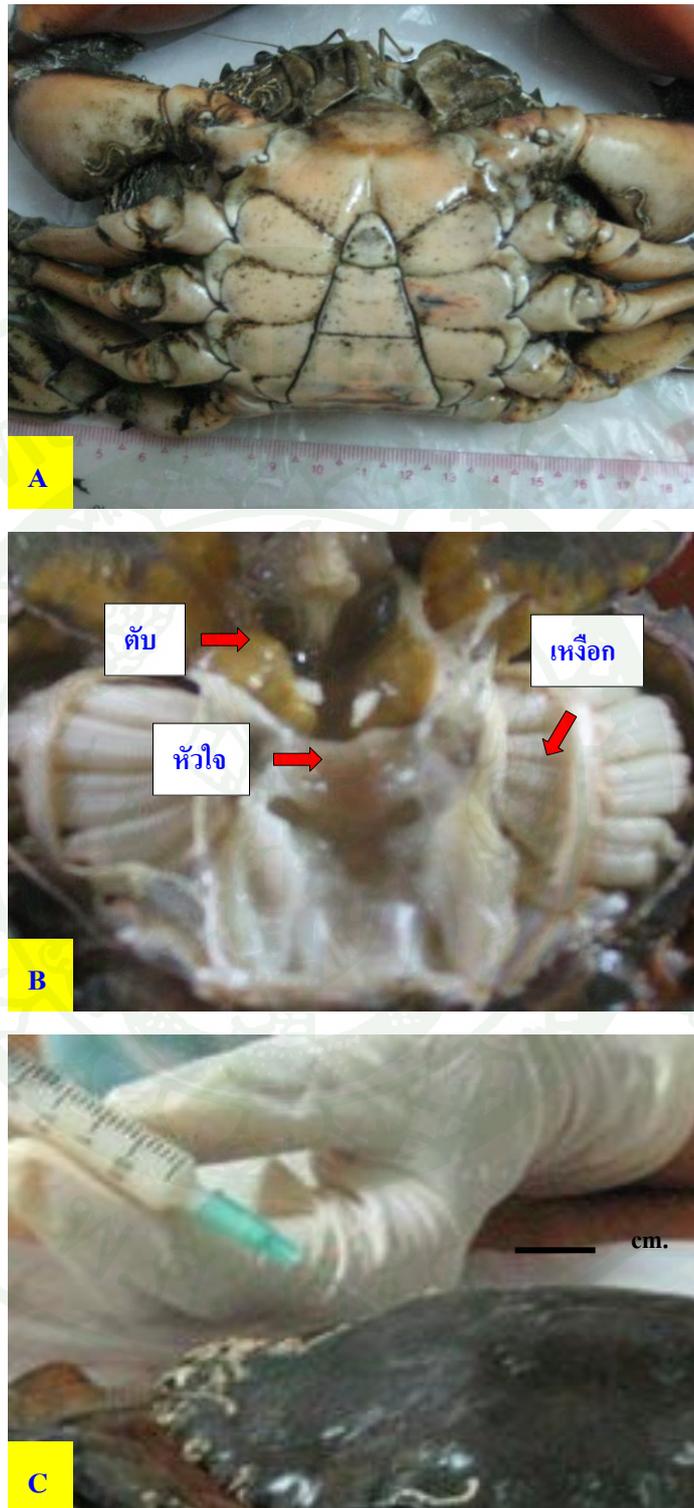
ภาพที่ 3 ลักษณะปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงเลือดส้มใส (กลุ่ม 2) ซึ่งบริเวณท้องมีสีชมพู (A) อวัยวะภายในปกติ (B) แตกกล้ามเนื้อโพรง และเลือดมีสีส้มใส (C)



ภาพที่ 4 ลักษณะของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น (กลุ่ม 3) บริเวณท้องมีสีน้ำตาล (A) อวัยวะภายในเริ่มและนึ่ม มีเลือดกระจายทั่วไปภายในลำตัว กล้ามเนื้อโพรก (B) และเลือดมีสีส้มชาดำเย็น (C)



ภาพที่ 5 ลักษณะของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดส้มคล้ายสีชาเข็น (กลุ่มที่ 4) บริเวณท้อง มีสีแดง (A) อวัยวะภายในน้มนมและ เหงือกน้มนม กล้ามเนื้อโพรง มีเลือดกระจายทั่วไป ภายในลำตัว (B) และเลือดมีสีส้มชาเข็น (C)



ภาพที่ 6 ลักษณะของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเลือดขาวคล้ายน้ำนม (กลุ่ม 5) บริเวณท้องมีสีแดง  
 (A) อวัยวะภายในและ เหงือกน้มนม กล้ามเนื้อโพรก และมีเลือดกระจายทั่วไปภายในลำตัว  
 (B) และเลือดมีสีขาวคล้ายน้ำนม (C)

ตารางที่ 1 สรุปลักษณะของปุ๋ยมะลที่มีอาการออก-ท้องแดงทั้ง 5 กลุ่ม

ลักษณะของปุ๋ยมะล	ปุ๋ยมะลที่มีอาการออก-ท้องแดง				
	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3	กลุ่ม 4	กลุ่ม 5
<b>ลักษณะภายนอก</b>					
ท้อง	สีแดง	สีแดง	สีเหลืองปนสีน้ำตาล	สีเหลืองปนสีน้ำตาล	สีแดง
รยางค์ขาเดิน	สีเหลืองปนน้ำตาล	สีแดง	สีแดง	สีแดง	สีแดง
รยางค์ก้าม	สีเหลืองปนน้ำตาล	สีแดง	สีแดง	สีแดง	สีแดง
<b>ลักษณะภายใน</b>					
ตับ	สีเหลือง	สีเหลืองซีด	สีเหลืองส้ม	สีเหลือง	สีเหลือง
เหงือก	คงรูป	คงรูป	คงรูปแต่นิ่ม	มีสีส้มคงรูปแต่นิ่ม	มีสีขาวคงรูปแต่นิ่ม
กล้ามเนื้อลำตัว	ขาวขุ่นมองเห็นเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้อชัดเจน	ขาวขุ่นมองเห็นเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้อชัดเจน	สีส้มมองเห็นเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้อชัดเจน	สีส้มมองเห็นเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้อชัดเจน	ขาวขุ่นมองเห็นเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้อชัดเจน
กล้ามเนื้อขา	ขาวขุ่นจนถึงสีชมพูอ่อน	ขาวขุ่น	ขาวขุ่น	สีส้ม	ขาวขุ่น
กล้ามเนื้อก้าม	สีขาวยขุ่นจนถึงสีชมพู ยึดติดกับเปลือกดี	สีขาวยขุ่นเริ่มยึดติดกับเปลือกไม่ค่อยดี	สีส้ม ยึดติดกับเปลือกไม่ดี	สีส้ม นิ่ม ยึดติดกับเปลือกไม่ดี	ขาวขุ่นนิ่ม ยึดติดกับเปลือกไม่ดี
<b>เลือด</b>					
สีเลือด	ใส	สีส้มใส	สีส้มคล้ำยชาดำเข็น	สีส้มคล้ำยชาเข็น	สีขาวยขุ่นคล้ำยน้ำตาล
ระยะเวลาในการแข็งตัว	2-3 นาที	6 นาที	13 นาที	ไม่แข็งตัว	ไม่แข็งตัว

## ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลักษณะของปู	ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง					
	ทะเล	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3	กลุ่ม 4	กลุ่ม 5
พฤติกรรม						
การตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น	ชูก้ามป้องกันตัว	ชูก้ามป้องกันตัว	ชูก้ามป้องกันตัว	ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นเล็กน้อย	ไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น	
การเคลื่อนที่	รวดเร็ว	รวดเร็ว	รวดเร็ว	เคลื่อนที่ได้เล็กน้อย	ไม่เคลื่อนที่	

จากการศึกษาพบปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งสังเกตได้จากรอยต่อระหว่างกระดองกับจับปิ้งมีรอยแตกแยกออกจากกัน โดยปูที่เป็นโรคในระยะลอกคราบน้ำปูไม่สามารถลอกคราบเก่าออกได้ (Floreto *et al.*, 2000; Salaenoi *et al.*, 2006) เนื่องจากปูที่เป็นโรคมิการกินอาหารน้อยลงทำให้ปูได้รับสารอาหาร เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแคลเซียม เป็นต้น ไม่เพียงพอ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสะสมในการนำไปใช้ในกระบวนการลอกคราบ (บรรจง และ บุญรัตน์, 2545) จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงตายลง เนื่องจากลอกคราบไม่ออก

ผลจากการศึกษาพบว่า ข้อมูลมีความสอดคล้องกับรายงานของ Salaenoi *et al.* (2006) ที่พบว่าปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงจะมีกระดองที่มีความแข็งแรงน้อยกว่าปูปกติ บริเวณท้อง รยางค์ก้าม และขามีสีแดง เชื้องซึม เคลื่อนไหวช้า ลอกคราบไม่ออก และตายลงในที่สุด คล้ายคลึงกับ pink crab disease (PCD) ที่พบในปูชนิด *Cancer pagurus* (Stentiford *et al.*, 2002) และ bitter crab disease พบในปูชนิด *Chionoecetes bairdi* ชนิด *Chionoecetes opilio* (Meyers *et al.*, 1987; Taylor and Khan, 1995) และชนิด *Necora puber* (Wilhelm and Mialhe, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าในกุ้งทะเลชนิด *Pandalus platyceros* ที่พบปรสิตที่มีลักษณะคล้ายกลุ่ม dinoflagellate ในระยะ plasmodia กระจายอยู่ภายในช่องว่างของเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมากนั้นทำให้เลือดของกุ้งมีสีขาวุ่นเช่นเดียวกัน (Bower and Meyer, 2002)

การศึกษาลักษณะภายนอกของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง ได้แก่ สีของอก ท้อง รยางค์ขาเดิน และรยางค์ก้าม พบว่ามีทั้งสีเหลืองปนน้ำตาลและสีแดงซึ่งแตกต่างจากปูทะเลปกติที่บริเวณอก ท้อง รยางค์ขา และรยางค์ก้ามมีสีขาว ซึ่งเกิดจากกระบวนการ hyperpigmentation จึงทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงของปริมาณรงควัตถุภายในร่างกาย (Stentiford *et al.*, 2002) เนื่องจากปริมาณของ คาโรทีนอยด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นจำนวนมากจากเซลล์อีพิเดอร์มิสซึ่งเสียหาย โดยตรวจพบปรสิตชนิด *Hematodinium* sp. อยู่ในกระแสเลือดและเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (Meyers *et al.*, 1987; Stentiford *et al.*, 2002) และจากการศึกษาของ Stentiford and Shields (2005) รายงานว่าปูที่พบปรสิตอยู่ในระดับจำนวนมากนั้นส่งผลให้ reserve inclusion cell ลดลง ซึ่ง reserve inclusion cell เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสะสมไกลโคเจน ซึ่งไกลโคเจนนั้นมีความจำเป็นต่อการสร้างไคตินที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างภายนอกของปู (Stevenson, 1985)

จากการศึกษาลักษณะของเลือดปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงทั้ง 5 กลุ่ม พบว่าเลือดมีสีแตกต่างกันตั้งแต่ใสจนถึงสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม โดยปกติปูทะเลมีเลือดใส เนื่องจากภายในเลือดของปูมีฮีโมไซยานินที่มี Cu 2 อะตอม เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่มีตำแหน่งจับกับออกซิเจน 1 โมเลกุล อยู่ในรูป Cu (I) (deoxygenated) แต่เมื่อสัมผัสกับอากาศกลายเป็น Cu (II) (oxygenation) จึงทำให้เลือดเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีฟ้าอ่อน (Karlin *et al.*, 1987; Kitajima *et al.*, 1992) ส่วนลักษณะของเลือดมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม และไม่แข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ นั้น จากรายงานของ Stentiford *et al.* (2002) พบว่าเลือดปูชนิด *Cancer pagurus* ที่มีสีขาวเกิดจากปรสิต *Hematodinium* กระจายอยู่ในเลือดเป็นจำนวนมาก และคล้ายคลึงกับปูชนิด *Carcinus maenas* ที่มีอาการของ milky disease ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะคล้ายริกเก็ตเซียแพร่กระจายอยู่ในกระแสเลือดและส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดมีจำนวนลดลง (Eddy *et al.*, 2007) จากการศึกษาของ Shields และ Squyars (2000) รายงานว่าปูชนิด *Callinectes sapidus* ที่พบ *Hematodinium* จำนวนมากภายในกระแสเลือดจะทำให้จำนวนของเม็ดเลือดลดลงถึง 48 % ภายในเวลา 3 วัน และสอดคล้องกับ Meyers *et al.* (1987) พบว่าปูที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงที่พบปรสิตเป็นจำนวนมากภายในกระแสเลือดนั้นมีผลทำให้เลือดมีสีขุ่นและไม่แข็งตัว ซึ่งการไม่แข็งตัวของเลือดนั้นเกี่ยวข้องกับเม็ดเลือด เนื่องจากเม็ดเลือดมีบทบาทสำคัญมากในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเลซึ่งเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เม็ดเลือดสำคัญที่พบในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียมี 3 ชนิด ถูกสร้างขึ้นจาก haematopoietic tissue คือ hyaline cell ทำหน้าที่เกี่ยวกับ coagulation ส่วน large granule และ small granule ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ phagocytosis และกระบวนการ encapsulation (Hose *et al.*, 1990) และจากผลการศึกษาระยะเวลาในการแข็งตัวของเลือดพบว่า ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 4 และ 5 เลือดไม่แข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งการแข็งตัวของเลือดเป็นระบบที่ช่วยป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายเมื่อเกิดบาดแผล และป้องกันการสูญเสียเลือดออกจากร่างกาย (Clare and Lumb, 1994) Yeh *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวในเลือดกุ้งกุลาดำพบว่า เกิดจาก transglutaminase (TGase) ที่ถูกปล่อยออกมาจากเม็ดเลือด จะทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการสร้าง

clotting protein ทำให้เลือดจับตัวกันเป็นก้อนไม่ไหลออกสู่ภายนอกร่างกาย ดังนั้น การที่ปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 4 และ 5 มีอาการเลือดไม่แข็งตัว มีความเป็นไปได้ว่าเกิดความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากนี้เม็ดเลือดยังมีหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนไปสู่อวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย (Taylor *et al.*, 1996) จากการศึกษาของ Salaenoi *et al.* (2006) พบว่าปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงที่เลือดมีสีชาวน้ำขุ่นคล้ายน้ำมนั้น ไม่พบฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ซึ่งฮีโมไซยานินมีหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ดังนั้นเมื่อไม่พบฮีโมไซยานินจึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการจับออกซิเจน และการขนส่งแร่ธาตุต่าง ๆ ไปเลี้ยงร่างกายเกิดขึ้นได้น้อย จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปูตายลง

การศึกษาพฤติกรรมในการตอบสนองต่อสิ่งที่มีกระตุ้นในปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 4 มีการตอบสนองต่อสิ่งที่มีกระตุ้น โดยการชูก้ามขึ้นเพื่อต่อสู้ป้องกันตัวได้เพียงเล็กน้อยและเชิงช้า สามารถเคลื่อนที่ได้ในระยะทางใกล้ ๆ และไม่กระโดดกระเจิง และปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 5 พบว่าปูไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ไม่มีการขยับก้ามและขา และไม่มีการเคลื่อนที่ ซึ่งปูทะเลปกติจะชูก้ามต่อสู้เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นและสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากอุปนิสัยของปูทะเลนั้นค่อนข้างดุ และก้าวร้าว (Burnett *et al.*, 2006) สาเหตุที่ปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงมีการเคลื่อนไหวเชิงช้าอาจเกิดจากปริมาณของไกลโคเจนซึ่งเป็นพลังงานในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ของร่างกายลดลง จากการศึกษาของ Stentiford *et al.* (2000) พบว่ากุ้งมังกรชนิด *Nephrops norvegicus* ที่พบปรสิต *Hematodinium* อยู่ในกล้ามเนื้อเนื้อจำนวนมากส่งผลให้ปริมาณไกลโคเจนลดน้อยลง เนื่องจากปรสิตจำนวนมากสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไกลโคเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ธนเสฐฎ์ (2549) พบว่าปริมาณกลูโคสในตับปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงเพิ่มสูงขึ้น ส่วนปริมาณไกลโคเจนลดลงเนื่องจากไกลโคเจนถูกเปลี่ยนไปเป็นกลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานของร่างกาย (Stentiford *et al.*, 2002) นอกจากนี้ปูที่เป็นโรค ร่างกายจะเกิดความเครียดที่อยู่ในสภาวะ hyperglycaemia ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อความเครียด ทำให้มีการปล่อย crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) ออกมา (Chang *et al.*, 1999) จาก X-organ ที่อยู่บริเวณก้านตา (Dirckson *et al.*, 2001) โดยกระตุ้นให้เกิดการสลายไกลโคเจน (glycogenolysis) ที่สะสมอยู่ภายในตับ และกล้ามเนื้อ (Stentiford *et al.*, 2000)

เมื่อศึกษาลักษณะภายในของปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 4 และ 5 พบว่าอวัยวะภายในได้แก่ ตับมีลักษณะนิ่มและไม่เป็นก้อน โดยตับถือว่าเป็นอวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่ในสร้างน้ำย่อย คุดซึมอาหาร เก็บสำรองอาหาร และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย (Phillips *et al.*, 1977) ในปูที่เป็นโรค pink crab disease ที่พบ *Hematodinium* sp.

แพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายและมีการเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากในเซลล์ตับพบว่า มีผลทำให้ไขมันที่สะสมอยู่ภายในเนื้อเยื่อตับลดลง (Stentiford *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดง กล้ามเนื้อหลวม โพรก ยึดติดกับเปลือกไม่ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Salaenoi *et al.* (2006) พบว่าการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อตับ เหงือกและกล้ามเนื้ออยู่กันอย่างหลวม ๆ ส่วนศึกษาของ Stentiford *et al.* (2002) พบว่าปรสิตที่พบเป็นจำนวนมากภายในร่างกายของปูนั้นมีผลทำให้ลักษณะของเนื้อเยื่อผิดปกติ โดยบริเวณกล้ามเนื้อพบเซลล์ที่อยู่รวมเป็นกลุ่ม ๆ (islands) ซึ่งจะขาดขวางการยึดเกาะของเซลล์กล้ามเนื้อ ส่วนการจัดเรียงตัวของไฟบริล (fibril) บริเวณ Z-line ของกล้ามเนื้อที่ก้านนั้นมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ และเกิดช่องว่างเป็นกลุ่ม ๆ ภายในเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวของปู และจากการรายงานของ Salaenoi *et al.* (2006) พบว่าปูที่มีอาการออก-ท้องแดงเมื่อนำเนื้อไปต้มจะมีรสชาติขมซึ่งสอดคล้องกับ ใน norway lobster ที่เป็นโรค bitter crab disease พบว่าเนื้อที่มีรสชาติขมเมื่อนำมาปรุงอาหารเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกรดอะมิโนภายในเนื้อเยื่อ (Meyers *et al.*, 1987)

## 2. การศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากปูทะเลปกติ และปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงทั้ง 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เลือดใส กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส กลุ่มที่ 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเข็น กลุ่มที่ 5 เลือดสีขาวคล้ายน้ำมัน (เนื่องจากกลุ่มที่ 4 คือกลุ่มเลือดสีส้มคล้ายสีชาเข็น พบว่าปูตายก่อนจึงไม่ได้นำมาจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย) จากอวัยวะภายในได้แก่ หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับ เหงือก และเลือด จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหาร TSA เดิม 1.5% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSA ดังนี้

ปูทะเลปกติพบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 4 ลักษณะ คือ ลักษณะที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีเหลืองส้ม แกรมลบ ลักษณะที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 3 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 4 โคโลนีขอบเรียบ มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุทะเลปกติที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl

ตัวอย่าง	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ความสูง	พื้นผิว	ความ โปร่งแสง	สี	แกรม
ลักษณะที่ 1	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	เหลืองส้ม	ลบ
ลักษณะที่ 2	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 3	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 4	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันเยิ้ม	ทึบแสง	ครีม	ลบ

ปุทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เลือดใส พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 6 ลักษณะคือ ลักษณะที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีเหลืองส้ม แกรมลบ ลักษณะที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 3 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 4 โคโลนีขอบเรียบ นูนโค้ง มันเยิ้ม ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 5 โคโลนีขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 6 โคโลนีขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เลือดใสที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl

ตัวอย่าง	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ความสูง	พื้นผิว	ความ โปร่งแสง	สี	แกรม
ลักษณะที่ 1	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	เหลืองส้ม	ลบ
ลักษณะที่ 2	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 3	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 4	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันเยิ้ม	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 5	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 6	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ

ปุ๋ยทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 6 ลักษณะคือ ลักษณะที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีเหลืองส้ม แกรมลบ ลักษณะที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 3 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 4 โคโลนีขอบเรียบ มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 5 โคโลนีขอบเรียบ มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 6 โคโลนีขอบเรียบ มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๋ยทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เลือดส้มใสที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl

ตัวอย่าง	รูปร่างโคโลนี	ขอบโคโลนี	ความสูง	พื้นผิว	ความโปร่งแสง	สี	แกรม
ลักษณะที่ 1	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	เหลืองส้ม	ลบ
ลักษณะที่ 2	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 3	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 4	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 5	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 6	กลม	เรียบ	นูนโค้ง	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ

ปุ๋ยทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 4 ลักษณะคือ ลักษณะที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 2 โคโลนีขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 3 โคโลนีขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 4 โคโลนีขอบเรียบ นูนโค้ง มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๊ทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้ายสีชาดำ  
เย็นที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl

ตัวอย่าง	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ความสูง	พื้นผิว	ความโปร่ง แสง	สี	แกรม
ลักษณะที่ 1	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 2	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันเยิ้ม	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 3	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 4	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 5	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ

ปุ๊ทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 5 เลือดขาวนูนคล้ายน้ำมัน พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจำนวน 3 ลักษณะคือ ลักษณะที่ 1 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูน โคน มันวาว ทึบแสง สีเหลืองส้ม แกรมลบ ลักษณะที่ 2 โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูน โคน มันวาว ทึบแสง สีครีม แกรมลบ ลักษณะที่ 3 โคโลนีขอบเรียบ นูน โคน มันเยิ้ม ทึบแสง สีครีม แกรมลบ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีที่แยกได้จากปุ๊ทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 5 เลือดขาวนูนคล้ายน้ำมันที่เจริญบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% NaCl

ตัวอย่าง	รูปร่าง โคโลนี	ขอบ โคโลนี	ความสูง	พื้นผิว	ความโปร่ง แสง	สี	แกรม
ลักษณะที่ 1	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันวาว	ทึบแสง	เหลืองส้ม	ลบ
ลักษณะที่ 2	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันวาว	ทึบแสง	ครีม	ลบ
ลักษณะที่ 3	กลม	เรียบ	นูน โคน	มันเยิ้ม	ทึบแสง	ครีม	ลบ

จากการศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการ สามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๊ทะเลปกติได้ 4 ชนิดคือ *Shewanella putrefaciens* group, *Brevundimonas diminuta*, *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio parahaemolyticus* 2 (ตารางที่ 7-9)

ตารางที่ 7 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลปกติ (ตัวอย่างที่ 1)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย			
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>B. diminuta</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 2
หัวใจ	-	-	-	-
กล้ามเนื้อ	-	+	-	-
ตับ	-	-	-	-
เหงือก	+	-	+	+
เลือด	-	+	-	+

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 8 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลปกติ (ตัวอย่างที่ 2)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>B. diminuta</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 2
หัวใจ	+	-	-
กล้ามเนื้อ	-	-	-
ตับ	-	-	+
เหงือก	-	+	-
เลือด	-	-	+

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 9 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลปกติ (ตัวอย่างที่ 3)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	
	<i>B. diminuta</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 2
หัวใจ	-	-
กล้ามเนื้อ	-	-
ตับ	-	+
เหงือก	+	-
เลือด	+	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เลือดใส พบเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *S. putrefaciens* group, *B. diminuta*, *Pasteurella multocida*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* 1 (ตารางที่ 10-12)

ตารางที่ 10 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เลือดใส (ตัวอย่างที่ 1)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>B. diminuta</i>	<i>P. multocida</i>
หัวใจ	+	-	-
กล้ามเนื้อ	-	+	-
ตับ	-	-	+
เหงือก	-	-	+
เลือด	+	+	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 11 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เลือดใส  
(ตัวอย่างที่ 2)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>P. multocida</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
หัวใจ	+	-	-
กล้ามเนื้อ	+	-	-
ตับ	-	+	-
เหงือก	+	+	+
เลือด	+	-	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 12 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 เลือดใส  
(ตัวอย่างที่ 3)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>S. putrefaciens group</i>	<i>P. multocida</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 1
หัวใจ	-	-	+
กล้ามเนื้อ	+	+	-
ตับ	-	-	+
เหงือก	-	+	-
เลือด	+	-	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส พบเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *S. putrefaciens group*, *B. diminuta*, *P. multocida*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* 2 (ตารางที่ 13-16)

ตารางที่ 13 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 1)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย			
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>P. multocida</i>	<i>B. diminuta</i>	<i>V. alginolyticus</i>
หัวใจ	+	-	+	-
กล้ามเนื้อ	+	-	-	-
ตับ	-	+	-	-
เหงือก	-	-	-	+
เลือด	-	-	+	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 14 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 2)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย				
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>P. multocida</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 2	<i>V. vulnificus</i>
หัวใจ	-	-	+	-	-
กล้ามเนื้อ	-	-	-	-	+
ตับ	-	+	-	+	-
เหงือก	-	-	+	-	-
เลือด	+	-	-	-	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 15 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะเลที่มีอาการออก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 3)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 2
หัวใจ	-	-	+
กล้ามเนื้อ	-	-	+
ตับ	-	+	+
เหงือก	-	-	-
เลือด	+	-	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 16 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปุ๋ยมะเลที่มีอาการออก-ท้องแดง กลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส (ตัวอย่างที่ 4)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>V. parahaemolyticus</i> 2	<i>B. diminuta</i>
หัวใจ	-	-	-
กล้ามเนื้อ	+	+	-
ตับ	-	-	-
เหงือก	+	-	+
เลือด	-	+	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ปุ๋ยมะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น พบเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *P. multocida*, *Grimontia hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* 1 และ *V. parahaemolyticus* 3 (ตารางที่ 17-19)

ตารางที่ 17 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้าย สีชาดำเย็น (ตัวอย่างที่ 1)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย			
	<i>P. multocida</i>	<i>G. hollisae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 1	<i>V. alginolyticus</i>
หัวใจ	+	-	-	-
กล้ามเนื้อ	-	+	-	-
ตับ	-	-	-	+
เหงือก	-	-	+	-
เลือด	-	-	-	-

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 18 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้าย สีชาดำเย็น (ตัวอย่างที่ 2)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>P. multocida</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 3
หัวใจ	-	-	-
กล้ามเนื้อ	-	-	-
ตับ	+	+	-
เหงือก	-	+	+
เลือด	-	+	+

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 19 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดส้มคล้าย สีชาดำเย็น (ตัวอย่างที่ 3)

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>P. multocida</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 3
หัวใจ	-	-	-
กล้ามเนื้อ	-	-	+
ตับ	+	-	-
เหงือก	-	+	-
เลือด	-	-	+

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน พบเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. putrefaciens* group, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* 1 (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 5 เลือดขาวขุ่นคล้าย น้ำมัน

อวัยวะที่พบ	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย		
	<i>S. putrefaciens</i> group	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i> 2
หัวใจ	-	+	-
กล้ามเนื้อ	+	-	+
ตับ	-	-	-
เหงือก	+	+	-
เลือด	+	-	+

หมายเหตุ + พบเชื้อแบคทีเรีย  
- ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการทดสอบทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลโคและปุ๋ยมูลไก่ที่มีอาการออก-ท้องแดง (ภาพที่ 7, ตารางที่ 21) มีรายละเอียดดังนี้

*S. putrefaciens group* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate,  $\beta$ -galactosidase production, N-acetyl-glucosamine, caprate, malate และ cytochrome oxidase

*P. multocida* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane และ cytochrome oxidase

*V. alginolyticus* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane, fermentative of acid from glucose และ cytochrome oxidase

*V. parahaemolyticus 1* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane, fermentative of acid from glucose, hydrolysis of gelatin,  $\beta$ -galactosidase production, glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, adipate, malate, citrate และ cytochrome oxidase

*V. parahaemolyticus 2* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane, fermentative of acid from glucose, hydrolysis of gelatin,  $\beta$ -galactosidase production, glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, malate และ cytochrome oxidase

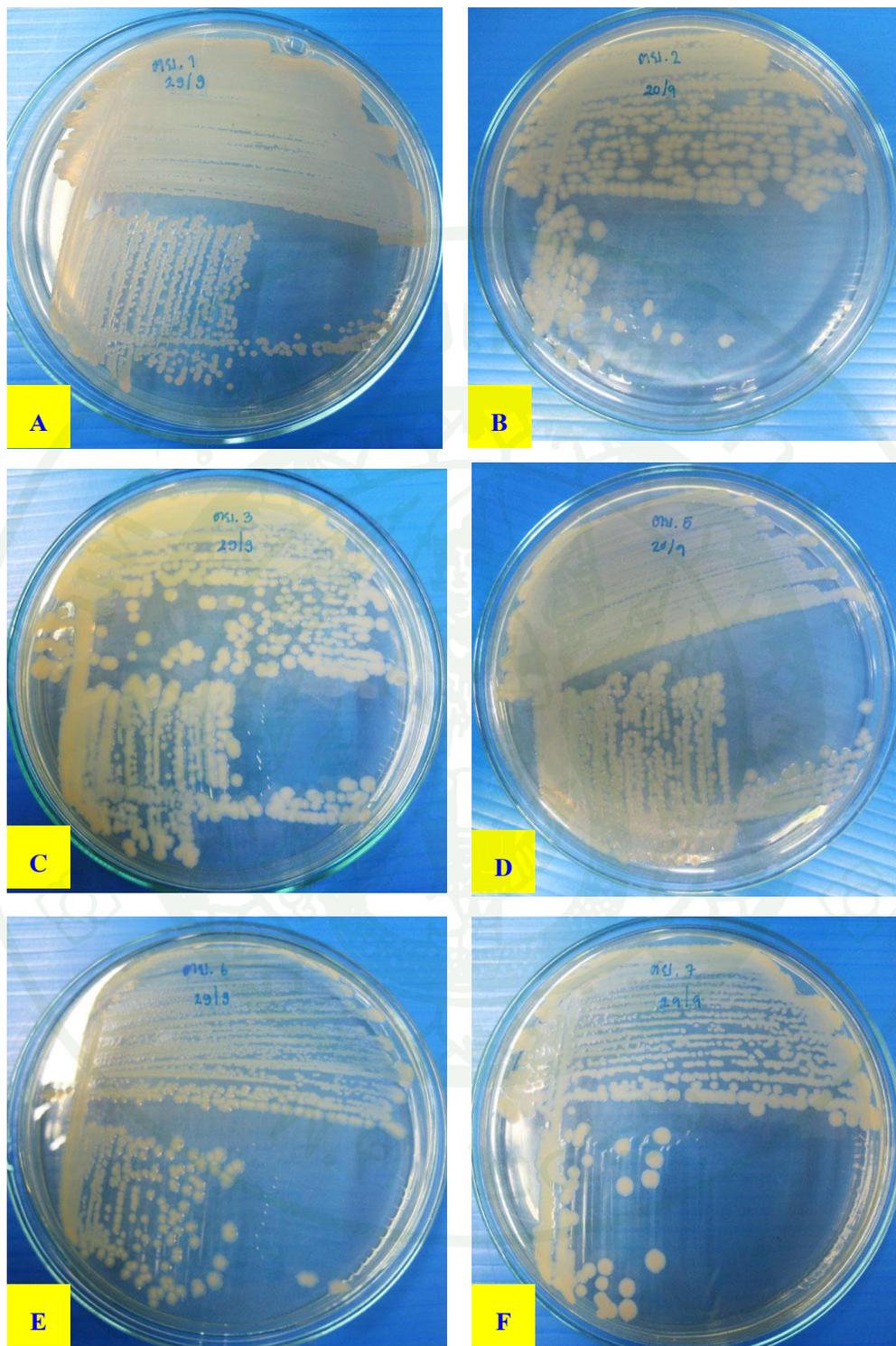
*V. parahaemolyticus 3* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane, fermentative of acid from glucose, hydrolysis of gelatin,  $\beta$ -galactosidase production, glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, malate และ cytochrome oxidase

*V. vulnificus* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane, fermentative of acid from glucose, hydrolysis of gelatin,  $\beta$ -galactosidase production, malate และ cytochrome oxidase

*G. hollisae* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ reduction of nitrate, indole production of tryptophane, arabinose, malate และ cytochrome oxidase

*B. diminuta* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ malate, cytochrome oxidase และ motility

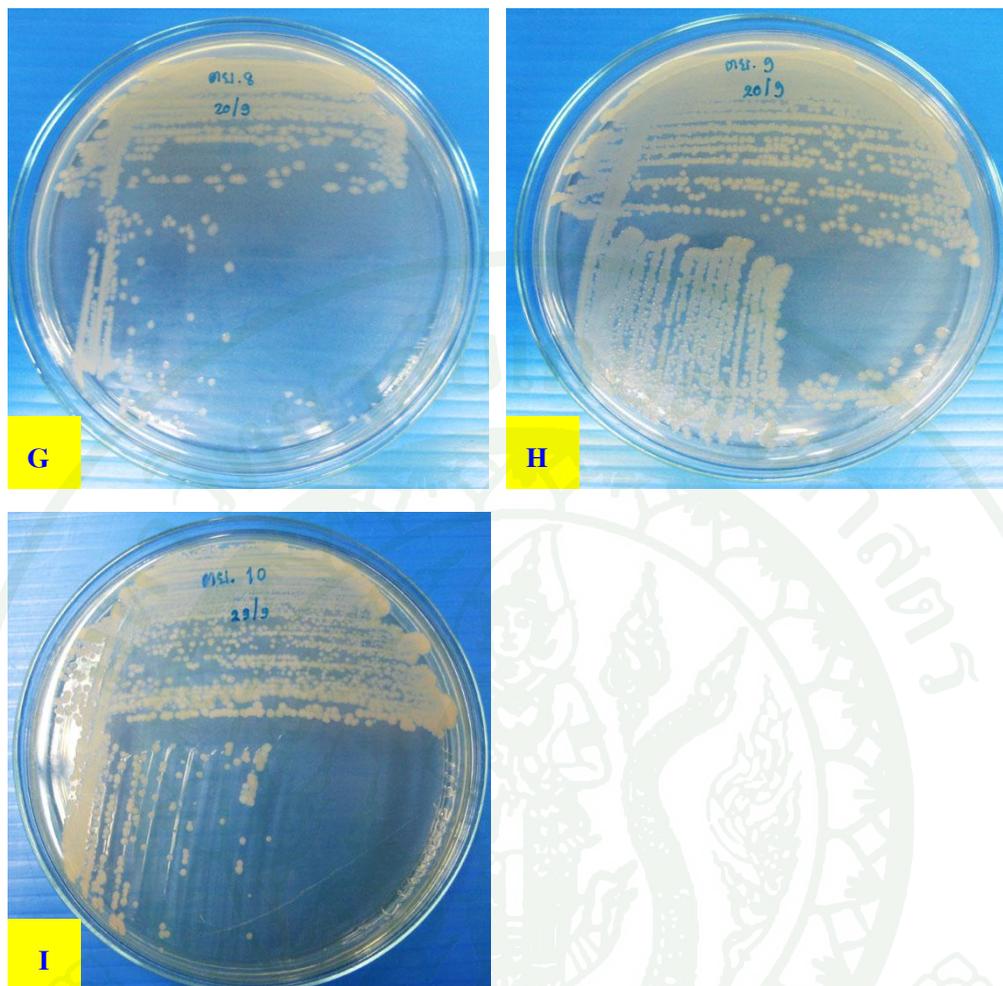




ภาพที่ 7 ลักษณะ โคลินิของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดง

A = *S. putrefaciens* group    B = *P. multocida*    C = *V. alginolyticus*

D = *V. parahaemolyticus* 1    E = *V. parahaemolyticus* 2    F = *V. parahaemolyticus* 3



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลไก่ที่มีอาการออก-ท้องแดง (ต่อ)

G = *V. vulnificus*

H = *G. hollisae*

I = *B. diminuta*

ตารางที่ 21 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปุ๋ยมูลสัตว์ที่มีอาการออก- ท้องแดง

ลักษณะทางชีวเคมี	ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Gram reaction	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Reduction of nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Indole production of tryptophane	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Fermentative of acid from glucose	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of gelatin	+	-	+	+	+	+	+	-	-
$\beta$ -galactosidase production	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Assimilation of:									
Glucose	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Mannose	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Mannitol	-	-	+	+	+	+	-	-	-
N-acetyl-glucosamine	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Maltose	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Gluconate	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Caprate	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Adipate	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Malate	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Phenyl-acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility									+

## ตารางที่ 21 (ต่อ)

หมายเหตุ -ve = Gram negative bacteria	+ = Positive reaction
- = Negative reaction	A = <i>Shewanella putrefaciens</i> group
B = <i>Pasteurella multocida</i>	C = <i>Vibrio alginolyticus</i>
D = <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 1	E = <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 2
F = <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 3	G = <i>Vibrio vulnificus</i>
H = <i>Grimontia hollisae</i>	I = <i>Brevundimonas diminuta</i>

จากผลการศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบเชื้อในสกุล *Vibrio* ในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มต่าง ๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Malloy (1978) ที่พบเชื้อ *Vibrio*, *Pseudomonas* และ *Benecke* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งมังกร ในขณะที่ Getchell (1989) พบเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Pasteurella* และ *Photobacterium* ที่แยกจากปูชนิด *Cancer pagurus* ที่มีบาดแผลสีดำบนกระดอง และสอดคล้องกับการศึกษาของ Davis and Sizenmore (1982) ซึ่งพบเชื้อ *Vibrio* sp. ที่แยกได้จากเลือดและกระดองของปูชนิด *Callinectes sapidus* โดยจำแนกเป็นเชื้อ *V. cholerae*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* ปริมาณ 2, 7 และ 23% ตามลำดับ แต่จากการศึกษาของ Haryanti *et al.* (2003) รายงานว่าเชื้อ *V. harveyi* และ *V. alginolyticus* เท่านั้นที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายในปูชนิด *Scylla paramamosain*

