



รายงานวิจัย

ฉบับสมบูรณ์

โครงการปลาเลี้ยงปราศจากเชื้อปรสิตในบ่อปลา
Fish cultivation free from parasitic infection in fish pond

โดย

ศมาน เทศนา และคณะ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น



รายงานวิจัย

ฉบับสมบูรณ์

โครงการปลาเลี้ยงปราศจากเชื้อปรสิตในบ่อปลา Fish cultivation free from parasitic infection in fish pond

โดย

สมาน เทศนา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ไพรัช ทาบสีแพร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประภาส โฉลกพันธุ์รัตน์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สัญญาเลขที่ DBG5080003

โครงการ : ปลาเลี้ยงปราศจากเชื้อปรสิตในบ่อปลา

รายงานฉบับสมบูรณ์

	หน้า
สารบัญ	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	4
บทนำ	6
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วัสดุและการดำเนินการทดลอง	10
ผลการทดลอง	15
วิจารณ์ผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก	34
ภาคผนวก ข	41

บทคัดย่อ

การเลี้ยงปลาตะเพียนในบ่อเลี้ยงปลาเพื่อให้ปราศจากการติดเชื้อปรสิตโดยวิธีควบคุมสิ่งแวดล้อม ในพื้นที่บ้านนาเพียง จังหวัดขอนแก่น โดยทดลองในบ่อทดลอง 2 บ่อและบ่อควบคุม 1 บ่อ และบ่อซีเมนต์ 1 บ่อ จากการสำรวจการติดเชื้อปรสิตในหอยและปลาที่เลี้ยงในบ่อปลาที่เลี้ยงแบบชาวบ้านเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน จำนวน 27 บ่อ พบหอย 16 ชนิด ปลา 14 ชนิด พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ที่สามารถติดต่อสู่คนได้ในหอย ที่หอยเป็น first and second intermediate hosts คือ หอยไซ (Bithynia siamensis goniomphalos) ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด Opisthorchis viverrini (1/1,065, 0.09%) ในบ่อ 1 บ่อและหอยขมชนิด Idiopoma umbilicata พบการติดเชื้อ Echinostoma revolutum metacercariae ใน 1 บ่อ พบการติดเชื้อในปลาชิวอ่าว (Luciosoma bleekeri) เป็นพยาธิใบไม้ชนิด Centrocestus caninus และ Haplorchis yokogawai ใน 1 บ่อ

ผลการทดลองครั้งที่ 1 พบการติดเชื้อพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด Haplorchis taichui และ H. yokogawai ในบ่อทดลองทั้งสองบ่อในปลาตะเพียน แต่ไม่พบหอย Melanoides tuberculata ในบ่อทดลองทั้งสองบ่อ จึงได้ไปสำรวจในบ่อเพาะพันธุ์ลูกปลาตะเพียนที่นำมาเลี้ยงพบหอย Melanoides tuberculata ที่เป็นโฮสต์กลางที่ 1 และสุนัขที่เป็นโฮสต์ธรรมชาติในบริเวณนั้น การเจริญเติบโตของปลาตะเพียน (Puntius gonionotus) ในบ่อทดลองที่ 1 และ 2 ปลามีขนาดลำตัวยาวขึ้น โดย Pearson Correlation ได้ค่า $r^2 = 0.71$ และ 0.69 ตามลำดับ โดยน้ำหนัก $r^2 = 0.37$ และ 0.36 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับบ่อควบคุม โดยมีความยาวและน้ำหนัก $r^2 = 0.04$ และ 0.002 ตามลำดับ

ผลการทดลองครั้งที่ 2 ใช้ขำหอยและปลาที่ตกค้างในบ่อด้วยสาร Bayluscide ในบ่อทดลองทั้งสองบ่อ ไม่พบหอยในบ่อทดลองทั้งสองบ่อตลอดการทดลอง ในการเตรียมบ่อเลี้ยงปลาเพื่อปล่อยลูกปลาตะเพียนรุ่นที่ 2 เนื่องจากการทดลองครั้งที่ 1 ปลาตะเพียนมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด Haplorchis taichui และ H. yokogawai ซึ่งเชื่อว่าการติดเชื้อตั้งแต่ฟาร์มเพาะพันธุ์ปลา จึงได้ทำการสำรวจลูกปลาตะเพียนจากฟาร์มปลาในอำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม จำนวน 4 ฟาร์ม จำนวน 1400, 1450, 2200 และ 400 ตัว ตามลำดับ พบการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด Haplorchis taichui ในฟาร์มแรก จึงได้เลือกใช้พันธุ์ปลาตะเพียนจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาที่ปราศจากการติดเชื้อปรสิตในแหล่งที่ 3 นำมาปล่อยในบ่อทดลอง 2 บ่อและบ่อควบคุม 1 บ่อ จำนวน 6000, 4000 ตัว และ 4000 ตัวตามลำดับ รวมทั้งบ่อซีเมนต์ในโรงเรือน 200 ตัว พบว่าการเจริญเติบโตของปลาตะเพียนในบ่อทดลองจะเจริญได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับบ่อควบคุมซึ่งเลี้ยงแบบธรรมชาติที่ชาวบ้านให้อาหารเป็นรำหรือผักที่เพาะปลูกเป็นครั้งคราว ในบ่อทดลองที่ 1 และ 2 ปลามีขนาดลำตัวยาวขึ้น โดย Pearson Correlation ได้ค่า $r^2 = 0.78$ และ 0.64 ตามลำดับ น้ำหนัก $r^2 = 0.64$ และ 0.41 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับบ่อควบคุม มีความยาวและน้ำหนัก

$r^2 = 0.06$ และ 0.03 ตามลำดับ แต่ยังพบการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ปลาไส้ขนาดเล็กชนิด *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* ในบ่อทดลองและบ่อควบคุมเช่นเคย แม้ว่าไม่พบหอยโฮสต์กลางที่ 1 ในบ่อทดลองทั้งสอง จึงเชื่อว่าปลาติดเชื้อตั้งแต่ลูกปลาจากฟาร์มปลา การเลี้ยงปลาในบ่อซีเมนต์ในโรงเรือน ปล่อยปลาไป 200 ตัว ขนาดเฉลี่ย น้ำหนัก 4.61 กรัม กว้าง 2.31 ซม ยาว 7.32 ซม พบว่าเหลือปลาอยู่ในบ่อ 43 ตัวปลา มีขนาดเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย น้ำหนัก 13.03 กรัม กว้าง 3.22 ซม ยาว 10.54 ซม จากการตรวจหาระยะเมตาเซอร์คาเรียโดยการย่อยด้วยน้ำย่อยเปปซิน พบระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* เหมือนในบ่อดินที่ทำการทดลองและบ่อควบคุม

การทดลองสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าหอย *B. siamensis goniomphalos* โดยใช้สาร Bayluscide ต่อโฮสต์กลางที่ 1 ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* พบว่าความเข้มข้นที่ฆ่าหอยตัวเต็มวัยและ young adult ที่อุณหภูมิห้องได้ร้อยละ 50 (LC_{50}) และร้อยละ 95 (LC_{95}) ที่ทำการวิเคราะห์ด้วย Probit Analysis program มีค่า 0.166602 และ 0.490553 และ 0.278490 และ 0.604199 มก./ล. ตามลำดับ ความเข้มข้นที่ใช้ฆ่าหอย *B. siamensis goniomphalos* ได้ผลได้นำมาทดสอบต่อการมีชีวิตรอดของสัตว์น้ำที่ไม่ใช่เป้าหมาย เช่น หอยขม (*Filopaludina martensi martensi*) ปรากฏว่าไม่มีผลการฆ่าสัตว์เหล่านี้มากนัก แต่ฆ่าปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) และปลาข้าวสารแคะ (*Oryzias mekongensis*) โดยปลาข้าวสารแคะ ตายหมดทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลองที่เวลา 24 ชม. การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหอย *B. siamensis goniomphalos* หลังจากสัมผัสสารเคมีโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบ ว่าเยื่อทางเดินอาหารมีรอยแยกกับกล้ามเนื้อ เซลล์สืบพันธุ์ฝ่อ เซลล์ของต่อมย่อยอาหารและเยื่อทางเดินอาหารบวม การทดลองสารเคมี Bayluscide ทดลองฆ่าหอยในภาคสนาม โดยทำการทดลองในบ่อน้ำสาธารณะเป็นบ่อย่ำข้างถนน 3 บ่อ ขนาดบ่อที่ 1, 2 และ 3 มีขนาดพื้นผิว 300, 110 และ 160 ตารางเมตร มีปริมาตรน้ำ 150,000; 110,000 และ 19,200 ลิตร ใส่สารให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20, 10 และ 5 มก/ลิตร ตามลำดับ ตรวจวัดการกระจายของสารหลังการใส่สารเคมีลงไปประมาณ 50 นาที สุ่มเก็บตัวอย่างหอยหลังจากประยุกต์ใส่สารเคมี 1, 7 และ 14 วัน พบว่าหอยไซ *B. siamensis goniomphalos* และหอยร่วมนิเวศอื่นๆ ตายในจำนวนที่น้อย ส่วนสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมายอื่นๆ ไม่มีการตาย เช่นปลา ลูกอ๊อด กุ้งฝอย เป็นต้นถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นของสารสูงถึง 20, 10 และ 5 เท่าของ lethal concentration ในห้องปฏิบัติการ หลังจากใส่สาร 14 วัน การสำรวจหอยพบว่าหอย *B. siamensis goniomphalos* ตาย ในบ่อที่ 1, 2 และ 3 ประมาณ 31.25, 20.00 และ 10.94% ตามลำดับ

ABSTRACT

Fish cultivation of *Puntius gonionotus* in fish ponds for free parasitic infection was done in Ban Napiang, Khon Kaen province by control of environment. The study was done in 2 experiment and 1 control ponds and experiment cement well in close building. The baseline data on parasitic infection were surveyed in snail and fish intermediate hosts in 27 fish ponds in the villages were investigated. There were 16 species of snails and 14 species of fish were collected. Parasitic infection was found in snails and was able to infect to human by using snails as first or second intermediate hosts i.e. *Bithynia siamensis goniomphalos* was infected with *Opisthorchis viverrini* in one snail (1/1,065, 0.09%) in a fish pond and infection of *Echinostoma revolutum* in *Idiopoma umbilicata* in one fish pond. In fish, *Luciosoma bleekeri* was infected with minute intestinal flukes namely *Centrocestus caninus* and *Haplorchis yokogawai* was found in one fish pond.

In the first experiment, the infection of minute intestinal flukes of *Haplorchis yokogawai* and *H. taichui* was found in *P. gonionotus* in both experiment ponds even though there was no *Melanoides tuberculata*, the first intermediate host of those flukes. But there were animal host (dogs) and snail host (*M. tuberculata*) existing in that area of fish nursery. The growth of the cyprinoid fish (*P. gonionotus*) was found greater than the fish in control fish pond (Pearson Correlation: length $r^2=0.71$ and 0.69 , weight $r^2=0.37$ and 0.36 for experiment fish pond 1 and 2, respectively, compared to control $r^2=0.04$ and 0.002 for length and weight, respectively).

Second experiment, due to the infection of minute intestinal flukes in first experiment the experiment fish ponds were applied with the molluscicide, Bayluscide for eradication of snail and fish which may miss of catching. The fish was survey for parasitic infection from 4 fish nursery farms in Kosumpisai, Maha Sarakham province, 1400, 1450, 2200 and 400 young *P. gonionotus*. The first farm was found *H. taichui* where the snail first intermediate host and natural host, dogs were available in this farm. The young *P. gonionotus* was bought from the third farm for cultivation. However after cultivation for few months the infection of *H. taichui* and *H. pumilio* were found in three of ponds. No snail intermediate host still found in those ponds. The infection should be occurred in young fish. The growth of fish in experiment ponds were greater than the control which rearing given rice bran by villagers. In experiment pond 1 and 2 the growth in length $r^2=0.78$ and 0.64 , weight $r^2=0.64$ and 0.41 , respectively and length and weight of the control $r^2=0.06$ and 0.03 , respectively. The fish in cement well was also found infected with *H. taichui* and *H. pumilio*. Only 43 (from 200 young fish released) *P. gonionotus* were found and their growth increasing in length from

7.32 to 10.54 cm, in width from 2.31 to 3.22 cm and in weight from 4.61 to 13.03 gm for 8 months.

Molluscicide, namely Bayluscide was tested to, *B. siamensis goniomphalos*, the first intermediate host of *O. viverrini* for young and adult stages for lethal concentration of 50% (LC50) and 95% (LC95). The lethal effects were analyzed by Probit Analysis program, LC50 and LC95 of adult and young snails were 0.166602 and 0.490553, 0.278490 and 0.604199 mg/l, respectively. The lethal concentration for *B. siamensis goniomphalos* was tested to non-target animals such as *Filopaludina martensi martensi*, guppy fish (*Poecilia reticulata*) and *Oryzias mekongensis*. No serious lethal effect to *F. martensi martensi* but high lethal effect to guppy fish (*Poecilia reticulata*) and *Oryzias mekongensis* for 24 hours testing period. Bayluscide caused tissue changed in *B. siamensis goniomphalos* such as separation of epithelial layer to muscle, degeneration of reproductive cells and swelling of digestive glands and epithelial lining of digestive system. Bayluscide was tested also in the field in 3 roadside ditches. The snail collection was done before and after application 1, 7 and 14 days for comparison. The surface areas of the 3 ditches were 300, 110 and 160 sq.m contained water approximately 150,000; 110,000 and 19,200 L. The chemical was applied to final concentration as 20, 10 and 5 mg/L, respectively and measured the concentration after 50 min of application. The non-target snails died with small number and no effect to other animals was detected such as tadepole, fish, shrimps etc. even though the concentrations used was up to 20 folds of laboratory lethal concentration. After 14 days application *B. siamensis goniomphalos* in fish pond 1, 2 and 3 had percentage of mortality as 31.25, 20.00 and 10.94%, respectively.