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 1 เลือดใสพบเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *S. putrefaciens* group, *B. diminuta*, *Pasteurella multocida*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* 1 ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส พบเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *S. putrefaciens* group, *B. diminuta*, *P. multocida*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* 2 ในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น พบเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *P. multocida*, *Grimontia hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* 1 และ *V. parahaemolyticus* 3 และในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน พบเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. putrefaciens* group, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* 1 ซึ่งจากการศึกษาส่วนใหญ่พบเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* โดยสามารถพบได้ทั้งในปูทะเลปกติและปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง ซึ่งเชื้อในสกุล *Vibrio* ทั้งสองชนิดนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นประจำในกุ้ง หอย และปู (Davis and Sizenmore, 1982; Daniels, 2000) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sizenmore *et al.* (1975) ที่พบเชื้อ *Vibrio* sp.,

*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp. และ coliform ที่แยกได้จากปูชนิด *Callinectes sapidus* ปกติ ซึ่งพบในปูเพศผู้มากกว่าในปูเพศเมีย เนื่องจากปูทะเลที่มีขนาดใหญ่ ส่วนใหญ่เป็นปูเพศผู้ (Tubiash *et al.*, 1975)

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 3 เลือก สัมคล้ายสีชาดำเย็นพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Grimontia hollisae* อยู่ในจิ้นัส *Grimontia* ซึ่งเป็นจิ้นัสที่ ถูกจัดขึ้นใหม่จากเดิมมีชื่อว่า *V. hollisae* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในมนุษย์ (Hickman *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 2003) จากการศึกษาของ Curtis *et al.* (2007) พบว่าแบคทีเรีย *G. hollisae* โคโลนีมีลักษณะทั้งขอบเรียบและขอบหยัก สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* พบว่าเป็นเชื้อที่พบ ประจำในปูทะเล และสามารถเพิ่มปริมาณได้สูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน (Davis and Sizenmore, 1982) เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (Daniels, 2000) ซึ่งใน ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าหอยที่เก็บเกี่ยวได้จากน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 22 องศาเซลเซียส พบเชื้อ *V. vulnificus* มากถึง 89% (Shapiro *et al.*, 1998) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ ในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส (Buchanan *et al.*, 1974) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eddy *et al.* (2007) ที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายริกเก็ตเซียซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรค milky disease ในปูชนิด *C. maenas* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในฤดูร้อน นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในปูแล้วยังเป็นสาเหตุในการเกิดโรคในกุ้งทะเลอีกด้วย โดย Hisbi *et al.* (2000) รายงานว่าพบเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. damsela* *V. harveyi* และ *Brevundimonas*-like ที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการตายสูงในฟาร์มเพาะเลี้ยงในประเทศอินโดนีเซีย

มีความเป็นไปได้ว่าอาจมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องที่เหนี่ยวนำให้ปูทะเลปกติมีอาการดังกล่าว นอกเหนือจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ซึ่งปัจจัยที่คาดว่าจะเป็นจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้น ให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ ความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยง (Sindermann, 1990) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ ก่อให้เกิดความเครียดในสัตว์น้ำ และเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิของน้ำ (Noga *et al.*, 2000; Eddy *et al.*, 2007) เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจน ลดลง จึงส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย (Le Moullac and Haffner, 2000)

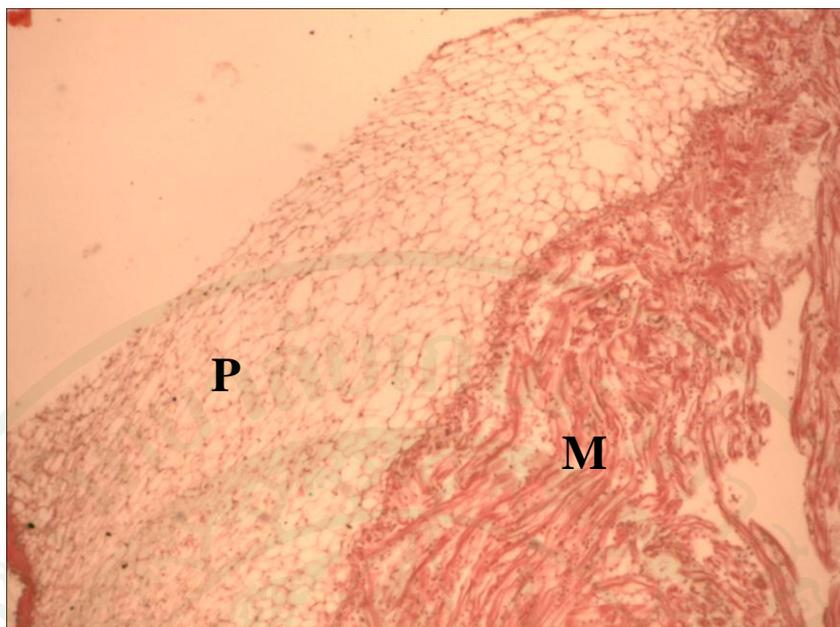
### 3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

จากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อลำตัว ตับ และเหงือกในปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 1 เลือดใส และกลุ่มที่ 2 เลือดส้มใส เมื่อเปรียบเทียบกับปฐะเลปกติ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

#### กล้ามเนื้อหัวใจ

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าในปฐะเลปกติบริเวณเนื้อเยื่อ myocardium และเนื้อเยื่อ pericardium มีการจัดเรียงตัวของเซลล์อย่างเป็นระเบียบและมีเม็ดเลือดกระจายอยู่ทั่วไปภายในเนื้อเยื่อหัวใจ (ภาพที่ 8) ส่วนในปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 (เลือดใส) ภายในเนื้อเยื่อ myocardium พบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายถุงชีสต์ของโปรโตซัว (ภาพที่ 9) นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์ ซึ่งสังเกตจากการมีเม็ดเลือดสะสมรวมกลุ่มอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 10, 11 และ 12)

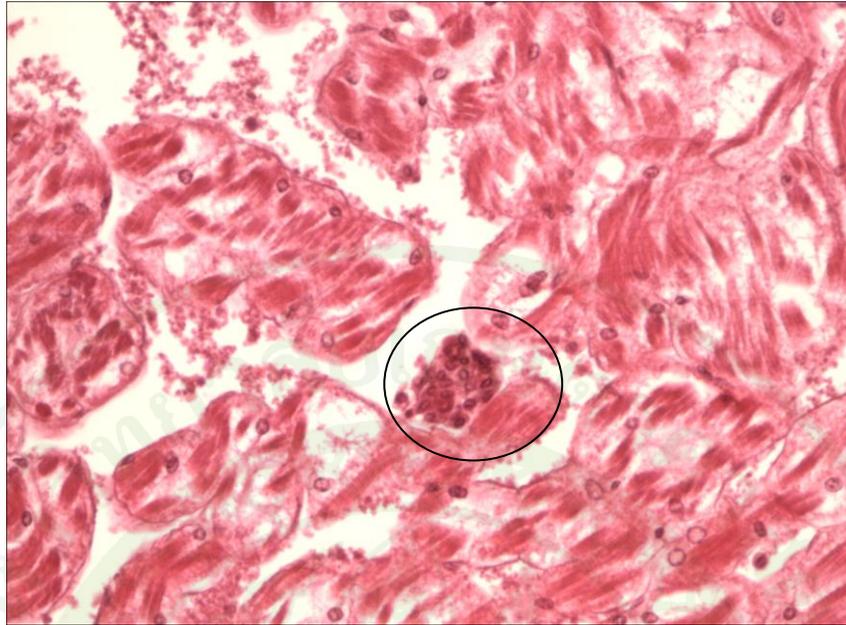
ปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 2 (เลือดส้มใส) พบว่าบริเวณเนื้อเยื่อ myocardium เกิดความเสียหาย เนื่องจากมีเม็ดเลือดสะสมอยู่รวมกันแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 13 และ 14)



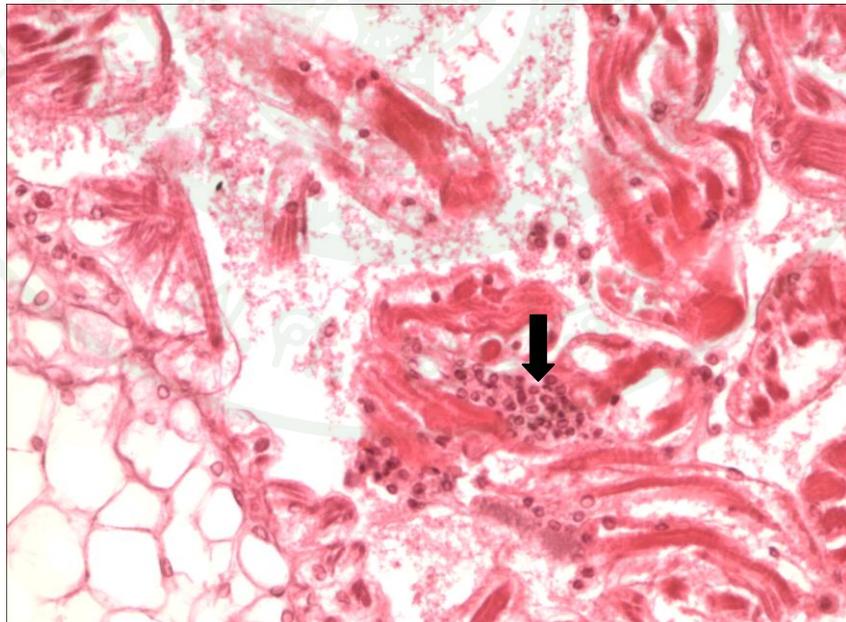
ภาพที่ 8 ลักษณะกล้ามเนื้อหัวใจในปฐะเลปกติโดยเซลล์ pericardium (P) และ myocardium (M) มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ



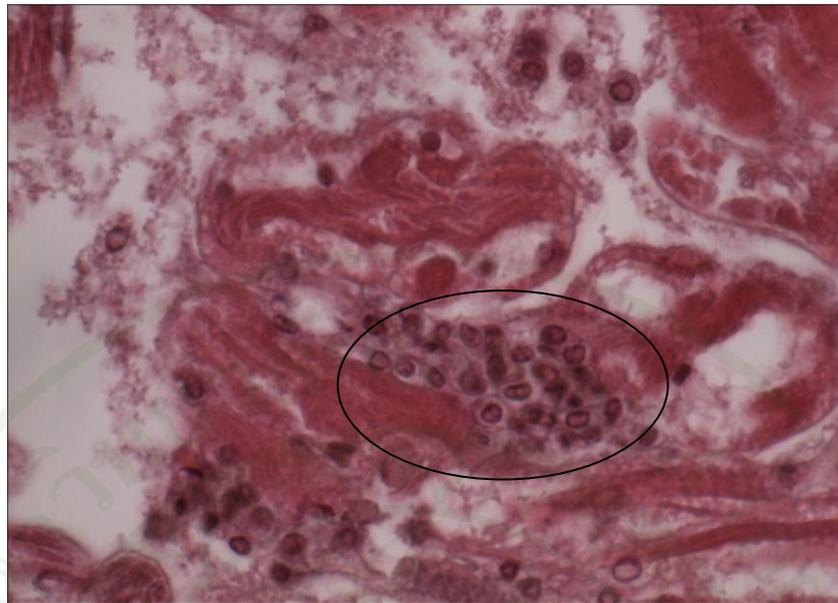
ภาพที่ 9 บริเวณเนื้อเยื่อ myocardial ของกล้ามเนื้อหัวใจในปฐะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 พบถุงชีสต์ที่คาดว่าจะเป็นโปรโตซัวแทรกอยู่บริเวณกล้ามเนื้อ (10X)



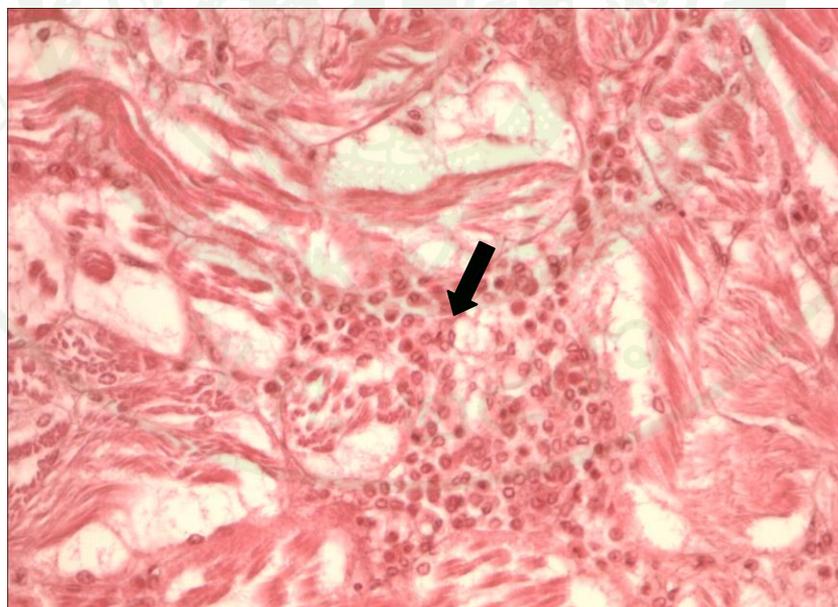
ภาพที่ 10 ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ myocardium ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดอยู่ในช่องว่างของท่อเลือด (20X)



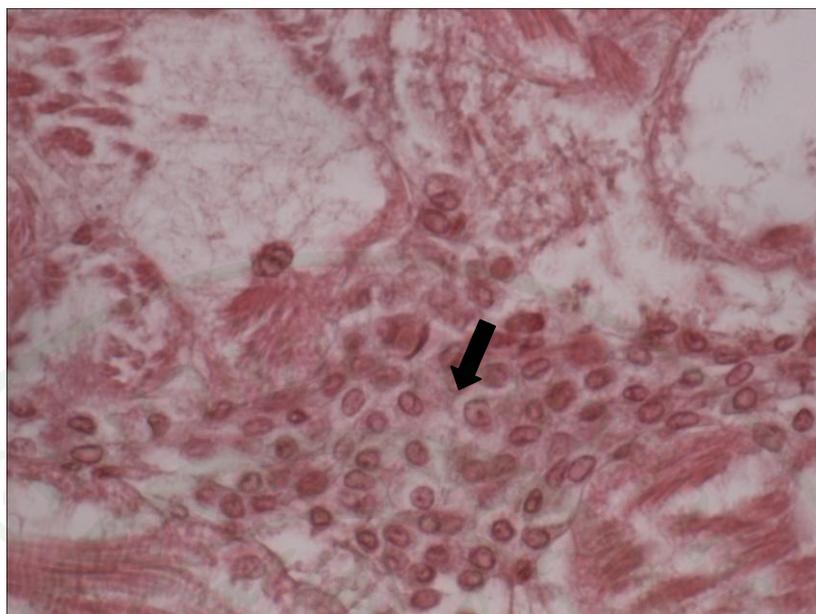
ภาพที่ 11 ลักษณะของเนื้อเยื่อ myocardium ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 พบการตายของเซลล์ โดยพบเม็ดเลือดมีการสะสมรวมกลุ่มอยู่ในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (20X)



ภาพที่ 12 ลักษณะของเนื้อเยื่อ myocardium ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 มีการตายของเซลล์เนื่องจากมีเม็ดเลือดรวมกลุ่มอยู่ภายในเนื้อเยื่อจำนวนมาก (40X)



ภาพที่ 13 ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจบริเวณเนื้อเยื่อ myocardium ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดความเสียหาย เนื่องจากมีเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันแทรกอยู่ภายในเป็นจำนวนมาก (20X)

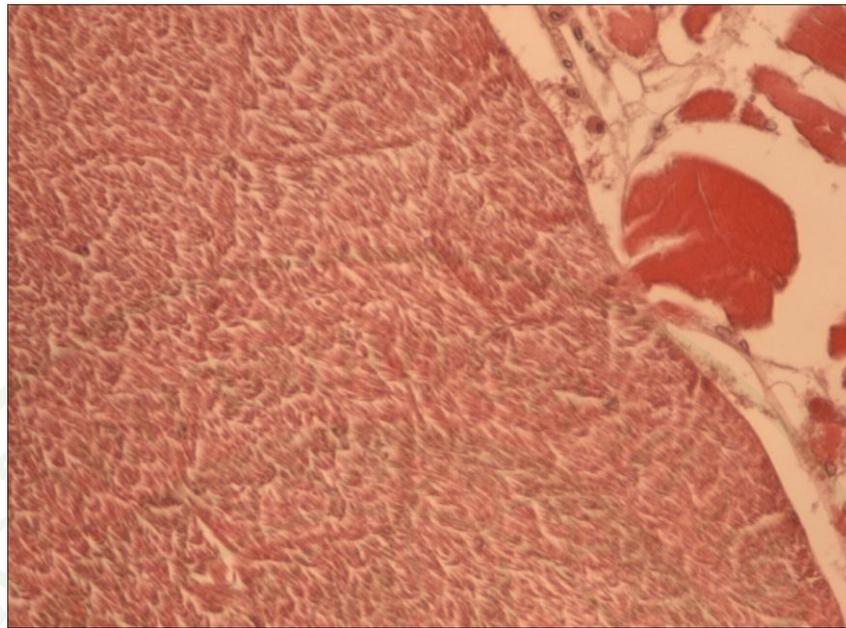


ภาพที่ 14 ลักษณะของเม็ดเลือดที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ myocardium ของกล้ามเนื้อหัวใจที่เกิดการตาย (necrosis) ในปฏิกิริยาที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 (40X)

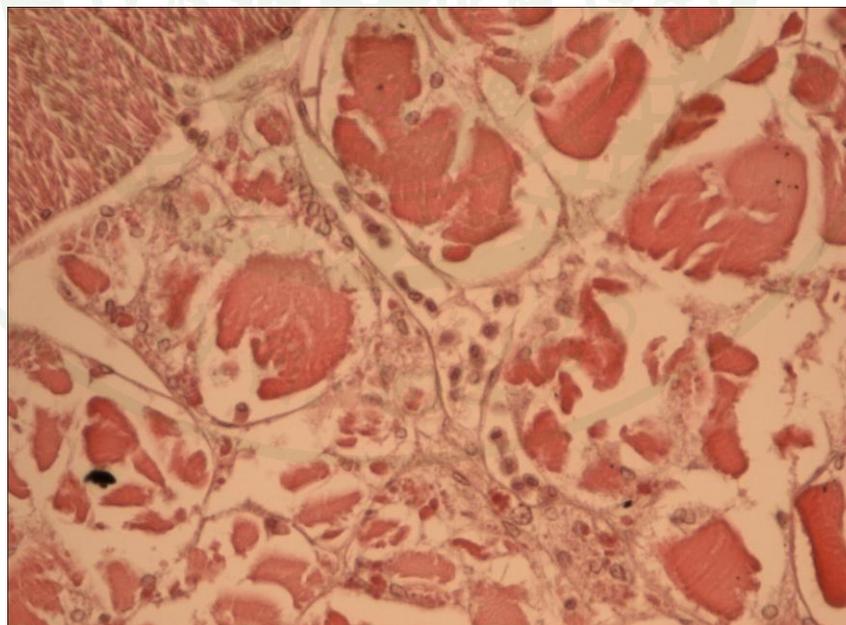
#### กล้ามเนื้อลำตัว

ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อลำตัว พบว่าในปฏิกิริยาปกติ ลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อมีการจัดเรียงตัวอย่างปกติ (ภาพที่ 15) และพบเม็ดเลือดสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อจำนวนเล็กน้อย (ภาพที่ 16) ส่วนในปฏิกิริยาที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 (เลือดใส) ลักษณะของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลำตัวมีจัดเรียงตัวแยกออกจากกัน (ภาพที่ 17) และเนื้อเยื่อเกิดความเสียหายเนื่องจากมีเม็ดเลือดสะสมและแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 18 และ 19)

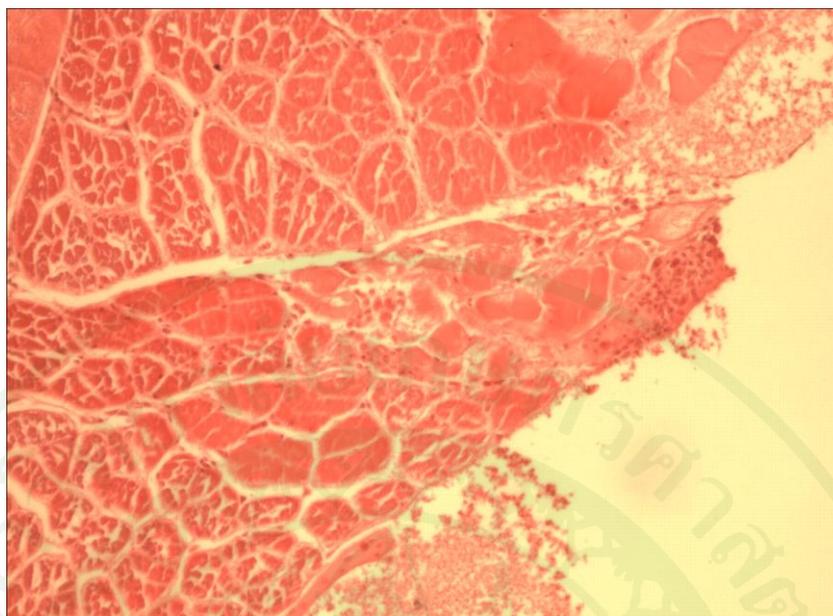
ปฏิกิริยาที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 (เลือดส้มใส) พบว่า บริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลำตัวเกิดความเสียหายและพบเม็ดเลือดอยู่รวมกลุ่มแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 20)



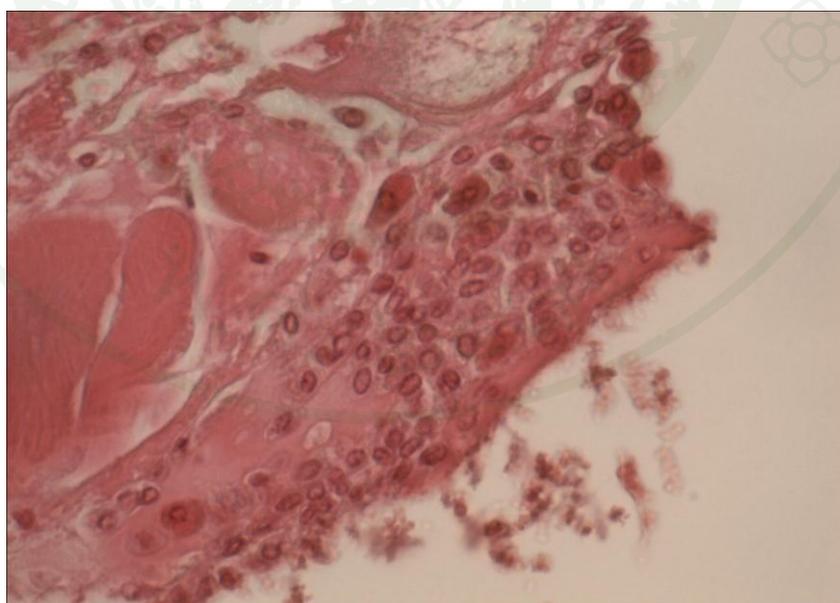
ภาพที่ 15 ลักษณะกล้ามเนื้อลำตัวในปูทะเลปกติที่มีการจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ (10X)



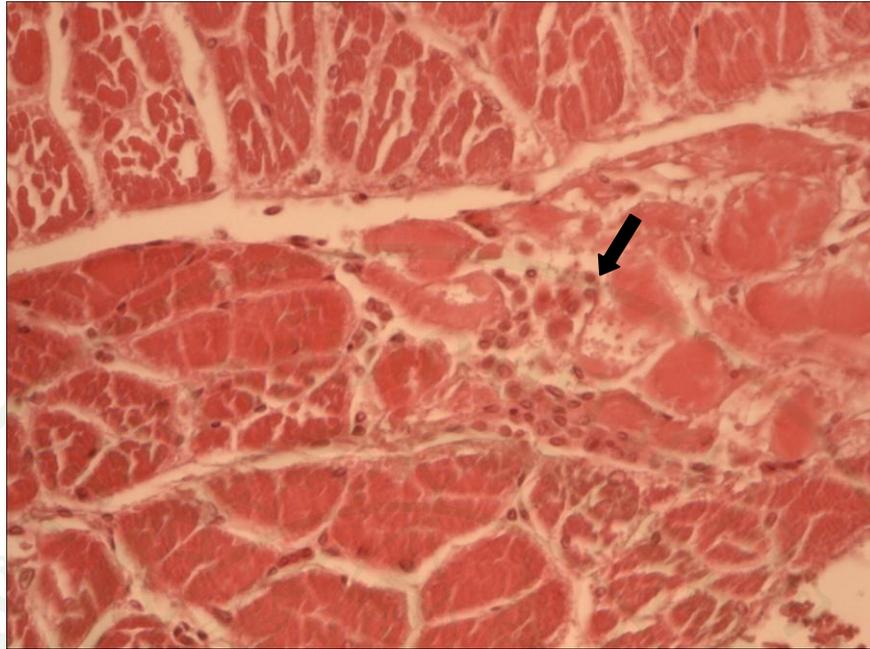
ภาพที่ 16 ลักษณะของกล้ามเนื้อลายบริเวณลำตัวของปูทะเลปกติพบเม็ดเลือดอยู่ในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ (40X)



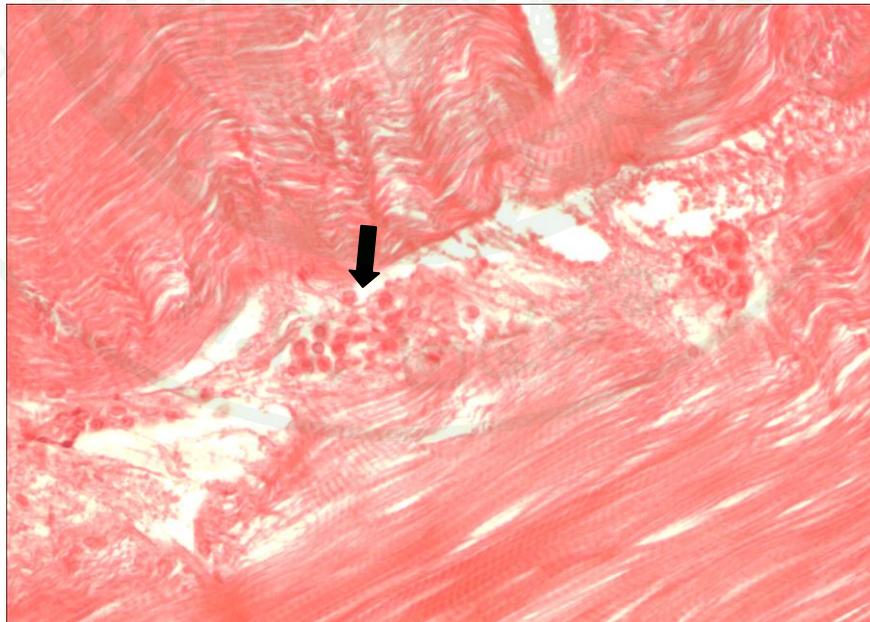
ภาพที่ 17 ลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปฐะเลที่มีอาการรก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เกิดการตายของเซลล์ โดยพบเม็ดเลือดแทรกกระจายอยู่ภายในและเส้นใยกล้ามเนื้อแยกออกจากกัน (10X)



ภาพที่ 18 ลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อของปฐะเลที่มีอาการรก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เกิดการตายของเซลล์ โดยพบเม็ดเลือดแทรกกระจายอยู่ภายในเนื้อเยื่อ (40X)



ภาพที่ 19 บริเวณเนื้อเยื่อของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อ  
 ภายหลังมีการสะสมของเม็ดเลือดเป็นจำนวนมาก (20X)

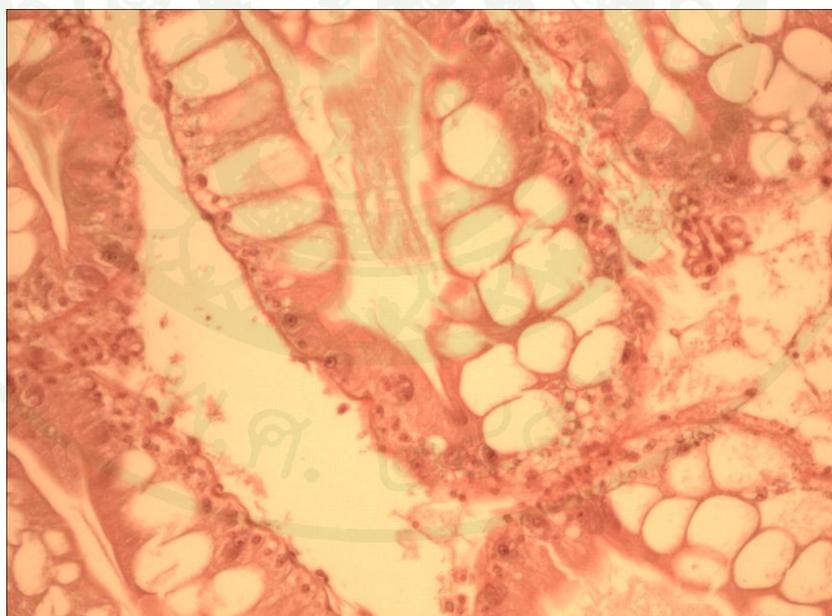


ภาพที่ 20 บริเวณกล้ามเนื้อลำตัวของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดความเสียหายโดยเส้น  
 ใยกล้ามเนื้อแยกออกจากกัน และพบเม็ดเลือดแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ (20X)

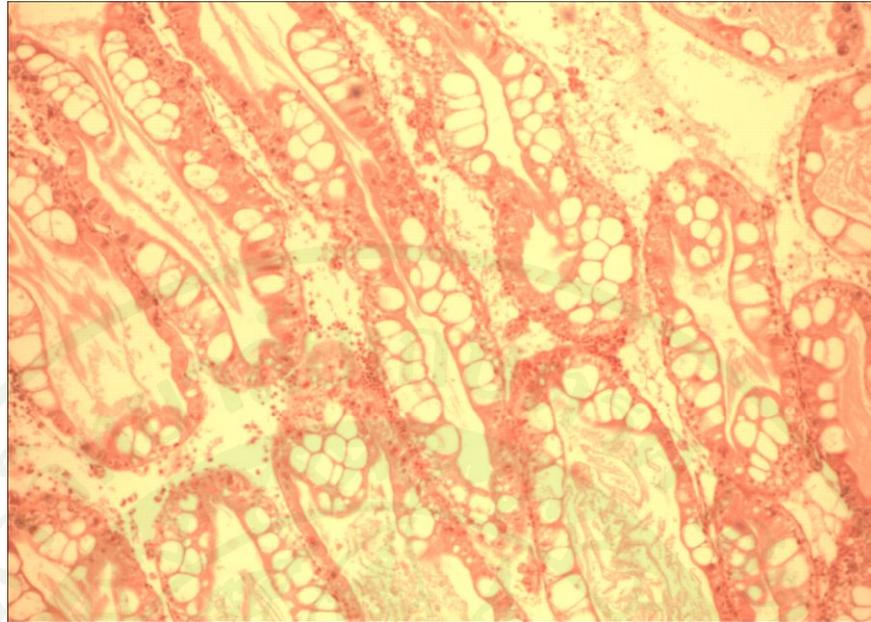
## ตับ

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณตับในปูทะเลที่มีอาการท้องแดง พบว่ามีความแตกต่างไปจากปูทะเลปกติ คือปูทะเลปกติบริเวณเซลล์ตับมีการสะสมไขมันภายในเซลล์เป็นจำนวนมากบริเวณเยื่อบุผนังท่อ (epithelium cell) และพบเซลล์ชนิด B-cell เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 21 และ 22) ส่วนในปูทะเลที่มีอาการท้องแดงท้องแดงกลุ่มที่ 1 (เลือดใส) พบว่าบริเวณเซลล์เยื่อบุผนังท่อที่มีปริมาณของ B-cell และมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ลดลงเช่นกัน (ภาพที่ 23) และพบเซลล์ tubular epithelium มีปริมาณลดลง (ภาพที่ 24) นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์ เนื่องจากมีการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดแทรกอยู่ภายในช่องว่างของท่อตับอยู่หลายบริเวณภายในเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 25, 26 และ 27)

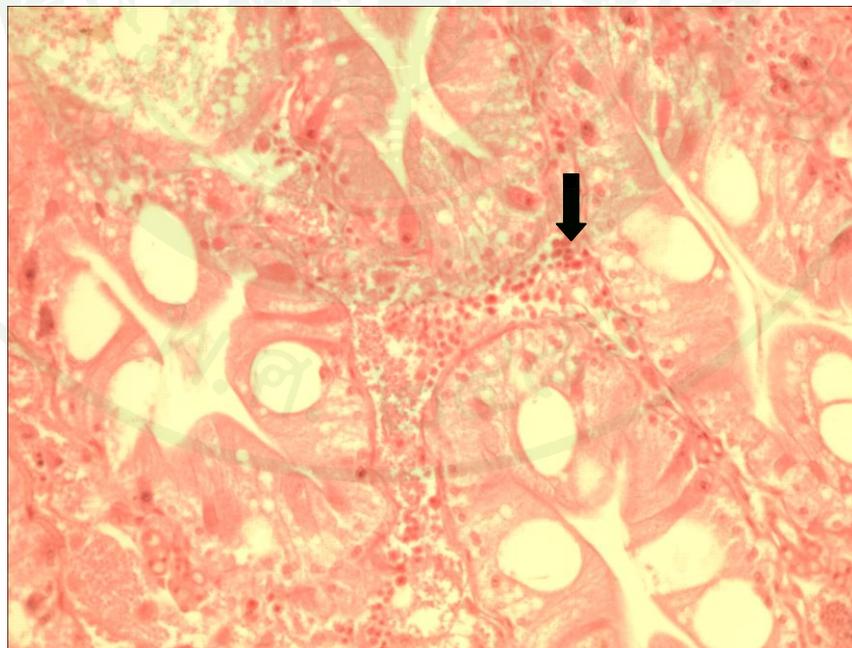
ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่มที่ 2 (เลือดส้มใส) พบว่าบริเวณเซลล์ตับไม่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์เยื่อบุผนังท่อ มีปริมาณ tubular epithelium cell ลดลง และมีการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดเพิ่มมากขึ้น และมีการสร้างโนคูลแทรกอยู่ภายในเซลล์เนื้อเยื่อตับ (ภาพที่ 28, 29 และ 30)



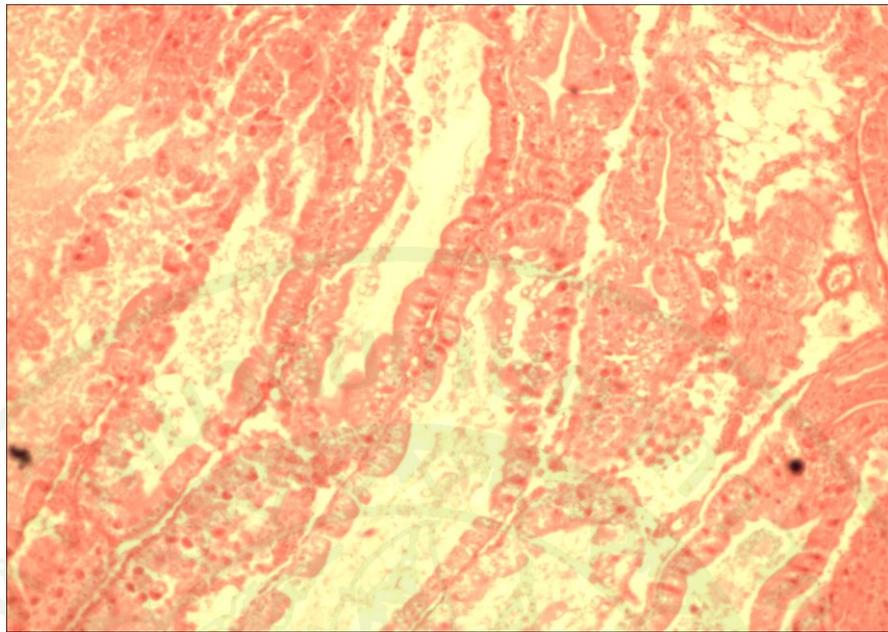
**ภาพที่ 21** บริเวณเซลล์ตับของปูทะเลปกติมีการสะสมไขมันภายในเซลล์เป็นจำนวนมากบริเวณเยื่อบุผนังท่อ (epithelium cell) และมีเม็ดเลือดคั่งอยู่อย่างอิสระและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มภายในเนื้อเยื่อ (40X)



ภาพที่ 22 บริเวณเซลล์ตับในปฏะเลปกติมีการสะสมไขมันภายในเซลล์เป็นจำนวนมากบริเวณเยื่อผนังท่อ (epithelium cell) (10X)



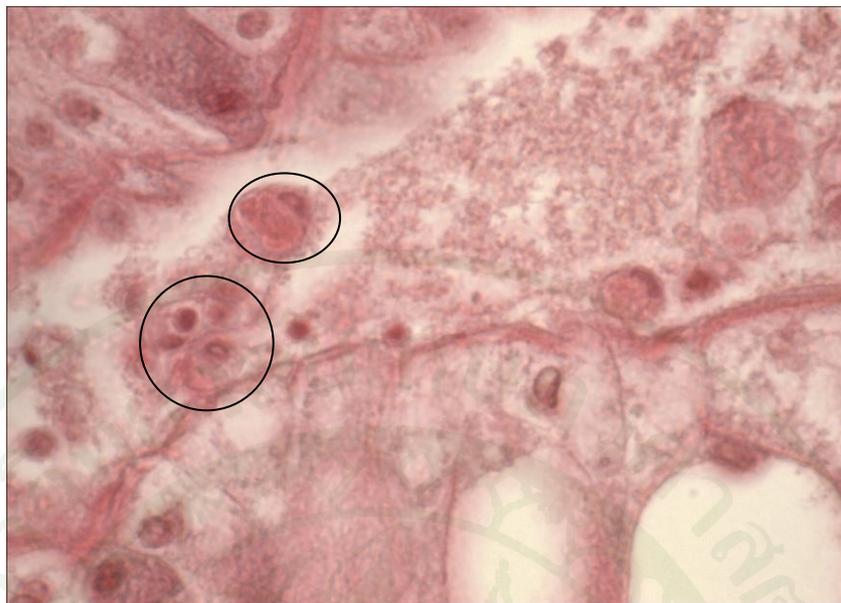
ภาพที่ 23 บริเวณเซลล์ hepatopancreatic tubular ของเนื้อเยื่อตับในปฏะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง กลุ่มที่ 1 มีเม็ดเลือดสะสมเป็นจำนวนมาก (10X)