บทนำ

วัฒนธรรมการบริโภคอาหารมีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคและท้องถิ่น ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือหรือภาคอีสาน มีอาหารพื้นบ้านที่เป็นเอกลักษณ์อย่างหนึ่งของคนอีสานคืออาหารพวกก้อย ลาบ กู๋ โดยอาหารเหล่านี้ทำจากเนื้อสัตว์ดิบๆ นอกจากนี้ยังมีการถนอมอาหารเพื่อเก็บไว้รับประทานได้นานๆ เช่น หม่ำ ส้ม ไล่กรอก ปลาแร่ เป็นต้น ส่วนอาหารดิบที่เป็นที่นิยมที่ทำจากปลาดิบก็มีหลายชนิดเช่นกัน เช่น ก้อยปลา ลาบปลา หม่ำปลา ส่วนการถนอมอาหารที่ทำจากปลาเช่น ปลาส้ม จ่อม ปลาน้อย ปลาแร่ เป็นต้น เนื่องจากปลาเป็นแหล่งโปรตีนเนื้อสัตว์ที่หาได้ง่ายจากแหล่งน้ำธรรมชาติและราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ แต่อาหารการกินเหล่านี้นำมาซึ่งการติดเชื้อโรคปรสิตหลายชนิด ถ้าไม่ปรุงสุก เช่น โรคพยาธิใบไม้ตับ ชนิด *Opisthorchis viverrini* ซึ่งพบระบาดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Jongsuksantigul et al., 1992) ผู้ติดเชื้อพยาธิส่วนใหญ่จะไม่มีอาการเนื่องจากติดเชื้อพยาธิจำนวนน้อย แต่พยาธิจะมีการสะสมจากการติดเชื้อพยาธิเพิ่มขึ้นจากการกินปลาดิบอยู่เป็นประจำ เมื่อมีพยาธิจำนวนมากขึ้นผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการแสดง เช่น ท้องอืด ท้องเฟ้อ อาหารไม่ย่อย และที่สำคัญคือเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) ซึ่งพบอุบัติการณ์ (incidence) สูงที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และสูงที่สุดในโลก สูงถึง 84.6 ในผู้ชายและ 36.8 ในผู้หญิงต่อประชากร 100,000 (Vatanasapt et al., 1990, 1993; Sriamporn et al., 2004) มะเร็งท่อน้ำดีนี้ ทำให้เกิดการสูญเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว หลังจากทราบผลเพียง 3-6 เดือน ถ้าทำการผ่าตัดและรักษาตามอาการ มะเร็งท่อน้ำดีนี้พบอุบัติการณ์สูงในกลุ่มคนที่มีอายุระหว่าง 40-45 ปี ซึ่งเป็นกลุ่มคนที่เป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศ (Elkins et al., 1990; Haswell-Elkins et al., 1992) ถึงแม้ปัจจุบันมียา praziquantel ที่ใช้รักษาโรคพยาธิชนิดนี้ได้ผลดีถึง 100 % ถ้าให้ขนาด 25 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. t.i.d. ใน 1 วันหรือ ถ้าให้ขนาด 40 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ครั้งเดียว ให้ผลการรักษา 91 % (Bunnag et al., 1984) แต่หลังจากรับประทานยาถ่ายพยาธิเพียง 1-2 ปี ก็กลับมาติดเชื้อพยาธิใหม่ดังเดิม (Upatham et al., 1988) ทำให้ต้องใส่ใจในการรักษาบ่อยๆ ทำให้เกิดผลตามมาคือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการหลั่งสารไนโตรออกไซด์มากขึ้น เกิดการเปลี่ยนแปลงเงินของเยื่อบุท่อน้ำดีและเกิดเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (Tesana et al., 2000; Pinlaor et al., 2004) ถึงแม้จะมียาถ่ายพยาธิที่ให้ผลการรักษาที่ดี และมีโครงการรณรงค์เกี่ยวกับโรคพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ รวมทั้งการควบคุมในรูปแบบต่างๆ (Saowakontha et al., 1993) มาอย่างต่อเนื่อง แต่โรคพยาธิชนิดนี้ก็กลับไม่ได้ลดลงจนหมดไป จากการรายงานของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าในปี 2527 และ 2530 มีอัตราการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับประมาณ 63.6% แต่ในปี 2531 อัตราการติดเชื้อลดลงมาที่ 35.6% จากการรณรงค์ตั้งแต่ปี 2532 จนถึง 2544 อัตราการติดเชื้อลดลงมาอยู่ที่ 9.4% (Jongsuksantigul & Imsomboon, 2003) ก็ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อพยาธิชนิดนี้ได้ ฉะนั้นการรักษาด้วยยาจึงไม่ใช่วิถีทางที่ดีในการกำจัดเชื้อพยาธิ การทำให้ปลาปราศจากเชื้อพยาธิจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด และยั่งยืน

นอกจากนี้ยังพบเชื้อปรสิตอีกหลายชนิดที่ติดต่อการกินปลาดิบเช่น พยาธิตัวจิ๋ว (*Gnathostoma spinigerum*) ซึ่งเป็นพยาธิตัวกลมที่มีตัวเต็มวัยอาศัยในกระเพาะสุนัข ระยะติดต่อระยะที่ 3 อยู่ในปลาหลายชนิดรวมทั้งสัตว์ที่เป็น paratenic host อื่นๆ ตัวอ่อนระยะที่ 3 เมื่อเข้าสู่คนจะไชไปอย่างไร้ทิศทาง แต่มักพบไชอยู่ใต้ผิวหนัง ทำให้เกิดอาการบวมแดงเคลื่อนที่อยู่ที่ผิวหนัง (migratory swelling) ทำให้เจ็บคันตามแนวที่พยาธิไชผ่าน ถ้าไชเข้าสู่ลูกตาทำให้ปวดตาและอาจทำให้ตาบอดได้ ถ้าไชเข้าสู่สมองอาจทำให้เลือดออกในสมองทำให้ปวดหัวรุนแรง เป็นอัมพาต หรือเสียชีวิตได้ อีกชนิดหนึ่งที่ติดเชื่อจากการรับประทานปลาดิบคือ โรคพยาธิตัวกลม intestinal capillariasis เกิดจากพยาธิตัวกลม *Capillaria philippinensis* ระยะติดต่อพบในระบบทางเดินอาหารของปลาทั้งจากการทดลองและปลาจากธรรมชาติในประเทศฟิลิปปินส์ (Cross, Basaca-Sevilla, 1991) พบว่านกกินปลาชนิด *Amaurornis phoenicurus* และ *Ardeola bacchus* ที่ป้อนเชื้อระยะติดต่อสามารถติดเชื่อปรสิตชนิดนี้ได้ (Bhaibulaya, Indra-Ngarm, 1979) ในประเทศไทยมีการระบาดของพยาธิชนิดนี้ประปราย กระจายเกือบทั่วประเทศโดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พยาธิตัวกลมชนิดนี้อาศัยอยู่ในชั้น mucosa ของลำไส้เล็กส่วนต้นของคน ทำลาย villi ของลำไส้ให้หดสั้นลงและทำลายผนังเซลล์ของลำไส้ ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง และเรื้อรัง เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้ การเลี้ยงปลาในบ่อในต่างประเทศที่มีรายงาน พบว่าปลาไหล (Japanese eel, *Anguilla japonica*) ในบ่อเลี้ยงในประเทศไต้หวันพบการติดเชื่อปรสิตชนิด heterophyid metacercariae (Ooi et al., 1999) 50 ถึง 3762 metacercariae และผู้วิจัยได้ทำการป้อนเข้าสู่สัตว์ทดลองพบว่าเป็นพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กในกลุ่ม heterophyid ส่วนการศึกษาการติดเชื่อปรสิตในปลาในบ่อเลี้ยงปลาในประเทศไทย ยังไม่มีการศึกษามาก่อน พยาธิอีกชนิดหนึ่งที่พบได้ในปลาคือ sparganosis ถึงแม้จะไม่พบบ่อยในปลาแต่ก็สามารถพบการติดเชื่อในปลาได้

จากประสบการณ์ที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและพบเห็นความเป็นอยู่ของชาวบ้าน พบว่าการให้ลูกศึกษานั้นไม่ประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรคพยาธิชนิดนี้ เพราะชาวบ้านยังคิดในรสชาติอาหารดิบหรืออาหารหมักดองดิบเช่น ก้อย ปลาข้าวดิบใส่ส้มตำ แก้วบองปลาข้าวดิบ หม่ำปลา จ่อมปลาน้อย ส้มปลาคือเป็นต้น อาหารเหล่านี้เมื่อปรุงสุกจะทำให้รสชาติเปลี่ยนไป ที่สำคัญนักการสาธารณสุขเองที่ออกไปให้ลูกศึกษาชาวบ้านก็ยังรับประทานอาหารเหล่านี้ดิบๆ หรือตรวจพบการติดเชื่อพยาธิเสียเอง การรณรงค์ไม่กินอาหารดิบจึงไม่ประสบผลสำเร็จ แม้แต่ประเทศที่เจริญแล้วเช่น ญี่ปุ่น ฝรั่งเศส อิตาลี เป็นต้น ก็ยังมีผู้คนที่ยังนิยมชมชอบรับประทาน อาหารที่ทำจากเนื้อ และปลาดิบ และอาหารปลาดิบแบบญี่ปุ่นนี้ได้แพร่หลายไปทั่วโลก จนขณะนี้ ภัตตราคารญี่ปุ่นที่ขายอาหาร ซาชิมิและซูชิ มีอยู่ทั่วไปรวมทั้งในประเทศไทยด้วย ฉะนั้นจึงเป็นการยากที่จะห้ามหรือชักชวนให้คนเลิกรับประทานปลาดิบ ควรจะทำให้ปลาไม่ติดเชื่อพยาธิและปลอดภัยจากการรับประทานมากกว่าการห้ามรับประทาน