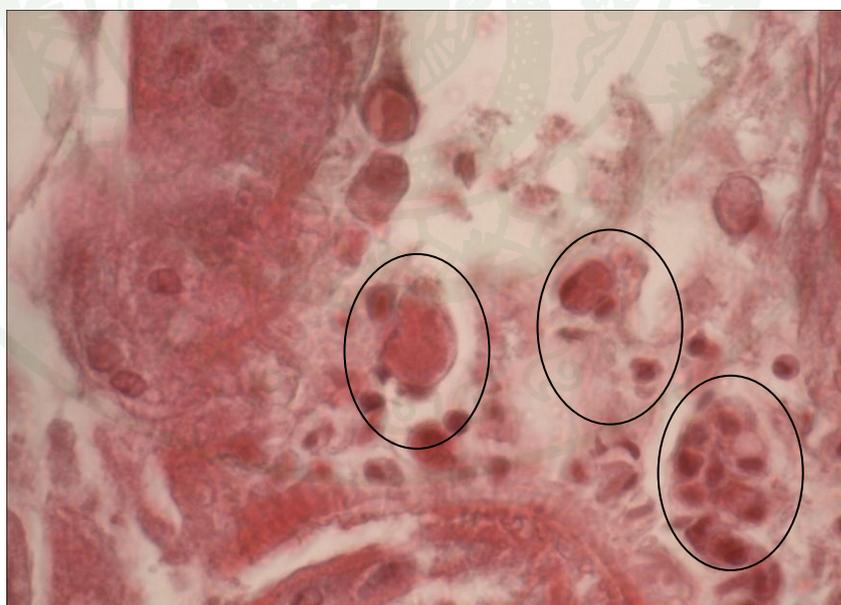
ภาพที่ 24 บริเวณเซลล์ tubular epithelium ของรกที่มียาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 มีจำนวนของ  
 แวกิวโอลลดลงและมีเม็ดเลือดสะสมเป็นจำนวนมากภายในช่องว่างระหว่าง tubular  
 epithelium (10X)



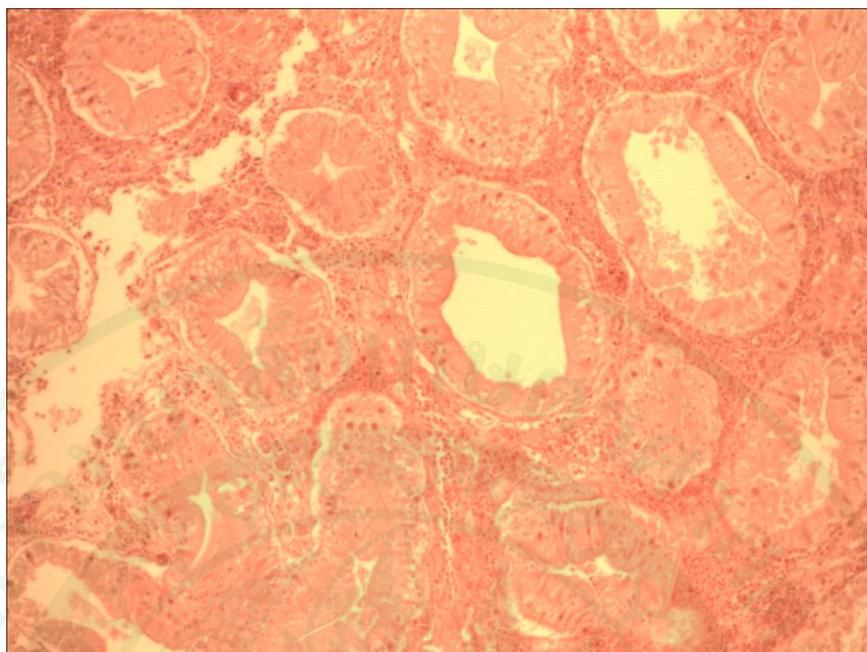
ภาพที่ 25 บริเวณของเนื้อเยื่อของรกที่มียาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 พบเม็ดเลือดอยู่รวมกัน  
 เป็นกลุ่ม ๆ ภายใน hemal sinuses. (40X)



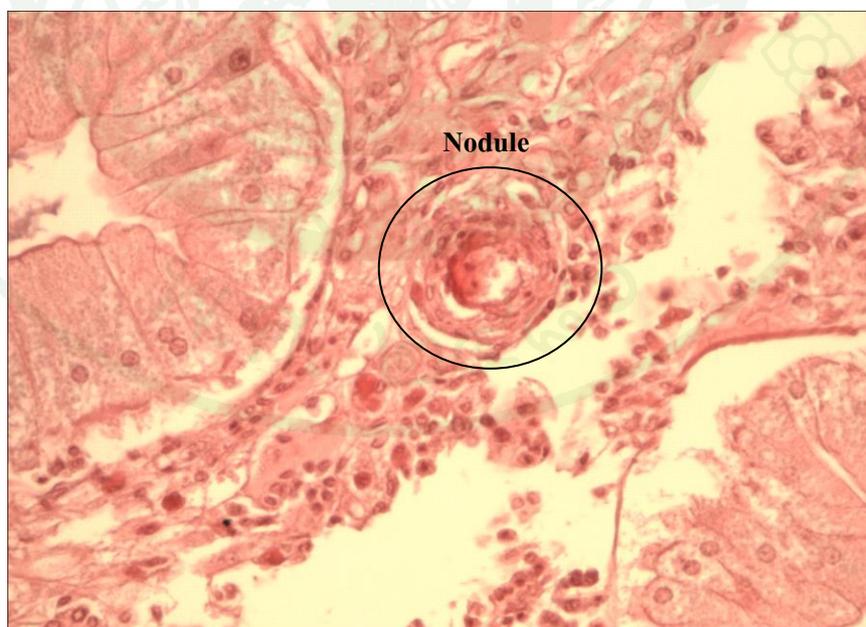
ภาพที่ 26 ลักษณะของเนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 มีเซลล์เม็ดเลือดบวมใหญ่ภายในนิวเคลียสพบ eosinophilic material ที่มีทั้งเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์อยู่รวมกัน (40X)



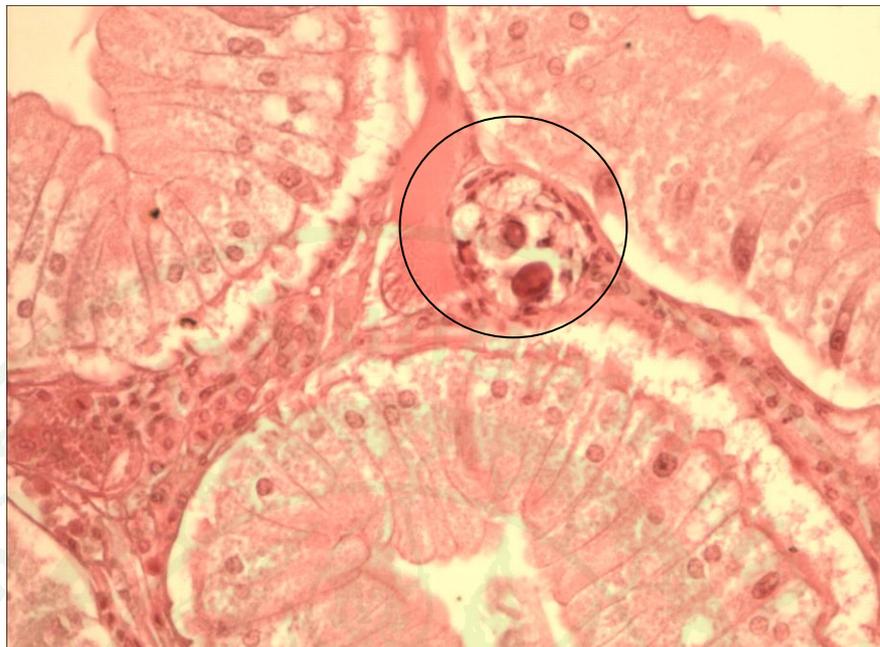
ภาพที่ 27 พบเม็ดเลือดทั้งแบบอิสระ (เคลื่อนที่) และแบบอยู่กับที่กระจายและเกาะเป็นกลุ่มมีขนาดใหญ่อยู่ภายในช่องว่างของเซลล์ตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 (40X)



ภาพที่ 28 เซลล์ hepatopancreatic tubules ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 มีปริมาณของ  
แวกิวโอลคดลงและมีการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดอยู่ใน hemal sinuses (4X)



ภาพที่ 29 บริเวณเนื้อเยื่อเชื่อมต่อของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 พบเม็ดเลือดรวมกลุ่มอยู่เป็น  
จำนวนมากและเกิดการสร้างโนดูลใน hemal sinus (20X)

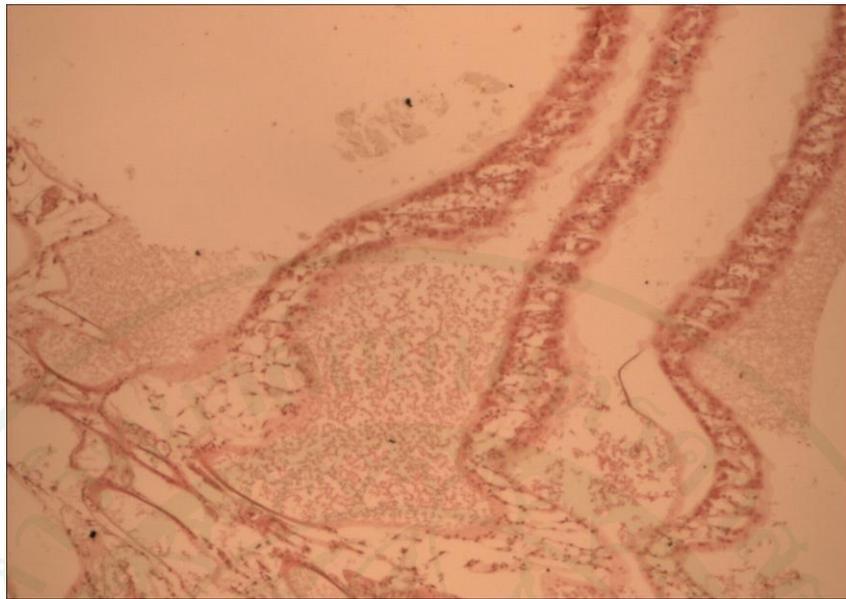


ภาพที่ 30 บริเวณเนื้อเยื่อตับของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 พบเม็ดเลือดรวมกลุ่มอยู่เป็นจำนวนมากและเกิดการสร้างโนดูลอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อตับ (20X)

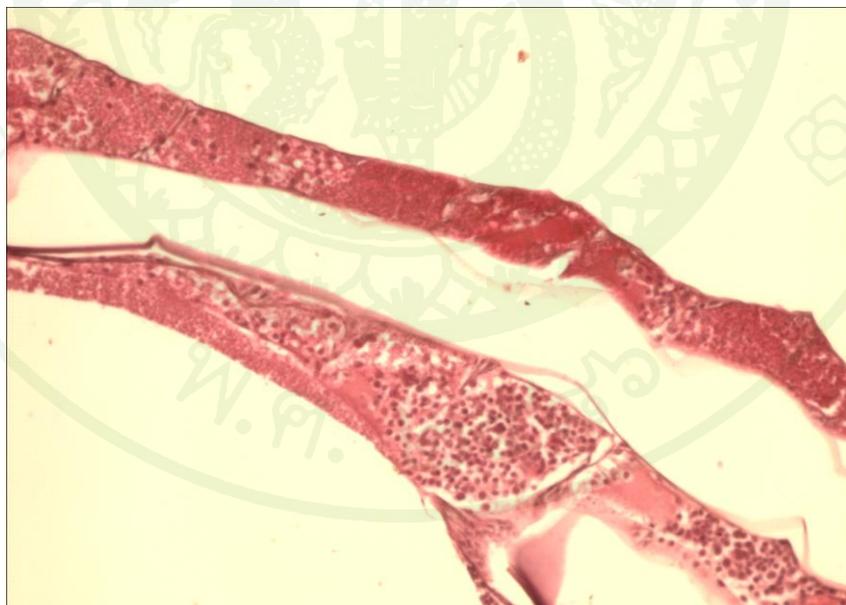
#### เหงือก

ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกในปูทะเลปกติ พบว่าลักษณะเซลล์ gill stem และ gill lamella มีลักษณะปกติ (ภาพที่ 31) ส่วนในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 (เลือดใส) พบว่า gill lamella เกิดความเสียหาย โดยมีเม็ดเลือดสะสมอยู่เกิดการสร้าง melanization ส่วนบริเวณ gill stem พบเม็ดเลือดสะสมอยู่รวมกลุ่มกันอยู่ภายในช่องว่างของเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 32) และเกิดการสร้างโนดูล (ภาพที่ 33 และ 34)

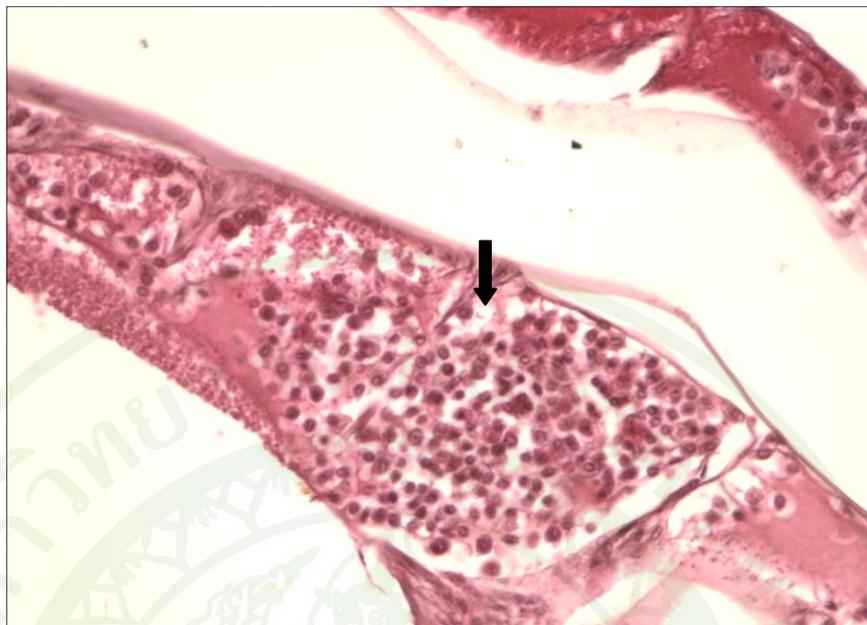
ในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 (เลือดส้มใส) พบว่าบริเวณ gill stem และ gill lamella มีเม็ดเลือดสะสมอยู่รวมกันเป็นกลุ่มอยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 35) ส่วนบริเวณ gill lamella เกิดความเสียหายและมีการสร้างเมลานินบริเวณคิวติเคิลและเซลล์อีพิเธรมิส โดยเกิดมีเม็ดเลือดสะสมกระจายอยู่เป็นจำนวนมากภายในช่องว่างของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 36 และ 37)



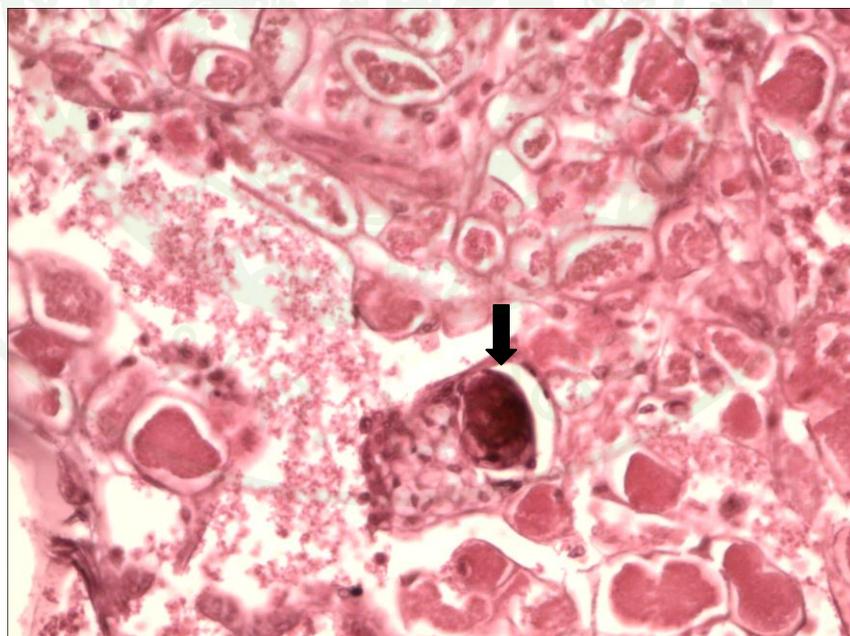
ภาพที่ 31 ลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเลปกติ พบว่าเนื้อเยื่อ gill stem และ gill lamellae มีลักษณะปกติ (10X)



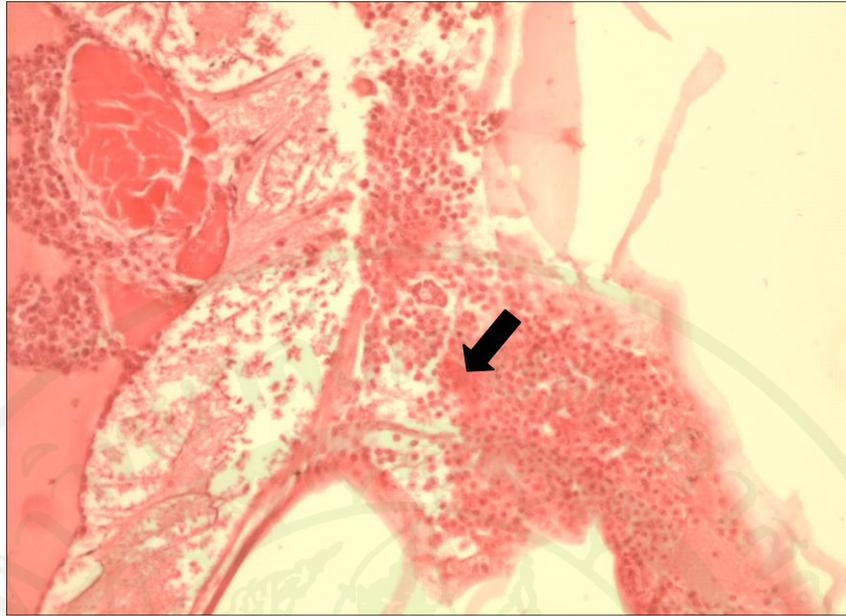
ภาพที่ 32 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกที่ถูกทำลายโดยเกิดการสะสมของเม็ดเลือดและเกิดกระบวนการ melanization ส่วนบริเวณ gill stem พบเม็ดเลือดอยู่รวมกันภายในช่องว่างของเซลล์เหงือกในปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 (10X)



ภาพที่ 33 ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 พบเซลล์เม็ดเลือดสะสมอยู่ภายในของว่างของ gill stem เป็นจำนวนมาก (20X)