ปัจจุบันอาหารปลอดภัย เป็นสิ่งสำคัญในการทำให้ประชาชนของประเทศนั้นๆ มีสุขภาพดีมีขีดความสามารถแข่งขันกับประเทศอื่นๆ ได้ ถ้าผู้คนยังมีโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคปรสิตซึ่งมักไม่ค่อยแสดงอาการให้เห็นเด่นชัด แต่จะทำลายสุขภาพ ร่างกายไม่แข็งแรง ศักยภาพในการแข่งขันกับประชาชน

ของชาติอื่นๆ ข่มลค่น้อยดอยลง นอกจากนี้อาหารที่ปลอดภัยจากการติดเชื้อโรคยังสามารถส่งออกไปขายต่างประเทศทั้งในรูปของปลาสดและแปรรูป โดยไม่มีสาเหตุที่จะมีการกีดกันทางการค้าและเป็นที่ยอมรับได้ในทุกๆ ประเทศ อันจะนำเงินตราต่างประเทศเข้ามาพัฒนาประเทศต่อไป การศึกษาครั้งนี้เป็นการจัดการสิ่งแวดล้อมครั้งแรกที่ป้องกันการติดเชื้อปรสิตในปลาน้ำจืด และด้วยเทคโนโลยีและความรู้ที่มีอยู่สามารถที่จะทำได้ จะเป็นแบบอย่างการจัดการสิ่งแวดล้อมเพื่อป้องกันการติดเชื้ออื่นๆ ในปลา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สำรวจการติดเชื้อปรสิตในหอยและปลาในบ่อเลี้ยงปลาที่มีอยู่ในหมู่บ้านที่ทำการศึกษเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน ถึงการติดเชื้อปรสิตที่มีอยู่ในถิ่นที่ทำการศึกษา
2. จัดการสิ่งแวดล้อมของบ่อเลี้ยงปลาในบ่อปิดและบ่อซีเมนต์ในโรงเรียนให้ปราศจากเชื้อปรสิต และศึกษาการเจริญเติบโตของปลา ในสภาพจัดการสิ่งแวดล้อม
3. ทดสอบสารเคมี Bayluscide มาหอย *Bithynia siamensis goniomphalos* ในห้องทดลองและในบ่อน้ำในธรรมชาติ และผลของสารต่อสัตว์น้ำอื่นๆ ที่ไม่ใช่สัตว์เป้าหมาย

ผลพลอยได้

วิธีการเลี้ยงปลาที่ปราศจากเชื้อปรสิต ถ้าได้ผลตามวัตถุประสงค์ จะนำไปเผยแพร่เพื่อให้ประชาชนได้เรียนรู้และทำตามได้ และทางกลุ่มผู้วิจัยจะออกไปดูแลแนะนำและออกเป็นใบประกาศนียบัตรรับรองคุณภาพ เมื่อการทดลองได้ผลตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

ปลาน้ำจืดเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญของคนไทยในชนบท และมีการเก็บรักษาหรือถนอมอาหารในรูปแบบต่างๆ กันหลายชนิด ซึ่งมีการถ่ายทอดวิธีการทำกันมาช้านาน เช่น ปลาร้า (ปลาแดก) ปลาจ่อม (หรือจ่อมปลาน้อย) ปลาต้ม ส้มผัก ปลาเผา เป็นต้น ปลาหมักดองเหล่านี้ในบางพื้นที่ก็นำมาปรุงอาหาร โดยไม่ได้ทำให้สุก เช่น ใส่ในส้มตำ แจ่วบอง ปลาร้าบอง น้ำพริกปลาร้า หรือรับประทานโดยตรงโดยไม่ได้ปรุงกับเครื่องปรุงอื่นๆ เช่น ปลาต้ม ปลาจ่อม ซึ่งปลาหมักเหล่านี้เชื้อปรสิตมักจะยังมีชีวิตอยู่ได้ แม้จะเหลือรอดน้อยลง เช่นในปลาร้า แต่ก็ยังพบว่าระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับชนิด *O. viverrini* ยังมีชีวิตอยู่ได้ (Tesana et al., 1986) ส่วนปลาหมักดองชนิดอื่นๆ ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการอยู่รอดของเชื้อปรสิต ซึ่งควรจะได้ทำการศึกษาต่อไป

ปลาน้ำจืดเป็นโฮสต์กลางของเชื้อปรสิตได้หลายชนิด ทั้งพยาธิใบไม้และพยาธิตัวกลม รวมทั้งพยาธิตัวติดด้วย ที่มีความสำคัญต่อคนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ พยาธิใบไม้ตับชนิด *O. viverrini* ซึ่งพบระยะติดต่อ (metacercaria) ในปลาวงศ์ปลาตะเพียนในหลายชนิดเช่น ปลาขาวน้อย (*Cyclohelictys armatus*) ปลาขานา (*C. apogon*) ปลาขามน (*Puntius leiacanthus*) ปลา

แก้มซ้ำ (*P. orphoides*) ปลากระสูบจุด (*Hampala dispar*) (Vichasri et al., 1982; Tesana et al., 1985) เป็นต้น ซึ่งปลาเหล่านี้แพร่พันธุ์ได้เร็วและพบอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ในปลาน้ำจืดนอกจากพยาธิใบไม้ดับแล้วยังมีพยาธิใบไม้ล่าไส้อีกหลายชนิดที่ติดเชื้อจากปลาคือ พยาธิใบไม้ล่าไส้ในกลุ่ม Heterophyiidae พบหลาย species ในประเทศไทยเช่น *Haplorchis taichui*, *H. pumilio*, *H. yokogawai* นอกจากนี้ยังพบ *Centrocestus caninus*, *Stellantchasmus falcatus* (Radomyos et al., 1994, 1998) และ *Episthmium caninum* (Radomyos et al., 1985) ส่วนพยาธิตัวกลมที่พบในปลาน้ำจืดเช่น พยาธิตัวจิ๊ด (*Gnathostoma spinigerum*), *Capillaria philippinensis* และพยาธิตัวดัดที่ทำให้เกิดโรค sparganosis

พยาธิใบไม้ดังที่กล่าวข้างต้นต้องการหอยน้ำจืดที่เป็น first intermediate host เพื่อเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ แล้วจึงไขเข้าสู่ปลาที่เป็น second intermediate host ส่วนพยาธิตัวจิ๊ดต้องการไรน้ำเป็นโฮสต์กลางตัวแรก ก่อนเจริญเติบโตเป็นระยะติดต่อในปลา ฉะนั้นการป้องกันการติดเชื้อในปลาจึงสามารถทำได้ถ้าป้องกันไม่ให้หอย first intermediate host หรือป้องกันการปนเปื้อนอุจจาระของ definitive host ลงสู่บ่อปลา ถ้ายังมีหอยหลุดรอดลงไปในบ่อปลา อาจใช้สารเคมี bayluscide ฆ่าหอย (de Souza & Paulini, 1967)