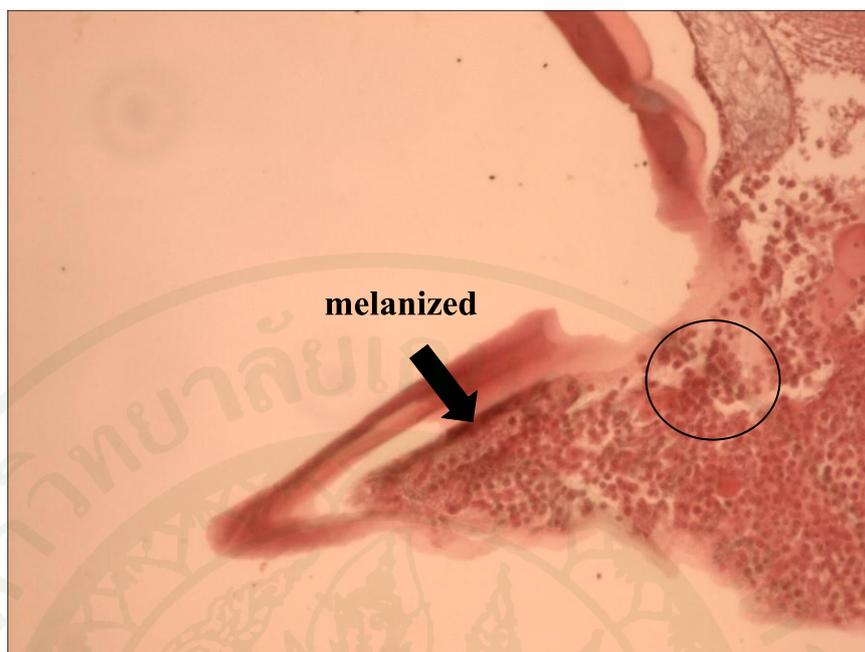
ภาพที่ 34 ปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 1 พบการตายของเซลล์อยู่ภายใน gill stem (20X)



ภาพที่ 35 ลักษณะของเนื้อเยื่อเหงือกของปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดการสะสมรวมกลุ่มกันของเม็ดเลือดอยู่ในช่องว่างของเนื้อเยื่อ gill stem และ gill lamella (10X)



ภาพที่ 36 ลักษณะของ gill lamella ในปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดความเสียหายซึ่งมีเม็ดเลือดสะสมอยู่เป็นจำนวนมากและเกิดการสร้างเมลานินบริเวณคิวติเคิลและอีพิเดอร์มิส (20X)



ภาพที่ 37 บริเวณ gill stem ของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เกิดการสร้างเมลานิน บริเวณเซลล์อิพิเคอร์มิสและมีเม็ดเลือดสะสมรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ภายในช่องว่างของเนื้อเยื่อ (10X)

จากการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในปูทะเลปกติและปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 เลือดใส และกลุ่มที่ 2 เลือดสีส้มใส จากบริเวณเนื้อเยื่อหัวใจ กล้ามเนื้อ ตับและเหงือก พบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อหัวใจในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่มที่ 1 พบว่าบริเวณเนื้อเยื่อหัวใจในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่ม 1 เกิดการตายของเซลล์ สังกเกตจากเนื้อเยื่อ myocardium มีเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันแทรกอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก ส่วนในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 เนื้อเยื่อ myocardium เริ่มมีการจัดเรียงอย่างหลวม และมีเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันแทรกอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อมากกว่าในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 ซึ่งจากการศึกษาของ Stentiford *et al.* (2002) พบว่าปูที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงภายในเนื้อเยื่อ myocardium และ pericardium มีเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันและเกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อ

เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่ม 1 พบว่าการจัดเรียงตัวของกล้ามเนื้อลำตัวมีการเสียหายเล็กน้อยและมีเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันหลายบริเวณภายในเนื้อเยื่อ ส่วนปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่ม 2 พบการจัดเรียงตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อแยกตัวเล็กน้อยและมี

เม็ดเลือดรวมกลุ่มกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปูชนิด *Nephrops norvegicus* ที่พบ *Hematodinium* เป็นจำนวนมากภายในเนื้อเยื่อ และบริเวณ Z-line มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และเกิดการย่อยสลายบริเวณ peripheral fibre และ sarcolemma ออกจาก myofibrils (Stentiford *et al.*, 2000)

เนื้อเยื่อตับในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 1 บริเวณ tubule epithelium มีจำนวนไขมันลดลง และเกิดการตายของเซลล์สังเกตจากการพบเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันแทรกอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ เมื่อเปรียบเทียบกับปูทะเลปกติ ส่วนในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 พบว่าบริเวณเซลล์ตับไม่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์เยื่อผนังท่อ และมีการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดเพิ่มมากขึ้น รวมถึงเกิดการสร้างโนดูลแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Stentiford *et al.* (2002) ปูที่เป็นโรค pink crab disease ซึ่งภายในเนื้อเยื่อเกิดการเสื่อมสภาพและไขมันที่สะสมอยู่ภายใน R-cells ของ hepatopancreatic tubules ลดลง ซึ่ง R-cell มีหน้าที่ในการสะสมไกลโคเจนและ lipid droplet (Verri *et al.*, 2001) จากการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณตับมีความผิดปกติมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่น ๆ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรคและกำจัดของเสียออกจากร่างกาย (Burgents *et al.*, 2005) และปูมีระบบการไหลเวียนของเลือดแบบเปิดทำให้เชื้อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทะเลเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านเหงือก และแพร่กระจายเข้าสู่ตับด้วยการลำเลียงของเลือด (Ceccaldi, 1989) ซึ่งภายในช่องว่างของตับจะมีการสร้างโนดูลโอบล้อมเพื่อทำลายเชื้อโรค (Vogan *et al.*, 2002) นอกจากนี้ภายใน haemal arterioles ที่พบพาราไซสต์อยู่เป็นจำนวนมากอาจจะมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์และหลอดเลือดของตับ (Stentiford and Shields, 2005)

เนื้อเยื่อเหงือกในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงในกลุ่ม 1 พบว่า gill lamella เกิดความเสียหายโดยมีเม็ดเลือดสะสมอยู่เกิดการสร้างเมลานิน ส่วนบริเวณ gill stem พบเม็ดเลือดรวมกลุ่มกันอยู่ภายในช่องว่างของเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมากและเกิดการสร้างโนดูล ส่วนในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงกลุ่มที่ 2 บริเวณ gill stem และ gill lamella เกิดความเสียหายมีการสร้างเมลานินบริเวณกิวติเคิลและเซลล์อีพิเอดอร์มิส และมีเม็ดเลือดอยู่รวมกันเป็นกลุ่มภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเหงือกถือว่าเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซและดูดซึมแร่ธาตุจากน้ำทะเลเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางรอยต่อกระดองและบริเวณโคนขาเดิน (Waterman, 1960) จึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อจุลินทรีย์หรือพาราไซสต์ที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรง จากผลการศึกษาสอดคล้องกับ Wheeler *et al.* (2007) พบว่าปู snow crab ที่พบ *Hematodinium* ภายในเหงือกเป็นจำนวนมากส่งผลให้เนื้อเยื่อมีการเสื่อมสภาพ จึงส่งผลกระทบต่อระบบการหายใจของปูเนื่องจากปรสิตอุดตันอยู่ภายในหลอดเลือดของเหงือกทำให้เมทาบอลิซึมของระบบต่าง ๆ ได้รับผลกระทบ (Field and Appleton, 1995; Taylor *et al.*, 1996)

#### 4. การศึกษาการฉีดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงเข้าสู่ปูทะเลปกติ

จากการทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง 2 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* เข้าสู่ปูทะเลปกติ และรอสังเกตอาการในช่วงระยะเวลา 7 วัน พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดรวม และลักษณะอาการหลังจากการฉีดเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 2 ชนิด มีรายละเอียดดังนี้

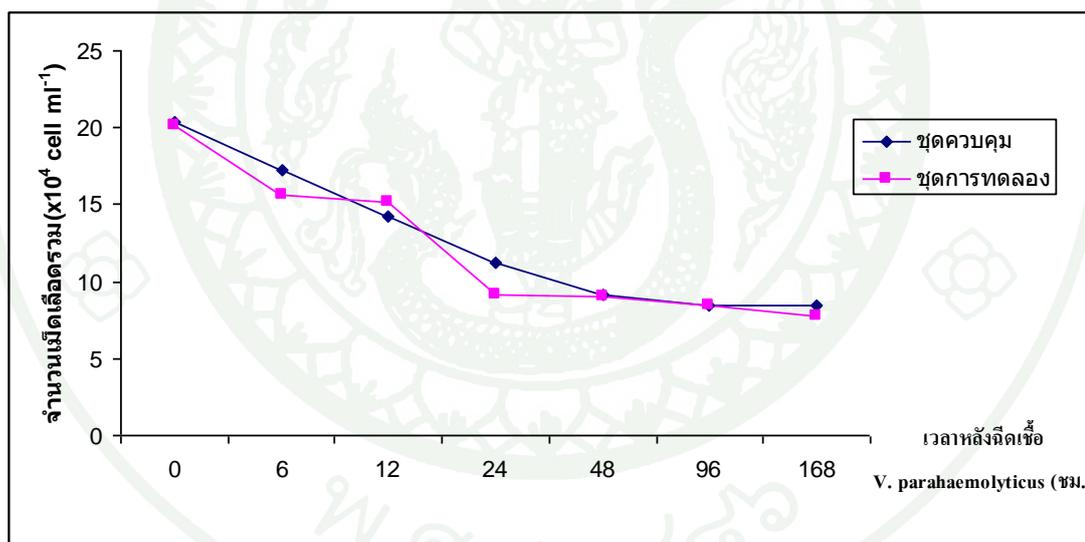
ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลปกติจำนวน 5 ตัวที่ได้รับการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $5.98 \times 10^8$  CFU/ml ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (40X) พบว่าหลังจากปูทะเลได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6, 12, 24, 48, 96 และ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $20.10 \pm 2.72$ ,  $15.60 \pm 2.83$ ,  $15.20 \pm 1.13$ ,  $9.10 \pm 0.42$ ,  $9.00 \pm 1.13$ ,  $8.50 \pm 0.14$  และ  $7.80 \pm 0.28 \times 10^4$  cell  $ml^{-1}$  ตามลำดับ โดยในวันที่ 1, 2, 4 และ 7 วัน เม็ดเลือดรวมมีปริมาณลดลงคิดเป็น 54.73, 55.22, 57.71 และ 61.19% ตามลำดับ (ตารางที่ 22, 23 และ ภาพที่ 38 )

ตารางที่ 22 จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ระยะเวลาหลังฉีดเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนเม็ดเลือด ( $\times 10^4$ cell $ml^{-1}$ )	
	ปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	ชุดควบคุม
0	$20.10 \pm 2.72$	$20.40 \pm 2.80$
6	$15.60 \pm 2.83$	$17.20 \pm 2.27$
12	$15.20 \pm 1.13$	$14.20 \pm 1.13$
24	$9.10 \pm 0.42$	$11.20 \pm 3.96$
48	$9.00 \pm 1.13$	$9.20 \pm 1.13$
96	$8.50 \pm 0.14$	$8.40 \pm 1.13$
168	$7.80 \pm 0.28$	$8.40 \pm 1.70$

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus*

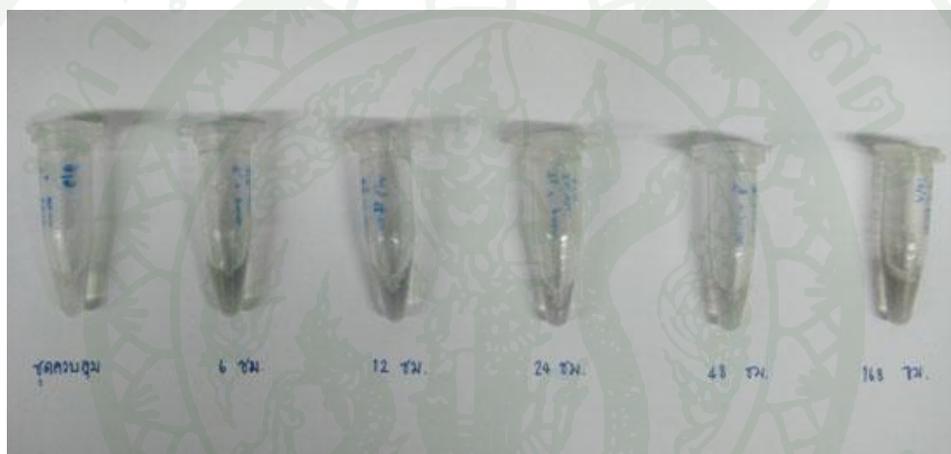
ระยะเวลาหลังฉีดเชื้อ	เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดรวม	
	ปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i>	ชุดควบคุม
0 ชม.	-	-
6 ชม.	22.39	15.69
12 ชม.	24.38	30.39
1 วัน	54.73	45.10
2 วัน	55.22	54.90
4 วัน	57.71	58.82
7 วัน	61.19	58.82



ภาพที่ 38 จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีด *V. parahaemolyticus* ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 168

อาการของปูทะเลจำนวน 5 ตัว ที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าหลังจากการฉีดเชื้อภายใน 30 นาที ปูทะเลมีการตายจำนวน 1 ตัว ส่วนปูที่ได้รับเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปูทะเลมีการตายเพิ่มขึ้นอีกจำนวน 2 ตัว และยังมีปูทะเลที่มีชีวิตจำนวน 2 ตัว ซึ่งปูทะเลที่มีชีวิตรอดมีอาการปกติ โดยชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัวเมื่อมีสิ่งมากระตุ้น เมื่อทำการเจาะเลือดเพื่อสังเกตสีเลือดพบว่าเลือดใส และหลังจากที่ปูทะเลได้รับเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปูทะเลที่มีชีวิตรอดยังมีอาการปกติโดย

ชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว เมื่อทำการเจาะเลือดพบว่าปูทะเล 1 ใน 2 ตัว สีเลือดมีการเปลี่ยนแปลงจากใสเป็นสีส้มอ่อน ๆ และแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ส่วนปูอีกหนึ่งตัวยังมีอาการปกติ เลือดใส และแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ ส่วนปูทะเลชุดควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อแบคทีเรียพบว่าปูมีร่างกายแข็งแรง เลือดมีลักษณะใส และแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ หลังจากปูทะเลได้รับเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าปูทะเลจำนวน 2 ตัวที่มีชีวิตรอดเริ่มมีอาการอ่อนเพลีย แต่ยังมีการตอบสนองเมื่อมีสิ่งมากระตุ้น เมื่อทำการเจาะเลือดพบว่าเลือดมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีส้มอ่อน แต่เมื่อปูทะเลได้รับเชื้อเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ปูมีอาการอ่อนเพลียซึ่งสังเกตได้อย่างชัดเจน เลือดมีสีส้มเข้มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 ลักษณะของสีเลือดในปูทะเลที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 168

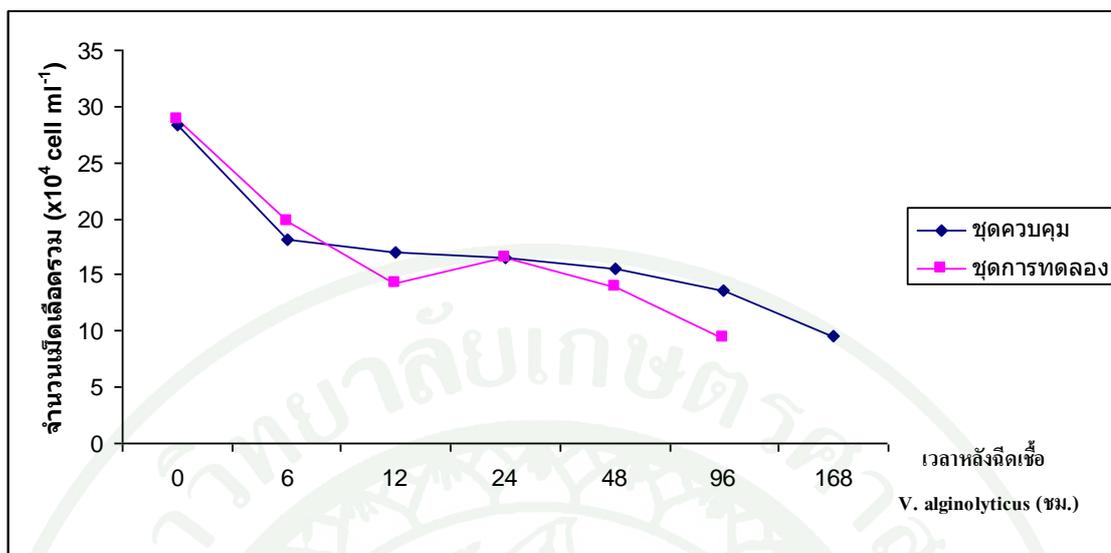
ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลปกติจำนวน 5 ตัว ที่ได้รับการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ที่มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $1.01 \times 10^9$  CFU/ml ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า (40X) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดหลังจากที่ปูทะเลได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* โดยจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 6 และ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $19.73 \pm 3.30 \times 10^4$  และ  $14.20 \pm 0.85 \times 10^4$  cell ml<sup>-1</sup> ส่วนในชั่วโมงที่ 24 หลังจากปูทะเลได้รับเชื้อจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยซึ่งมีค่าเท่ากับ  $16.60 \pm 1.41 \times 10^4$  cell ml<sup>-1</sup> หลังจากนั้นจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของปูทะเลที่ได้รับเชื้อในชั่วโมงที่ 48 และ 96 กลับมีค่าลดลงอีกครั้ง โดยมีค่าเท่ากับ  $14.00 \pm 1.13$  และ  $9.40 \pm 0.85 \times 10^4$  cell ml<sup>-1</sup> ส่วนจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยในชั่วโมงที่ 168 ไม่มีข้อมูลเนื่องจากปูมีการตายลงก่อน โดยในวันที่ 1, 2 และ 4 วัน เม็ดเลือดรวมมีปริมาณลดลงคิดเป็น 42.36, 51.39 และ 67.36% (ตารางที่ 24, 25 ภาพที่ 40)

ตารางที่ 24 จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ *V. alginolyticus*

ระยะเวลาหลังฉีดเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนเม็ดเลือด ( $\times 10^4$ cell ml <sup>-1</sup> )	
	ปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	ชุดควบคุม
0	28.80 $\pm$ 6.29	28.40 $\pm$ 6.44
6	19.73 $\pm$ 3.30	18.20 $\pm$ 0.85
12	14.20 $\pm$ 0.85	17.00 $\pm$ 0.28
24	16.60 $\pm$ 1.41	16.60 $\pm$ 0.28
48	14.00 $\pm$ 1.13	15.60 $\pm$ 0.57
96	9.40 $\pm$ 0.85	13.60 $\pm$ 0.57
168	-	9.60 $\pm$ 0.57

ตารางที่ 25 เปอร์เซนต์เม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ *V. alginolyticus*

ระยะเวลาหลังฉีดเชื้อ	เปอร์เซนต์เม็ดเลือดรวม	
	ปูทะเลที่ฉีดเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	ชุดควบคุม
0 ชม.	-	-
6 ชม.	31.49	35.91
12 ชม.	50.69	41.14
1 วัน	42.36	41.55
2 วัน	51.39	46.48
4 วัน	67.36	53.52
7 วัน	-	65.28

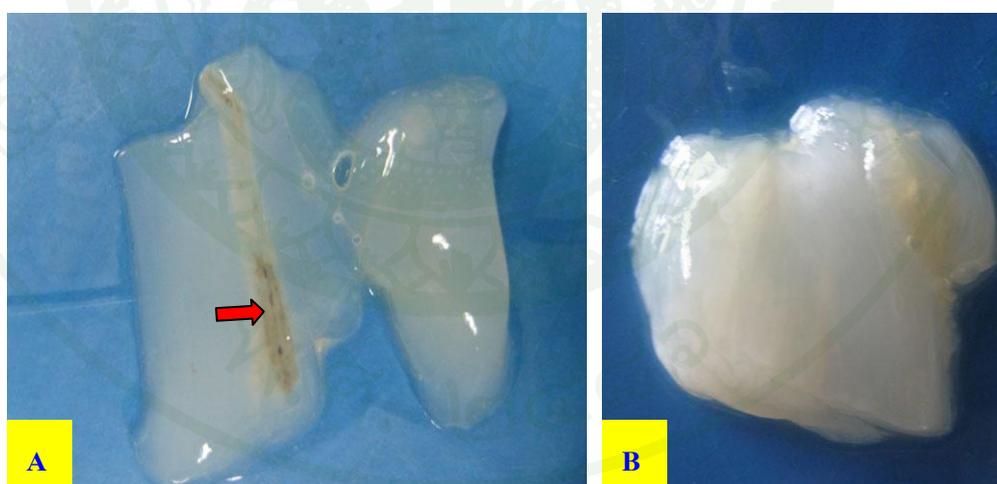


ภาพที่ 40 จำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลที่ฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 168