ปลาเป็นอาหารของชาวชนบทที่หาได้ง่ายในแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่ในสถานการณ์ปัจจุบัน ปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติมีน้อยลง และปลาที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติยังติดเชื้อปรสิตหลายชนิด ซึ่งไม่ปลอดภัยถ้านำมารับประทานดิบๆ เช่นพยาธิใบไม้ดับ พยาธิใบไม้ล่าไส้ขนาดเล็ก รวมทั้งพยาธิตัวกลม เช่นพยาธิตัวจิ๊ดดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากการที่ปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติลดน้อยลง จึงได้มีการเลี้ยงปลากันมากขึ้นเพื่อการค้า มีทั้งการเลี้ยงแบบกระชังปลา บ่อปลา ซึ่งการเลี้ยงปลาในบ่อปลาจะปล่อยพันธุ์ปลาชนิดต่างๆกัน แล้วแต่ความนิยมของชาวบ้าน แต่ปลาที่นิยมเลี้ยงชนิดหนึ่งคือปลาตะเพียนซึ่งโตเร็ว และชาวบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมนำมาทำก้อยปลาอันเป็นอาหารที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ดับชนิด *O. viverrini* ที่ทำให้เกิดโรคตับเช่น ท่อน้ำดีและถุงน้ำดีอักเสบ นิ่วในถุงน้ำดี คีซ่าน และเป็นสาเหตุสำคัญของมะเร็งท่อน้ำดี

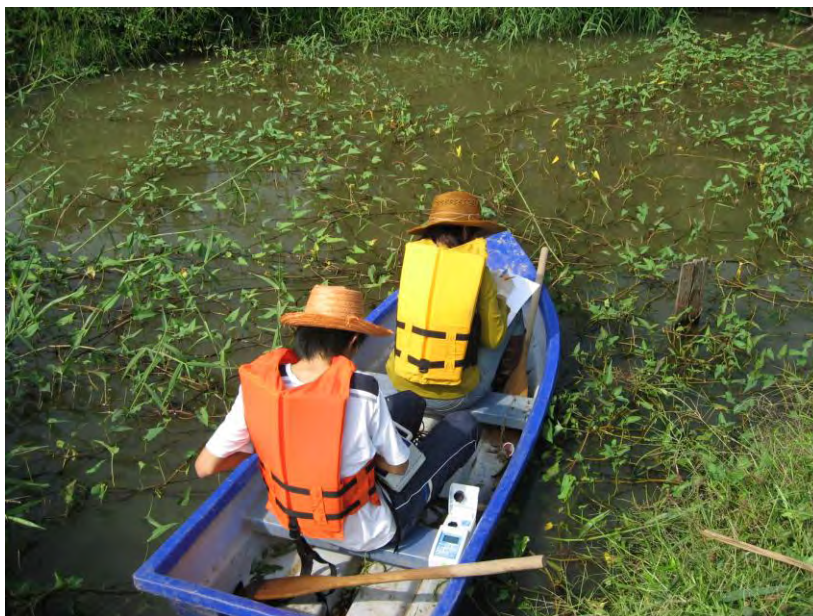
ในประเทศที่เจริญแล้วเช่นประเทศญี่ปุ่นซึ่งนิยมรับประทานปลาดิบเช่นกัน ถึงแม้จะเป็นปลาทะเลเป็นส่วนใหญ่แต่ก็ยังพบการติดเชื้อพยาธิตัวกลมชนิด *Anisakis* sp. ซึ่งมีรายงานการติดเชื้ออยู่บ่อยๆ ฉะนั้นการที่เป็นประเทศที่พัฒนาแล้วไม่ได้ทำให้การรับประทานปลาดิบเปลี่ยนไป กลับนำไปเผยแพร่ยังประเทศอื่นๆอีกด้วย

วัสดุและการดำเนินการทดลอง

การสำรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในหอยและปลาในบ่อปลาในหมู่บ้านที่ทำการทดลอง

บ้านนาเพียงเป็นหมู่บ้านที่ตั้งอยู่ในอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ห่างจากตัวเมืองขอนแก่น ประมาณ 10 กม. ไปทางทิศตะวันออกเฉียงเหนืออยู่บนฝั่งขวาของแม่น้ำพองและอยู่ในเขตชลประทาน ทำนาได้ปีละ 2 ครั้ง หมู่บ้านนี้ส่วนใหญ่ทำการเกษตร ปลูกข้าวและปลูกผักกูดขาย โดยเฉพาะกูดขายขาว จึงมีบ่อที่จะนำน้ำมาใช้รดผักและล้างผัก บ่อน้ำเหล่านี้จึงได้นำมาเลี้ยงปลาด้วย

การสำรวจหอยในบ่อเลี้ยงปลา ที่อยู่ในบริเวณหมู่บ้านของบ้านนาเพียง อำเภอเมือง ขอนแก่น ทั้งหมด 27 บ่อ (ภาพที่ 1) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานการติดเชื้อปรสิตทั้งในปลาและหอย



ภาพที่ 1 การสำรวจหอยและปลาในบ่อปลาที่เลี้ยงแบบชาวบ้าน

การสำรวจหอยจะทำการเก็บตัวอย่างหอยในบ่อเลี้ยงปลาของชาวบ้านที่ยินยอมให้ลงเก็บหอย และจับปลาได้ การเก็บตัวอย่างหอยจะทำการเก็บหอยทุกชนิดที่พบในบ่อที่ทำการสำรวจ นำกลับไปจำแนกชนิด วัดขนาด ชั่งน้ำหนัก ตรวจการติดเชื้อพยาธิใบไม้ด้วยวิธี cercarial shedding และย่อยด้วย pepsin A 0.25 % แล้วจึงตรวจหาเชื้อปรสิตภายใต้กล้องสามมิติ

การสำรวจการติดเชื้อในลูกปลาตะเพียนจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลา

ได้ทำการสำรวจลูกพันธุ์ปลาจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนในอำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคามจำนวน 4 ฟาร์ม จำนวนลูกปลาตะเพียน 1400, 1450, 2200 และ 400 ตัว ตามลำดับ โดยการย่อยด้วย pepsin A 0.25 %

การปรับปรุงสิ่งแวดล้อมบ่อปลา

ทำการคัดเลือกบ่อปลาที่จะใช้ทำการทดลอง 2 บ่อและบ่อควบคุม 1 บ่อ ขนาดเนื้อที่บ่อประมาณ 400, 900 และ 200 ตารางเมตรตามลำดับ และได้ทำสัญญาการใช้บ่อปลา ทำการสูบน้ำออกจากบ่อทดลองทั้งสองบ่อ ตากบ่อให้แห้ง ทำการขุดลอกบ่อปลา เสริมคันบ่อ ทำรั้วและทำบ่อกรองน้ำ (ภาพที่ 2)



ก

ข



ค

ภาพที่ 2 ภาพบ่อปลาทดลองก่อนจัดการสิ่งแวดล้อม (ก) และหลังจากการจัดการสิ่งแวดล้อมโดยการล้อมรั้วตั้งกระติ๊บและขุดลอก กรองน้ำด้วยบ่อทรายกรอง (ค) โดยทรายจะอยู่ระหว่างท่อเล็กกับท่อใหญ่ น้ำที่จะกรองจะเข้าไปในท่อเล็ก แล้วผ่านทรายกรอง ออกไปจากท่อใหญ่ลงสู่บ่อเลี้ยงปลา

การปล่อยลูกปลาตะเพียนครั้งที่ 1

บ่อทดลองที่ 1 ปล่อยลูกปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*) ลงในบ่อทดลองที่ปรับปรุงสิ่งแวดล้อม (ภาพที่ 2) เมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2550 จำนวน 9,000 ตัว ในพันธุ์ปลาตรวจไม่พบการติดเชื้อปรสิตจากการสุ่มปลามาตรวจ ทั้งหมด 743 ตัว (8.2 %) **บ่อทดลองที่ 2** จำนวน 6,300 ตัว สุ่มปลามาตรวจ 520 ตัว (8.25 %) ไม่พบการติดเชื้อปรสิต **บ่อควบคุม** ปล่อยลูกปลาตะเพียน 4,000 ตัว ตรวจไม่พบการติดเชื้อปรสิตทั้งการสุ่มตัวอย่างครั้งแรก 102 ตัว

การปล่อยลูกปลาตะเพียนครั้งที่ 2

บ่อทดลองที่ 1 และ 2 ได้ทำการสูบน้ำออกจากบ่อ ตากแห้ง ปรับปรุงคันบ่อ และเมื่อปล่อยน้ำเข้าบ่อก็จะมีหอยและปลาที่ยังหลงเหลือในบ่อโดยเฉพาะปลาช่อน ซึ่งสามารถมีชีวิตโดยการหมกอยู่ในโคลนได้เป็นเวลานาน และหอยบางชนิดที่สามารถอยู่ในโคลนได้เช่นกันเช่นหอยขม หอยโข่ง รวมทั้งหอยไซ (*Bithynia* sp.) เมื่อมีน้ำเข้าไปใหม่ก็จะออกมาอยู่ในน้ำใหม่ จึงต้องกำจัดหอยและปลาเหล่านี้ด้วยสาร Bayluscide ซึ่งเป็นสารที่สลายได้ง่ายเมื่อถูกแสงแดด หลังจากนั้นจะปล่อยให้สารสลายตัวประมาณ 2 สัปดาห์ จึงปล่อยลูกปลาตะเพียนโดยปล่อยลูกปลาตะเพียนในจำนวนดังนี้ บ่อที่ 1, 2 และบ่อควบคุม จำนวน 6000, 4000 ตัว และ 4000 ตัวตามลำดับ และบ่อซีเมนต์ในโรงเรือน 200 ตัว

การสุ่มตัวอย่างปลาตะเพียนเพื่อตรวจหาการติดเชื้อพยาธิและวัดการเจริญเติบโต

ทำการสุ่มจับปลาจากบ่อทดลองทั้งสองบ่อและบ่อควบคุม โดยใช้ตาข่ายแห สุ่มจับปลาตะเพียนมาบ่อละประมาณ 50 ตัว ต่อครั้งต่อเดือน วัดขนาดความยาว ความกว้าง และชั่งน้ำหนักปลาแต่ละตัว แล้วจึงนำไปย่อยด้วยน้ำย่อย pepsin A 0.25% เพื่อหาระยะติดต่อ เมตาเซอร์คาเรียต่อไปและจำแนกชนิดต่อไป การเจริญเติบโตของปลาตะเพียนจะนำข้อมูลของความยาว ความกว้างและน้ำหนักไปทดสอบหาความสัมพันธ์กับเวลา (Correlation)

การทดสอบสารฆ่าหอย Bayluscide

ทดสอบสาร Bayluscide (niclosamide) ในการฆ่าหอย *B. siamensis goniomphalos* ในห้องทดลองและในภาคสนามที่ความเข้มข้นต่างกัน รวมทั้งสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์ที่ไม่ใช่จุดหมายเช่น ปลา หอยร่วมนิเวศน์ กุ้งฝอย เป็นต้น

การทดลองในห้องปฏิบัติการ

1) การทดลองผลของ Bayluscide เบื้องต้น

การทดลองขั้นต้น โดยทดสอบสาร Bayluscide ในระดับความเข้มข้นที่ 0, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 ppm หอยไซ *B. siamensis goniomphalos* ที่นำมาใช้ทดลองจะทำการตรวจหาการติดเชื้อพยาธิใบไม้โดย cercarial shedding 3 ครั้ง ใน 1 เดือน แบ่งหอยออกเป็น

- เพศเมีย แบ่ง 2 ขนาด คือ Medium = 0.5-0.8 cm, Large = 0.9-1.2 cm
- เพศผู้ แบ่ง 2 ขนาด คือ Medium = 0.5-0.8 cm, Large = 0.9-1.2 cm

ใช้หอย *B. siamensis goniomphalos* 10 ตัว/ซ้ำ/เพศ/ขนาด

2) การทดลองผลของ Bayluscide แบบ definitive

ทดสอบสาร Bayluscide ที่ความเข้มข้นที่ 0 (control), 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.625, 0.75, 0.875, 1 ppm โดยทดสอบกับหอย *B. siamensis goniomphalos*

- เพศเมีย แบ่ง 2 ขนาด คือ Medium = 0.5-0.8 cm, Large = 0.9-1.2 cm
- เพศผู้ แบ่ง 2 ขนาด คือ Medium = 0.5-0.8 cm, Large = 0.9-1.2 cm

ใช้หอย *B. siamensis goniomphalos* 10 ตัว/ซ้ำ/เพศ/ขนาด

3) การทดลองผลของ Bayluscide กับหอยและสัตว์ร่วมนิเวศน์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย

เช่น หอยขม (*Filopaludina martensi martensi*) ปลาซิวอ่าว (*Luciosoma bleekeri*) ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) ด้วยความเข้มข้น Bayluscide ที่ 0, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 ppm

4) การทดลองในภาคสนาม ทำการสำรวจและเลือกบ่อ จากแหล่งน้ำสาธารณะข้างถนน ที่พบว่ามีหอยชนิด *B. siamensis goniomphalos* ที่มีความหนาแน่นพอสมควร ขนาดไม่ใหญ่มากนัก พอที่จะทำให้สารละลาย Bayluscide ที่ใส่ลงไป ไม่ต้องใช้ปริมาณมากเกินไปหรือรบกวนแหล่งน้ำของชาวบ้านที่ใช้อุปโภคบริโภค หรือบ่อที่ชาวบ้านใช้เลี้ยงปลา บ่อที่เลือกได้ จะทำการสูบน้ำอย่างหอย *B. siamensis goniomphalos* เพื่อหาความหนาแน่น วัดขนาด ความลึก ที่จะคำนวณปริมาตรน้ำทั้งหมดในบ่อ เพื่อคำนวณปริมาณสารที่จะใช้ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ บ่อน้ำที่เลือกทำการทดลอง บ่อที่ 1, 2 และ 3 มีขนาดพื้นผิว 300, 110 และ 160 ตารางเมตร มีปริมาตรน้ำ 150,000; 110,000 และ 19,200 ลิตร ใส่สารให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20, 10 และ 5 มก/ลิตร ตามลำดับ ทำการสูบน้ำตรวจสอบผลกระทบต่อหอยและสัตว์น้ำอื่นๆ ในวันรุ่งขึ้นและหลังจากใส่สาร 7, 14 วัน

การสำรวจวัดคุณภาพน้ำในบ่อปลา

การวัดคุณภาพน้ำ จะทำการวัดทุกครั้งที่ได้ไปทำการสูบน้ำอย่างปลาในทุกๆ เดือน โดยวัดค่า pH, conductivity, ออกซิเจนละลายน้ำ ความเค็ม อุณหภูมิ ด้วยเครื่อง Portable electrochemical analyzer (model TPS 90-FL, Australia), ค่าความขุ่นด้วยเครื่อง turbidimeter (HACH model 2100P, USA)

การเลี้ยงปลาในบ่อซีเมนต์ในโรงเรือน

ทำบ่อซีเมนต์ในโรงเรือนที่มีหลังคา กระเบื้อง ทึบสลับกับกระเบื้องใสและปิดล้อมโดยรอบด้วยมุ้งลวด ขนาดบ่อกว้างประมาณ 20 ตารางเมตร กั้นบ่อด้วยดิน ให้อาหารเป็นอาหารเม็ดแบบลอยน้ำเหมือนบ่อดิน และให้สาหร่ายสีเขียว สุ่มวัดขนาดลูกปลาตะเพียนประมาณ 100 ตัวจากในกลุ่มเดียวกับลูกปลาที่ปล่อยลงเลี้ยง และหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองจะวัดขนาด น้ำหนักปลาทุกตัว