อาการของปูทะเลปกติจำนวน 5 ตัว ที่ได้รับการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่าหลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ปูตายจำนวน 1 ตัว และหลังจากปูได้รับเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปูตายเพิ่มขึ้นอีกจำนวน 2 ตัว ส่วนปูทะเลที่รอดชีวิต จำนวน 2 ตัว ปูมีการเคลื่อนไหวร่างกายช้าลง ไม่ค่อยกินอาหาร มีการสลัดขาเดินที่ช้า แต่ยังมีการตอบสนองเมื่อมีสิ่งมากระตุ้น และในชั่วโมงที่ 96 หลังจากที่ได้รับเชื้อปูมีการเคลื่อนไหวช้าลงมาก มีการสลัดก้ามและขาเดินที่ช้า บริเวณท้องและขาเดินมีสีดำ (ภาพที่ 41) ไม่มีการชูก้ามตอบสนองเมื่อมีสิ่งมากระตุ้น เมื่อทำการเจาะเลือดเพื่อสังเกตสีเลือดพบว่าเลือดมีลักษณะใส แข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ จากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมงปูจึงตายลง และเมื่อเปิดกระดองออกเพื่อสังเกตอวัยวะภายใน พบว่ากล้ามเนื้อโพรง และลักษณะของกล้ามเนื้อลำตัวบริเวณโคนขาที่ 5 เนื้อเยื่อเกิดการตายซึ่งมีลักษณะเป็นแถบสีน้ำตาลขุ่น (ภาพที่ 42) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือแทนสารละลายเชื้อ *V. alginolyticus*



ภาพที่ 41 บริเวณท้อง ออก และรอยางค์ขาในปูที่ฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ในชั่วโมงที่ 96 พบว่ามีลักษณะเป็นแถบสีดำ



ภาพที่ 42 ลักษณะเนื้อเยื่อลำตัว (A) ปูทะเลหลังจากที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* ในชั่วโมงที่ 168 เกิดการตายของเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นแถบสีน้ำตาลขุ่น (ลูกศรสีแดง) (B) ปูทะเลปกติ เนื้อเยื่อลำตัวมีลักษณะขาวใส

จากผลการศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูทะเลปกติที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* พบว่าปูทะเลมีจำนวนเม็ดเลือดลดลงต่ำสุดมีค่าเท่ากับ  $8.40 \pm 1.70 \times 10^4$  cell ml<sup>-1</sup> หลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 186 ชั่วโมง ส่วนปูทะเลที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* มีจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลงต่ำสุดมีค่าเท่ากับ  $9.40 \pm 0.85 \times 10^4$  cell ml<sup>-1</sup> หลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์กลุ่มครึ่งเตหะชนิดอื่น ๆ โดยในปูชนิด shore crab (*Carcinus maenas*) ที่ฉีดเชื้อ *V. anguillarum* พบว่าจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากที่ได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งมีจำนวนเม็ดเลือดรวมเท่ากับ  $20.76 \times 10^6$  cell ml<sup>-1</sup> (Hauton *et al.*, 1997) ในการศึกษาของ Macey *et al.* (2008) ซึ่งได้ฉีดเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. campbellii* เข้าสู่ปูชนิด Atlantic blue crab (*Callinectes sapidus*) พบว่าหลังจากฉีดเชื้อเข้าสู่ปูเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจำนวนเม็ดเลือดรวมของปูมีค่าลดลงเช่นกัน ส่วนการศึกษาของ Romas and Rowley (2004) พบว่าหลังจากฉีด Extracellular product ของ *Pseudoalteromonas atlantica* ในปูชนิด edible crab (*Cancer pagurus*) จำนวนเม็ดเลือดรวมมีการลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 90 นาที หลังจากที่ได้รับเชื้อ

นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดรวมในกุ้งขาวชนิด *Litopenaeus vannamei* ที่ฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ  $1.0 \times 10^5$  CFU/ml และ  $1.5 \times 10^5$  CFU/ml พบว่ากุ้งมีจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลงหลังจากที่ได้รับเชื้อเป็นเวลา 12-48 ชั่วโมง และ 6-48 ชั่วโมง ตามลำดับ (Li *et al.*, 2008) ส่วนการศึกษาของนพดล และคณะ (2550) พบว่ากุ้งกุลาดำอายุ 60 วัน ที่ฉีดเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) มีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง 35, 70 และ 50% ตามลำดับ

เม็ดเลือดเป็นบทบาทแรกในระบบภูมิคุ้มกันแบบ cellular immunity และ humoral immunity ซึ่งมีความสำคัญมากในสัตว์กลุ่มครึ่งเตหะที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง (Macey *et al.*, 2008) โดยเม็ดเลือดที่มีความสำคัญในสัตว์กลุ่มครึ่งเตหะมี 3 ชนิดซึ่งมีหน้าที่แตกต่างกันคือ เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เม็ดเลือดชนิด semigranular cell มีหน้าที่ห่อหุ้มเชื้อโรค (encapsulation) ชุดท้ายคือเม็ดเลือดชนิด granular cell มีหน้าที่เก็บและปล่อย Prophenoloxidase การเกิด โนดูล (nodule) การสร้างเม็ดสี (melanization) และ cytotoxicity (Sodernall and Cerenius, 1992; Haug *et al.*, 2002) ซึ่งจำนวนของเม็ดเลือดรวมที่ลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากเม็ดเลือดมีการเคลื่อนย้ายจากกระแสเลือดเข้าไปสู่บริเวณที่มีการติดเชื้อ (Burge *et al.*, 2007) โดยเม็ดเลือดถูกสร้างและเก็บไว้ใน haemopoietic tissue จากนั้นจึงปลดปล่อยออกสู่กระแสเลือด (Martin *et al.*, 1996) ซึ่งในปู blue crab (*Callinectes sapidus*) ที่เป็นโรค shell disease syndrome พบว่ามีเม็ดเลือดมาล้อมรอบบริเวณที่เกิดบาดแผลเป็นจำนวนมากเพื่อ

ทำลายเชื้อโรคและเกิดกระบวนการสร้างเม็ดสีดำหรือ melanization ขึ้น (Noga *et al.*, 2000) ในระหว่างที่สัตว์มีการติดเชื้อและส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดรวมลดลงยังเกี่ยวข้องกับการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือด (haemocyte lysis) การเกิด โนดูล และเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือดเกิดความเสียหาย (haemopoietic tissue) จึงขัดขวางกระบวนการสร้างเม็ดเลือด (Song *et al.*, 2003) จากการศึกษาของ Supamattaya *et al.* (1994) พบว่าบริเวณของเนื้อเยื่อชั้นนอกและเนื้อเยื่อชั้นกลางของกุ้งและปูทะเลที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งภายในเนื้อเยื่อดังกล่าวนั้นมี haemopoietic tissue ประกอบอยู่จึงส่งผลให้การสร้างเม็ดเลือดมีปริมาณลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. สามารถผลิตสารที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดทำให้เม็ดเลือดเกิดการแตกสลาย จึงส่งผลกระทบต่อจำนวนเม็ดเลือดในกระแสเลือด (Lee *et al.*, 1995)

## สรุป

1. การศึกษาลักษณะปูทะเลในเขตจังหวัดสมุทรสงครามและจันทบุรี ช่วงเดือนตุลาคม 2551 ถึงกุมภาพันธ์ 2552 จำนวน 100 ตัว พบปูทะเลที่มีลักษณะผิดปกติคือ บริเวณท้อง รางงักขา และก้ามมีสีน้ำตาลและสีแดง ก้ามเนื้อลำตัวมีสีขาวขุ่นจนถึงขาวอมชมพู มองเห็นเส้นการเรียงตัวของก้ามเนื้ออย่างชัดเจน เลือดมีสีแตกต่างกันซึ่งจัดแบ่งปูทะเลที่มีอาการดังกล่าวออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 เลือดใส กลุ่ม 2 เลือดสีส้มใส กลุ่ม 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น กลุ่ม 4 เลือดสีส้มคล้ายสีชาเย็น และกลุ่ม 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน โดยกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มที่มีอาการค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากเลือดไม่แข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ อวัยวะภายในไม่คงรูป ตับมีสีเหลืองซีด เหงือกบวมพอง และนึ่มกว่าปกติ ก้ามเนื้อโปรง การตอบสนองช้า และปูจะตายภายในเวลาอันรวดเร็ว

2. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง พบเชื้อแบคทีเรีย 9 ชนิด คือ *Shewanella putrefaciens* group, *Pasteurella multocida*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* 1, *Vibrio parahaemolyticus* 2, *Vibrio parahaemolyticus* 3, *Vibrio vulnificus*, *Grimontia hollisae* และ *Brevundimonas diminuta*

3. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง ในกลุ่มที่ 1 (เลือดใส) และกลุ่มที่ 2 (เลือดส้มใส) พบว่า ลักษณะของเนื้อเยื่อหัวใจ ก้ามเนื้อ ตับ และเหงือก เกิดความเสียหาย เนื่องจากเกิดการตายของเซลล์ สืบเนื่องจากการพบเม็ดเลือดรวมกลุ่มและแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก และพบการเกิดโนครูล และการสร้างเม็ดสีดำบริเวณที่มีการติดเชื้อ ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันในระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล

4. การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงโดยฉีดกลับเข้าสู่ปูทะเลปกติ พบว่าปูที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยลดลงอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึง 168 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เลือดมีการเปลี่ยนแปลงจากใสเป็นสีส้มอ่อน ส่วนปูทะเลที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่าจำนวนเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึง 96 เลือดมีลักษณะปกติ เมื่อเปิดกระดองเพื่อสังเกตอวัยวะภายในพบว่า เนื้อเยื่อลำตัวมีความผิดปกติโดยมีลักษณะเป็นแถบสีน้ำตาลขุ่นแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อ สรุปจากการศึกษาพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีเลือดจากใสเป็นสีส้ม ซึ่งเป็นอาการในกลุ่มที่ 2 ของลักษณะปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

## ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาลักษณะผิดปกติในปูทะเล พบว่าปูทะเลมีบริเวณอก ท้อง รยางค์ขาที่มีสีแดง  
ควรมีการหาสาเหตุของการเกิดอาการอก-ท้องแดง จากสภาพความผิดปกติของสภาพแวดล้อมหรือ  
การขาดสารอาหารบางชนิดเพิ่มเติม



## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมประมง. 2551. แหล่งที่มา: <http://www.fisheries.go.th/foreign/doc/excel/totalexport1n.xls>,  
กรกฎาคม พ.ศ. 2551.
- ชลธิ์ ชีวะเศรษฐกรรม. 2539. การเลี้ยงปูทะเล. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี, ปัตตานี.
- โชคชัย ยศยิ่งบันลือ, เอกพงษ์ นาคะพงษ์ และ ประหยัด ภูพันธ์สาย. 2541. การเลี้ยงปูทะเล, *Scylla serrata* (Forsk.) วิทยุในบ่อดิน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 15/2541 ศูนย์พัฒนาการ  
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี. จันทบุรี.
- ชนเสฐฎ์ ทองใสเกลี้ยง. 2549. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในปูทะเล (*Scylla serrata*  
Forskål 1775) ที่มีอาการท้องแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นพดล สุกระกาญจน์, กิจการ สุภมาตย์ และ จรีพร เรืองศรี. 2550. ผลของการเปลี่ยนแปลงปัจจัย  
สิ่งแวดล้อมบางประการและการติดเชื้อต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ  
(*Penaeus monodon*). วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 10 (1) : 35-46.
- บรรจง เทียนสงรัมย์ และ บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. ปูทะเล: ชีววิทยา การอนุรักษทรัพยากร  
และการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์แบบยั่งยืน. เอกสารเผยแพร่ เครือข่ายและพัฒนา.  
“อุตสาหกรรมพืชและสัตว์น้ำ” สกว. ชุดที่ 3. กรุงเทพฯ.
- บ้งอร ศรีมุกดา. 2538. การทดลองเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเลให้มีไข่แก่นอกกระดองและการอนุบาลลูกปู  
ทะเลวัยอ่อน *Scylla serrata* (Forsk.). เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 47/2538 ศูนย์พัฒนาการ  
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี. จันทบุรี.
- บ้งอร ศรีมุกดา, โชคชัย ยศยิ่งบันลือ และ นิยม บุตรโคษา. 2539. การเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเลให้มีไข่  
นอกกระดองในบ่อดิน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 32/2539 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ  
ชายฝั่งจันทบุรี. จันทบุรี.

- บังอร ศรีมุกดา และ โชคชัย ยศยิ่งบันลือ. 2545. การผลิตแม่พันธุ์ปูทะเลไข่นอกกระดองเพื่อ  
การเพาะพันธุ์. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 1/2545 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง  
จันทบุรี. จันทบุรี.
- ประดิษฐ์ แสงทอง. 2549. ความแตกต่างของนิวคลีโอไทป์ในไมโทคอนเดรีย DNA ของปูทะเล  
(*Scylla spp.*) ชนิดต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชฎา ขาวหนูนา. 2543. การเลี้ยงปูทะเล (*Scylla spp.*) ในบ่อดิน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 35/2543  
ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี. สุราษฎร์ธานี.
- วิวรรณ สิงห์ทวีศักดิ์ และ วัฒนา ภูเจริญ. 2543. การเลี้ยงปูทะเล, *Scylla serrata* (Forsk.),  
ให้เป็นปูนิ่ม. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 41/2543 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง  
จันทบุรี. จันทบุรี.
- วิวรรณ สิงห์ทวีศักดิ์. 2546. การเลี้ยงปูทะเล, *Scylla serrata* (Forsk.), ให้เป็นปูนิ่มในบ่อซีเมนต์.  
เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 1/2546 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี. จันทบุรี.
- สุธี แก้วเสงี่ยม. 2548. การศึกษาทางมิวตาติววิทยาของปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal 1775)  
ที่มีอาการท้องแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- สุรชาติ ฉวีภักดิ์, เจษฎา เจริญวัฒน์ และ สันฐวัฒน์ สุทธิอาจ. 2538. การเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเล *Scylla*  
*serrata* (Forsk.) ให้มีไข่นอกกระดองในบ่อซีเมนต์ 4 วิธี. เอกสารวิชาการ ฉบับที่  
15/2538 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี. จันทบุรี.
- สุรชาติ ฉวีภักดิ์ และ เอกพงษ์ นาคะพงษ์. 2543. การเลี้ยงแม่พันธุ์ปูทะเล, *Scylla serrata* (Forsk.)  
ให้มีไข่นอกกระดองในบ่อคอนกรีตที่มีวัสดุรองพื้นต่างกัน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 19/2543  
ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี. จันทบุรี.
- อนุวัฒน์ รัตนโชติ, ทวีศักดิ์ ยังวนิชเศรษฐ, สุภาพ ไพโรนาพงศ์ และ รัชฎา แดงวัฒนกุล. 2548.  
การเลี้ยงปูทะเล. งานเอกสารคำแนะนำ กรมส่งเสริมการประมง กรมประมง.

- Andersen, E.L., J.H. Norton and N.H. Levy. 2000. A new shell disease in the mud crab *Scylla serrata* from Port Curtis, Queensland (Australia). **Dis. Aquat. Org.** 43: 233-239.
- Bachere, E., D. Destoumieux and P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture** 191: 71-88.
- Boeger, W.A., M.R. Pie, A. Ostrensky and L. Patella. 2005. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. **Mem inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro.** 100 (2): 161-167.
- Bower, S.M. and G.R. Meyer. 2002. Morphology and ultrastructure of a protistan pathogen in the haemolymph of shrimp (*Pandalus* spp.) in the northeastern Pacific Ocean. **Can. J. Zool.** 80: 1055-1068.
- Buchanan, R.E., N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray C.F. Niven A.W. Ravin and R.Y. Stanier. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8<sup>th</sup> ed. The Williams & Wikins company, U.S.
- Burnett, L.E., J.D. Holman, D.D. Jorgensen, J.L. Ikerd and K.G. Burnett. 2006. Immune defense reduces respiratory fitness in *Callinectes sapidus*, the atlantic blue crab. **Biol. Bull.** 211: 50-57.
- Burgents, J.E., L.E. Burnett, E.V. Stabb and K.G. Burnett. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced in to the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 681-691.
- Burge, E.J., D.J. Madigan, L.E. Burnett and K.G. Burnett. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. **Fish shellfish Immunol.** 22: 327-339.

- Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. **Adv. Trop. Aqua.** 9: 243-259.
- Chang, E.S., S.A Chang., R. Keller, P.S. Reddy, M.J. Snyder and J.L. Specs. 1999. Quantification of stress in lobsters: crustacean hyperglycemic hormone, stress proteins and gene expression. **Am. Zool.** 39: 487-495
- Chen, L.L., C.F. Lo, Y.L. Chiu, C.F. Chang and G.H. Kou. 2000. Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. **Dis. Aquat. Org.** 40: 157-161.
- Clare, A.S. and G. Lumb. 1994. Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Mar. Biol.** 118: 601-610.
- Costa-Ramos, C. and Andrew F. Rowley. 2004. Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 729-735.
- Curtis, S.K., M.H. Kothary, R.J. Blodgett, R.B. Raybourne, G.C. Ziobro, and B.D. Tall. 2007. Rugosity in *Grimontia hollisae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 73: 1215-1224.
- Daniels, N. A., L. M.Kinnon, R. Bishop, S Altekruise, B. Ray, R. M. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N.H. Bean, P.M. Griffin and L. Slutsker. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. **The Journal of infections disease.** 181: 1661-1666.
- Davis, J.W. and R.K. Sizenmore. 1982. Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. **Appl. Environ. Microbiol.** 43: 1092-1097.

- Dirckson, H., D. Böcking, U. Heyn, C. Mandel, J.S. Chung, G. Baggerman, P. Verhaert, S. Daufeldt, T. Plösch, P.P. Jaros, E. Waelkens, R. Keller and S.G. Webster. 2001. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. **J. Biochem.** 356: 159-170.
- Eddy, F., A. Powell, S. Gregory, L.M. Nunan, G.V. Lightner, P.J. Dyson, A.F. Rowley and R. J. Shields. 2007. A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas*-molecular pathology and epidemiology. **Microbiology** 153: 2839-2849.
- Field, R.H. and P.L. Appleton. 1995. A Hematodinium-like dinoflagellate infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*: observations on pathology and progression of infection. **Dis. Aquat. Org.** 22: 115-128.
- Floreto, E.A.T., D.L. Prince, P.B. Brown and R.C. Bayer. 2000. The biochemical profiles of shell-diseased American lobsters, *Homarus americanus* Milne Edwards. **Aquaculture** 188: 247-262.
- Getchell, R.G. 1989. Bacterial shell disease in crustaceans: a review. **J. Shellfish Res.** 8: 1-6.
- Haryanti, K. Sugama and T. Nishijima. 2003. Diversity of Bacterial Isolated from Crustacea Larvae and Their Rearing Water. **J. Ocean Univ. Qingdao.** 2: 49-52.
- Haug, T., A.K. Kjuul, K. Stensvag, E. Sandsdalen and O.B. Styrvold. 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. **Fish shellfish Immunol.** 12: 371-385.
- Hickman, F. W, J.J. III Farmer, D.G. Hollis, G. R. Fanning, A. G Steigerwalt, R. E. Weaver and D. J. Brenner. 1982. Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.** 15: 395-401.

- Hisbi, D., J. vandenbergh, R. Robiles, L. Verdonck, J. Swings and P. Sorgeloos. 2000. Characterisation of *Vibrio* and related bacteria associated with Shrimp *Penaeus monodon* larvae in Indonesia. **Asian Fisheries Science**. 13: 57-64.
- Hose, J.E., G.G. Martin and A.S. Gerard. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. **Biol. Bull.** 178: 33-45.
- Huang, W.S., K. J. Wang, M. Y. Cai, S. J. Li and G. Z. Wang. 2006. Purification and partial characterization of a novel antibacterial protein scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forsk., 1775). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 339: 37-42.
- Hauton, C., J.A. Williams and L.E. Hawkins. 1997. The effect of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 211: 115-128.
- Iwanaga, S., S.I. Kawabata and T. Muta. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: Their structures and functions. **J. Biochem.** 123: 1-15.
- Jayasankar, V. and T. Subramoniam. 1999. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 236: 253-259.
- Johansson, M.W. and Soderhall K. 1989. Cellular Immunity in Crustaceans and the pro PO system. **Parasitology Today**. 5: 173-176.
- Karlin, K.D., R.W. Cruse, Y. Gultneh, A. Farooq, J.C. Hayes and J. Zubieta. 1987. Dioxygen-copper reactivity. Reversible binding of O<sub>2</sub> and CO to phenoxo-bridged dicopper (I) complex. **J. Am. Chem. Soc.** 109: 2668-2679.

- Kitajima, N., K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Morooka, S. Hashimoto, T. Kitagawal, K. Toriumi, L. Tatsumi and A. Nakamura. 1992. A new model for dioxygen binding in hemocynin. Synthesis, characterization and molecular structure of the  $u-n_2:n_2$  peroxo dinuclear copper (II) complexes,  $[cu(HB(3,5-R_2pz)_3)_2(O_2)(R= \text{isopropyl and Ph})]$ . **J. Am. Chem. Soc.** 114: 1277-1291.
- Le Moullac, G. and P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. **Aquaculture** 191: 121-132.
- Lee, K.K., F.R. Chen and P.C. Lui. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Fish shellfish Immunol.** 5: 385-387.
- Li, C.C., S.T. Yeh and J.C. Chen. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. **Fish Shellfish Immunol.** 25: 853-860.
- Macey, B.M., C.K. Rathburn, L.K. Thibodeaux, L. E. Burnett and K. G. Burnett. 2008. Clearance of *Vibrio campbellii* injected into the hemolymph of *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: The effects of prior exposure to bacteria and environmental hypoxia. **Fish shellfish Immunol.** 25: 718-730.
- Malloy, S.C. 1978. Bacteria induced shell disease of lobsters (*Homarus americanus*). **J. Wildl. Dis.** 14: 2-10.
- Martin, G.G., J.E. Hose, G. Minka and S. Rosenberg. 1996. Clearance of bacteria injection into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda) role of hematopoietic tissue. **J. Morphol.** 227: 227-233.
- Meyers, T.R., Timothy M. Koeneman, C. Botelho and S. Short. 1987. Bitter crab disease: a fatal dinoflagellate infection and marketing problem for Alaska Tanner crabs *Chionoecetes bairdi*. **Dis. Aquat. Org.** 3: 195-216.

- Nakamura, T., T. Morita and S. Iwanaga. 1989. Lipopolysaccharide-sensitive serine protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. **Eur. J. Biochem.** 154: 511-521.
- Noga, E.J., R. Smolowitz and L.H. Khoo. 2000. Pathology of shell disease in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, (Decapoda: Portunidae). **J. Fish Dis.** 23: 389-399.
- Phillips, J.W., R.J.W. McKinney, F.J.R. Hird and D.L. Macmillan. 1977. Lactic acid formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned. **Comp. Biochem. Physiol.** 56(B): 427-433.
- Relf, J.M., J.R.S. Chisholm, G.D. Kemp and V.J. Smith. 1999. Purification and characterization of acysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 264: 350-357.
- Rowley, A.F. and A. Powell. 2007. Invertebrate immune systems-specific, Quasi-specific, or non-specific? **J. Immunol.** 179: 7209-7214.
- Salaenoi, J. A. Sangcharoen, A. Thongpan and M. Mingmuang. 2006. Morphology and haemolymph composition changes in red sternum mud crab (*Scylla serrata*). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40(1): 158-166.
- Seki, N., T. Muta, T. Oda, D. Iwaki, K.I. Kuma, T. Miyata and S. Iwanaga. 1994. Horseshoe crab (1,3)- $\beta$ -D-glucan-sensitive coagulation factor G. A serine protease zymogen heterodimer with similarities to  $\beta$ -glucan-binding proteins. **J. Biol. Chem.** 269: 1370-1374
- Shapiro, R.L, S. Altekruze and L. Hutwagner. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. **J. Infect. Dis.** 178: 752-759.

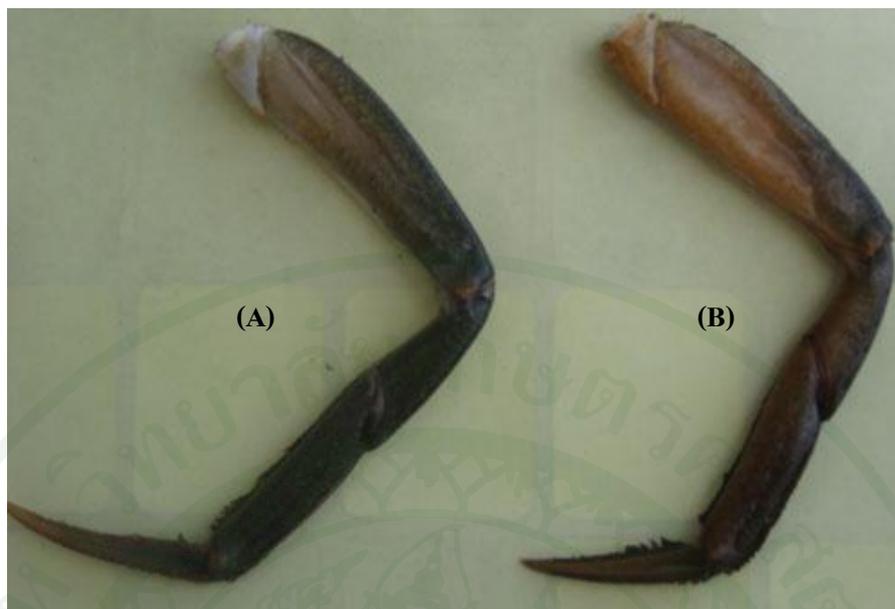
- Shields, J.D. and C.M. Squyars. 2000. Mortality and hematology of blue crab, *Callinectes sapidus*, experimentally infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii*. **Fish. Bull.** 98: 139-152.
- Sindermann, C.J. 1990. **Principal disease of marine fish and shellfish**. 2<sup>nd</sup> Academic Press, New York.
- Smith, V.J., J.H. Brown and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish shellfish Immunol.** 15: 71-90.
- Soderhall and Cerenius. 1992. Crustacean Immunity. **Annual Rev. of Fish Diseases**. 3-23 pp.
- Song, Y.L., C.I. Yu, T.W. Lien, C.C. Huang and M.N. Lin. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white Taura syndrome virus. **Fish shellfish Immunol.** 14: 317-331.
- Stentiford, G.D., D.M. Neil and G.H. Coombs. 2000. Alterations in the biochemistry and ultrastructure of the deep abdominal flexor muscle of the norway lobster *Nephrops norvegicus* during infection by a parasitic dinoflagellate of the genus *Hematodinium*. **Dis. Aquat. Org.** 42: 133-141.
- \_\_\_\_\_, G. D., M. Green, K. Bateman, H.J. Small, D.M. Neil and S.W. Feist. 2002. Infection by a *Hematodinium*-like parasitic dinoflagellate causes pink crab disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus*. **J. Invertebr. Pathol.** 79: 179-191.
- \_\_\_\_\_, M. Evans, K. Bateman and S. W. Feist. 2003. Co-infection by a yeast-like organism in *Hematodinium*-infected European edible crabs *Cancer pagurus* and velvet swimming crabs *Necora puber* from the English Channel. **Dis Aquat. Org.** 54: 195-202.
- \_\_\_\_\_ and J. D. Shields. 2005. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infection in marine crustaceans. **Dis. Aquat. Org.** 66: 47-70.

- Stevenson, J.R. 1985. Dynamic of the integument, pp. 1-42. In D.E. Bliss and L.H. Mantel, eds. **The Biology of Crustacean: Integument, Pigment, and Homoral Processes.** Academic Press, Orlando, Florida.
- Supamattaya, K., R.W. Hoffman, S. Boonyaratpalin and P. Kanchanaphum. 1994. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. **Dis. Aqua. Org.** 32: 79-85.
- Tanner, C.A., L.E. Burnett and K.G. Burnett. 2006. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. **Comp. Biochem. Phys. B** 144: 218-223.
- Taylor, D.M. and R.A. Khan. 1995. Observations on the Occurrence of *Hematodinium* sp. (Dinoflagellate: Syndinidae), the causative agent of bitter crab disease in Newfoundland snow crab (*Chionoecetes opilio*). **J. Invertebr. Pathol.** 65: 283-288.
- Taylor, A.C., R.H. Field, and P.J. Parslow-Williams. 1996. The effects of *Hematodinium* sp.-infection on aspects of the respiratory physiology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 207: 217-228.
- Thompson, F. L., B. Hoste, K. Vandemeulebroecke and J. Swings. 2003. Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 53: 1615–1617.
- Tubiash, H.S., R.K. Sizemore and R.R. Colwell. 1975. Bacteria flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: most probable numbers. **Appl. Microbiol.** 29: 388-392.
- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa, P.K. Mandal, L. Ingrosso, V. Zonno, S. Vilella and G.A. Ahearn. 2001. D-glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.** 130(A): 585-606.

- Vogan, C.L., C. Costa-Ramos and A. F. Rowley. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus*-isolation, characterization and pathogenicity of chitonolytic bacteria. **Microbiol.** 148: 743-754.
- Waterman, T.H. 1960. **The Physiology of Crustacea.** 1<sup>st</sup> Academic Press, New York and London.
- Warner, G.F. 1977. **The Biology of crabs.** Paul Elek Ltd., London.
- Weng, S.P., Z.X. Guo, J.J. Sun, S.M. Chan and J.G. He. 2007. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata* in southern China. **J. Fish Dis.** 30: 133-139.
- Wheeler, K., J. D. Shields and D. M. Taylor. 2007. Pathology of Hematodinium infections in snow crabs (*Chionoecetes opilio*) from Newfoundland, Canada. **J. Invertebr. Pathol.** 95: 93-100.
- Wilhelm, G. and E. Mialhe. 1996. Dinoflagellate infection associated with the decline of *Necora puber* crab populations in France. **Dis. Aquat. Org.** 26: 213-219.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comp. Biochem. Phys. B** 121: 169-179.



ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะขาเดินของปูทะเลปกติ (A) และปูทะเลที่มีอาการโรค-ท้องแดง (B)



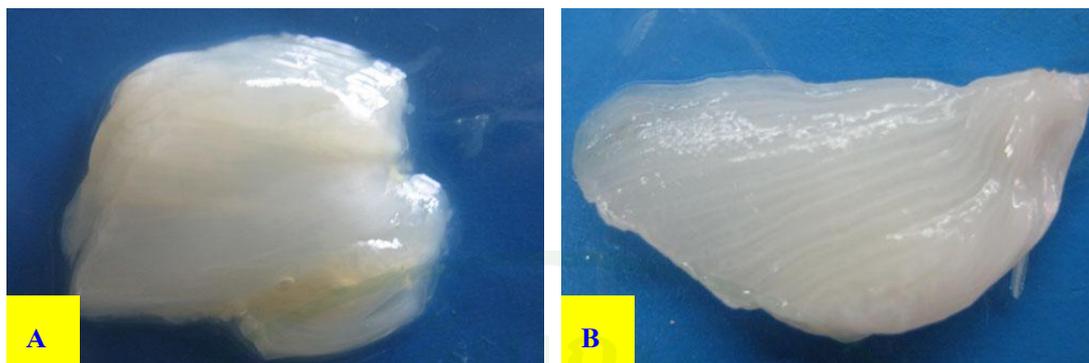
ภาพผนวกที่ 2 รอยต่อระหว่างกระดองกับจับปิ้งของปูทะเลที่มีอาการโรค-ท้องแดงในระยะลอกคราบ



ภาพผนวกที่ 3 อาการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นของปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง



ภาพผนวกที่ 4 ลักษณะกล้ามเนื้อขาเดินของปูทะเลปกติ (A) และปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง (B)



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะกล้ามเนื้อลำตัวของปูทะเลปกติ (A) และปูทะเลที่มีอาการออก-ท้องแดง (B)

## การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

#### 1.1 Tryptone Soy Agar (TSA)

Tryptone	15	กรัม
Soytone	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.3

นำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

#### 1.2 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS)

Yeast Extract	5	กรัม
Proteose Peptone	10	กรัม
Sodium Citrate	10	กรัม
Sodium Thiosulfate	10	กรัม
Oxgall	8	กรัม
Saccharose	20	กรัม
Sodium Chloride	10	กรัม
Ferric Ammonium Citrate	1	กรัม
Bromthymol Blue	0.04	กรัม
Thymol Blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้  $8.6 \pm 2$

ต้มจนเดือด โดยไม่ต้องนำไป autoclave

## 2. การเตรียมสารเคมีสำหรับย้อมแกรม

### 1.1 Crystal violet

#### สารละลาย A

Crystal violet	2 กรัม
95% ethanol	20 มิลลิลิตร

ละลายสี crystal violet ใน 95% ethanol จนสีละลายหมด

#### สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B หากมีตะกอนกรองก่อนใช้ และหากมีสีเข้มเกินไป  
เจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

### 1.2 Safranin O counterstain

Safranin O	2.5 กรัม
95% ethanol	100 มิลลิลิตร

ละลายสี safranin O ใน 95% ethanol จนสีละลายหมด

### 1.3 Gram's Iodine

Iodine	1 กรัม
Potassium Iodine	2 กรัม
น้ำกลั่น	300 มิลลิลิตร

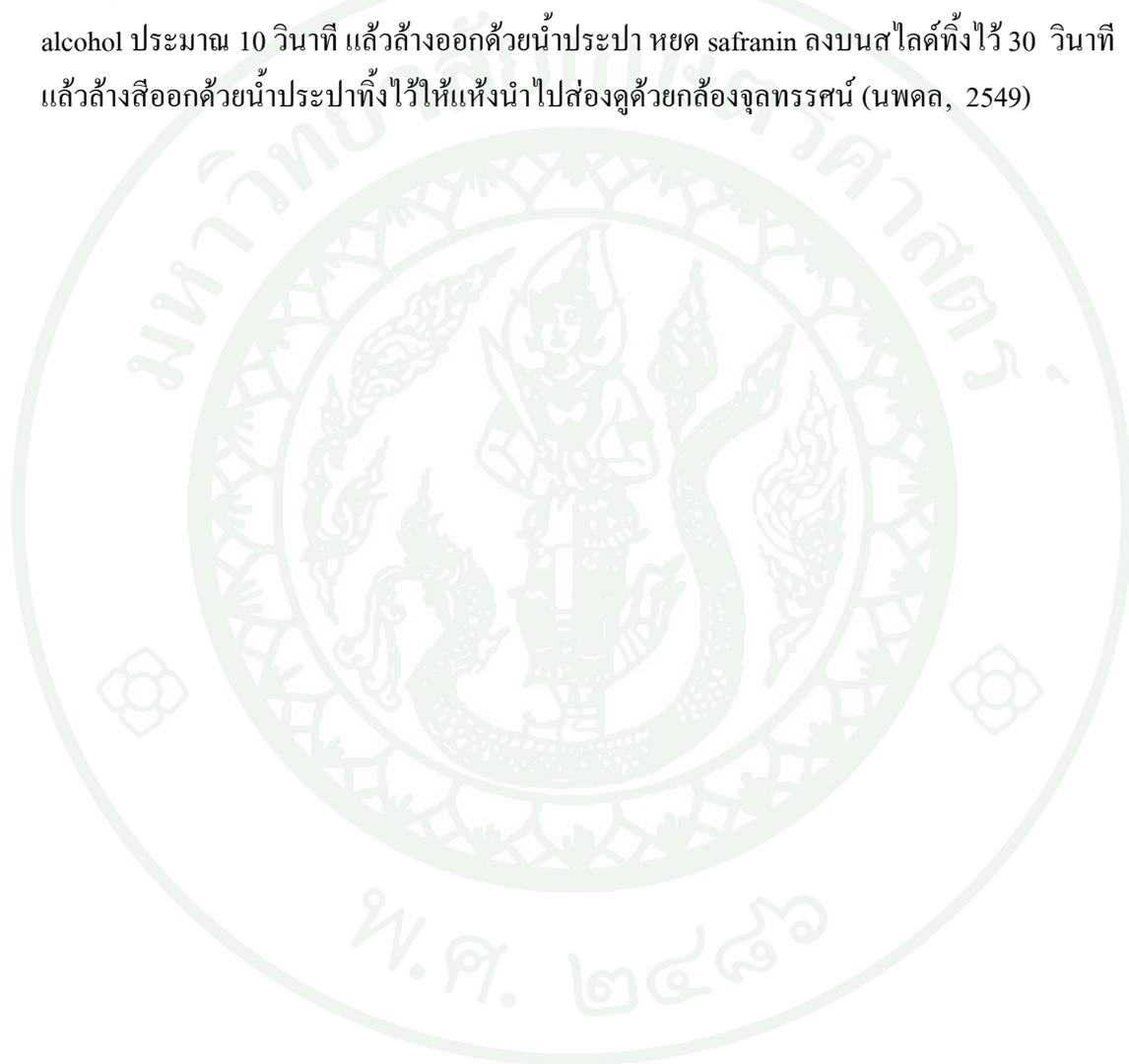
ละลาย Iodine และ Potassium Iodine ในน้ำกลั่นปริมาณน้อย ๆ ก่อนแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ แล้วเก็บในขวดสีชา

### 1.4 Decolorizer

95% ethanol	250 มิลลิลิตร
Acetone	250 มิลลิลิตร

### วิธีการย้อมแกรม

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์โดยการสเมียร์ (smear) เชื้อตัวอย่างในหยดน้ำเกลือ 0.85 % ลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วเกลี่ยให้เป็นฟิล์มบาง ๆ ทิ้งให้แห้ง fix ด้วยความร้อนโดยให้สไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยด crystal violet ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ 60 วินาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำประปา จากนั้นหยด gram's iodine ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ 60 วินาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำประปา จากนั้นล้างด้วย 95 % alcohol ประมาณ 10 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา หยด safranin ลงบนสไลด์ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำประปาทิ้งไว้ให้แห้งนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (นพดล, 2549)



## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	จิรนนท์ อินทนาคม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	29 พฤศจิกายน 2524
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์การประมง) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ - ทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์