ผลการทดลอง

ผลการสำรวจหอยและปลาในบ่อปลาในหมู่บ้าน

พบหอยในบ่อเลี้ยงปลาทั้งหมด 16 species/subspecies คือ 1. *Bithynia (Digoniostoma) siamensis goniomphalos*, 2. *Clea (Anentome) helena*, 3. *Filopaludina (Siamopaludina) martensi cambodjensis*, 4. *F. (S.) martensi martensi*, 5. *F. (S.) martensi munensis*, 6. *F. (Filopaludina) sumatrensis polygramma*, 7. *Idiopoma umbilicata*, 8. *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa*, 9. *Melanoides tuberculata*, 10. *Pomacea canaliclata*, 11. *Trochotaia trochoides*, 12. *Wattebledia siamensis*, 13. *P. pesmei*, 14. *F. sumatrensis spiceosa*, 15. *Physa* 16. *Segmentina* (ตารางที่ 1)

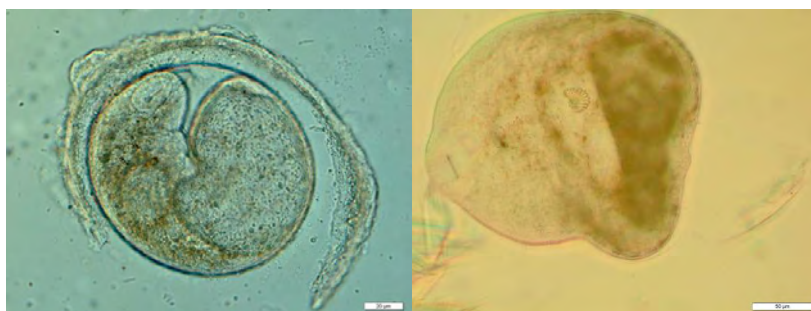
ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนหอยที่สำรวจพบในบ่อเลี้ยงปลา และอัตราการติดเชื้อปรสิต โดยวิธี cercarial shedding บ้านนาเพิง อำเภอเมือง ขอนแก่น

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่สำรวจ	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ
1.	<i>B. siamensis goniomphalos</i>	หอยไซ	3,216	1.69-25.00
2.	<i>Clea helena</i>	-	85	-
3.	<i>F. martensi cambodjensis</i>	หอยขม	7	-
4.	<i>F. martensi martensi</i>	หอยขม	3,373	0.79-5.55
5.	<i>F. martensi munensis</i>	หอยขม	52	-
6.	<i>F. sumatrensis polygramma</i>	หอยขม	5,804	-
7.	<i>I. umbilicata</i>	หอยขม	660	-
8.	<i>L. auricularia rubiginosa</i>	หอยคัน	353	2.75
9.	<i>M. tuberculata</i>	-	1	-
10.	<i>P. canaliclata</i>	หอยเชอรี่	2,511	-
11.	<i>T. trochoides</i>	หอยขม	1	-
12.	<i>W. siamensis</i>	-	28	-
13.	<i>P. pesmei</i>	หอยโข่ง	8	-
14.	<i>F. sumatrensis spiceosa</i>	หอยขม	2	-
15.	<i>Physa</i>	-	53	-
16.	<i>Segmentina</i>	-	73	6.66

ทำการตรวจหาเชื้อปรสิตในหอยด้วยวิธีการ cercarial shedding และ ย่อยด้วย pepsin A ผลการตรวจการติดเชื่อพยาธิใบไม้ด้วยวิธีการ cercarial shedding พบหอยติดเชื่อส่วนใหญ่เป็นหอยไซ

(*B. siamensis goniomphalos*) 1.69-25.00% เป็น cercaria ชนิด Virgulate cercaria 1.69-25.00% รองลงมาเป็นชนิด Ubiquita cercaria 2.22-4.35%, Furcocystocercous cercaria 0.28-4.35%, Strigea cercaria 2.77%, Armatae cercaria 0.55%, Un-identified cercaria 1.11-5.88% และ Amphistome cercaria 0.28-1.41% พบหอยไซติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับ ในบ่อเลี้ยงปลา 1 บ่อมีหอยเพียง 1 ตัวที่ติดเชื่อจากจำนวนหอยไซทั้งหมดในบ่อ 1,065 ตัว (1/1,065 ตัว 0.09%) หอยขมชนิด *F. (S.) martensi martensi* พบหอยติดเชื่อ 0.79-5.55% เป็น cercaria ชนิด Virgulate cercaria 0.79-2.22% หอยคัน (*L. auricularia rubiginosa*) พบระยะ unknown cercaria 2.75% และ *Segmentina* พบระยะ unknown cercaria 6.66% จากการย่อยหอยด้วยน้ำย่อย pepsin A พบการติดเชื่อ *Echinostoma revolutum metacercariae* ในหอย *I. umbilicata*

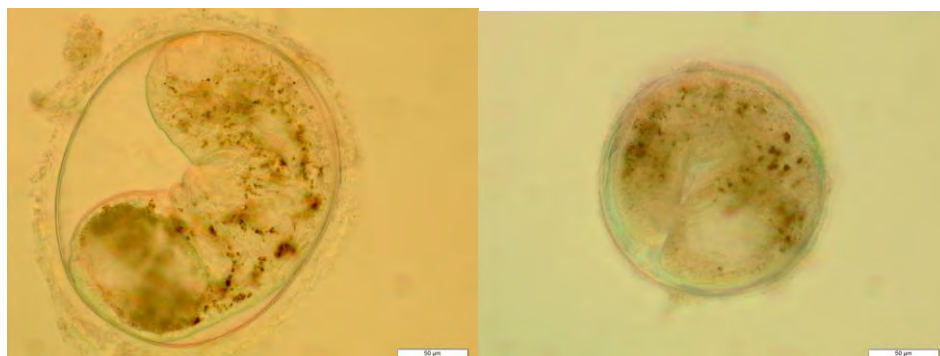
พบปลาในบ่อเลี้ยงปลาทั้งหมด 14 species คือ 1. ปลาช่อน (*Channa straita*), 2. ปลาหมอ (*Anabas testudineus*), 3. ปลานิล (*Oreochromis niloticus*), 4. ปลาชีวาอ้าว (*Luciosoma bleekeri*), 5. ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*), 6. *Mystacoleucus marginata*, 7. ปลานวลจันทร์ (*Cirrhina microlepis*), 8. ปลากริม (*Trichopsis vittata*), 9. ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) 10. ปลากระดี่นาง (*Trichogaster microlepis*) 11. ปลายี่สก (*Probarbus jullieni*) 12. ปลาชีวกวาย (*Rasbora tornieri*) 13. ปลาบุษราคัม (*Oxyeleotris marmoratus*) 14. ปลาขาวนา (*Cyclocheilichthys apogon*) (ตารางที่ 2) พบปลาที่ติดเชื่อปรสิตที่สามารถติดเชื่อสู่คนได้คือ *Centrocestus caninus* และ *Haplorchis yokogawai* ในบ่อเดียว



ภาพที่ 3 แสดงระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *Haplorchis taichui*

ชนิดของปลาที่ปล่อยลงในบ่อปลาของชาวบ้านจะมีความแตกต่างกัน เช่น ปลายี่สก ปลาจีนและ ปลานวลจันทร์จะปล่อยลงไปจำนวนน้อย ซึ่งปลาเหล่านี้มีขนาดใหญ่และต้องการอาหารมากผสมกับปลาชนิดอื่นๆ จึงสุ่มมาตรวจได้จำนวนน้อย นอกจากนี้มีปลาหลายชนิดไปกับน้ำที่ปล่อยลงบ่อเลี้ยงปลาขณะที่ปล่อยน้ำเข้าบ่อ ชาวบ้านจะให้อาหารปลาเป็นรำข้าว หรือเศษผักกวยช่าย (ชาวบ้านในหมู่บ้านนี้ปลูกผัก

กุษ่ายและทำผักกุษ่ายขาวขายเป็นอาชีพรองจากการทำนา) บ่อปลาจึงเป็นทั้งที่เลี้ยงปลา สืบน้ำรดผัก และล้างผัก (พื้นที่นี้อยู่ในเขตชลประทานแต่การปล่อยน้ำจะปล่อยเฉพาะช่วงระยะเวลาการทำนา ชาวบ้านจึงต้องมีแหล่งน้ำสำรอง คือบ่อปลา)



ก

ข

ภาพที่ 4 ภาพถ่ายของระยะเมตาเซอร์คาเรียของพยาธิ *Haplorchis pumilio* (ก) และ *H. yokogawai* (ข)

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนปลาที่สำรวจพบในบ่อปลา และการติดเชื้อปรสิต

ลำดับ ที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	จำนวน สำรวจ(ตัว)	การติดเชื้อปรสิต
1.	<i>Channa straita</i>	ปลาช่อน	8	acanthocephalan
2.	<i>Anabas testudineus</i>	ปลาหมอ	42	acanthocephalan
3.	<i>Oreochomis niloticus</i>	ปลานิล	59	-
4.	<i>Luciosoma bleekeri</i>	ปลาชีว้าว	493	<i>C. caninus</i> , <i>H. yokogawai</i>
5.	<i>Puntius gonionotus</i>	ปลาตะเพียนขาว	24	-
6.	<i>Mystacoleucus marginata</i>	ปลาขาว	1	-
7.	<i>Cirrhina microlepis</i>	ปลานวลจันทร์	4	-
8.	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	ปลานุ่มทราย	1	-
9.	<i>Trichogaster trichopterus</i>	ปลากะดี่หม้อ	187	acanthocephalan
10.	<i>Trichogaster microlepis</i>	ปลากะดี่นาง	12	-
11.	<i>Trichopsis vittata</i>	ปลากุยม	4	-
12.	<i>Rasbora tornieri</i>	ปลาชีวควาย	9	-
13.	<i>Probarbus jullieni</i>	ปลาอีสก	12	-
14.	<i>Cyclocheilichthys apogon</i>	ปลาขาวนา	24	-

ผลการสำรวจลูกปลาคะเพียนจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลา

ได้ทำการสำรวจลูกพันธุ์ปลาจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาคะเพียนในอำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคามจำนวน 4 ฟาร์ม จำนวนลูกปลาคะเพียน 1400, 1450, 2200 และ 400 ตัว ตามลำดับพบมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Haplorchis taichui* (ภาพที่ 3) ในฟาร์มที่ 1 ซึ่งพบหอยชนิด *Melanoides tuberculata* ซึ่งเป็นโฮสต์กลางที่ 1 ของพยาธิใบไม้ชนิดนี้ จำนวนมากทั้งในร่องน้ำที่ปล่อยลงบ่อและในบ่อปลา นอกจากนี้ยังพบว่าในฟาร์มนี้ยังเลี้ยงสุนัข 2 ตัว ซึ่งสุนัขนี้เป็นโฮสต์ธรรมชาติของพยาธิใบไม้ลำไส้ชนิดนี้อีกด้วย

ผลการตรวจหาพยาธิในปลาคะเพียนจากบ่อเลี้ยงปลาจากการทดลองครั้งที่ 1

และเมื่อสุ่มปลามาตรวจเดือนละ 1 ครั้ง ในเดือน ธันวาคม 2550 มกราคม 2551 กุมภาพันธ์ มีนาคม เมษายน พบปลาดูดเชื้อปรสิตโดยพบ ระยะ metacercaria ของ *H. taichui* และ *H. yokogawai* ในเดือน เมษายนและพฤษภาคม 2551 จำนวนครั้งละ 1- 5 metacercariae

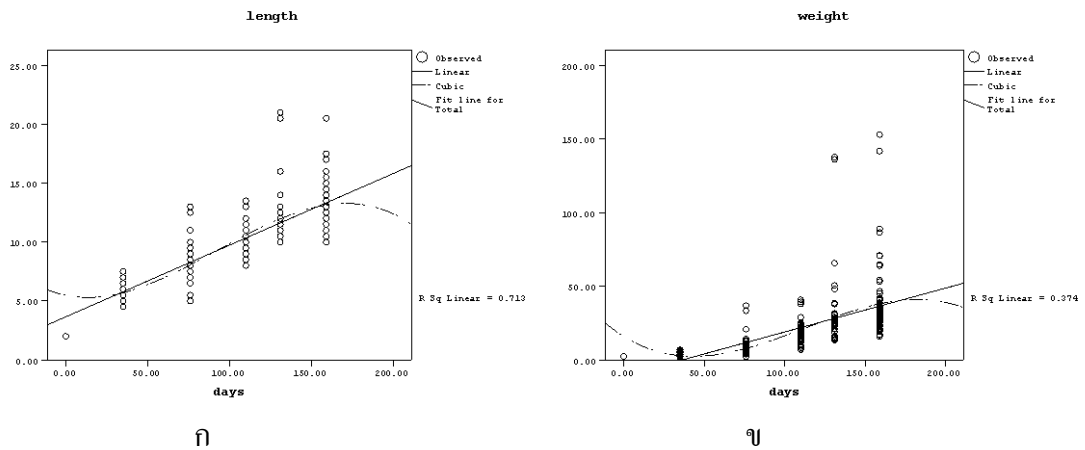
และเมื่อสุ่มปลามาตรวจเดือนละ 1 ครั้ง ในเดือน ธันวาคม 2550 มกราคม 2551 กุมภาพันธ์ มีนาคม เมษายน พบปลาดูดเชื้อปรสิต โดยพบ ระยะ metacercaria ของ *H. yokogawai* ในเดือน เมษายน 2551 จำนวน 4 metacercariae

ผลการเจริญเติบโตของปลาคะเพียนในบ่อเลี้ยงปลา

การเจริญเติบโตของปลาคะเพียน

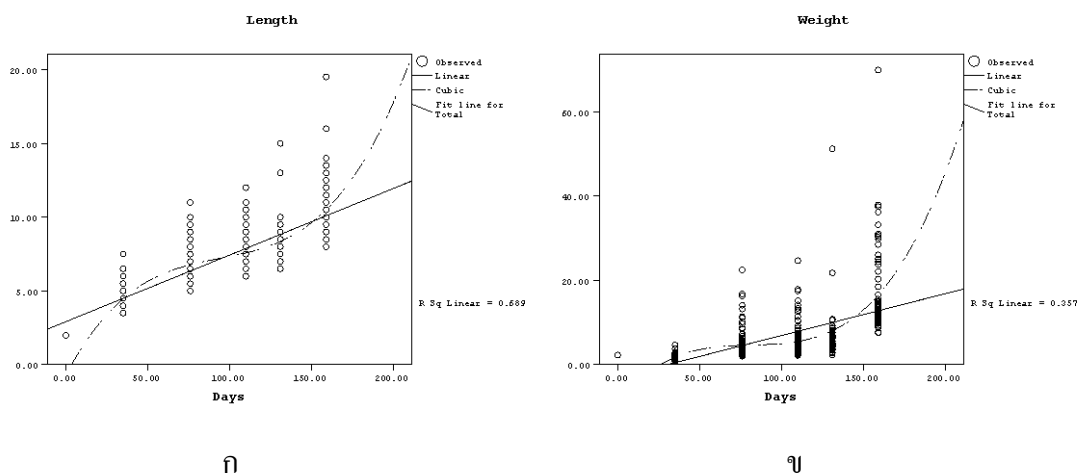
การทดลองครั้งที่ 1

การเจริญเติบโตของปลาคะเพียนในบ่อที่ 1 พบอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดย $r^2 = 0.71$, $p < 0.01$ ของความยาวลำตัวและ $r^2 = 0.37$, $p < 0.01$ ของน้ำหนักลำตัว (ภาพที่ 5)



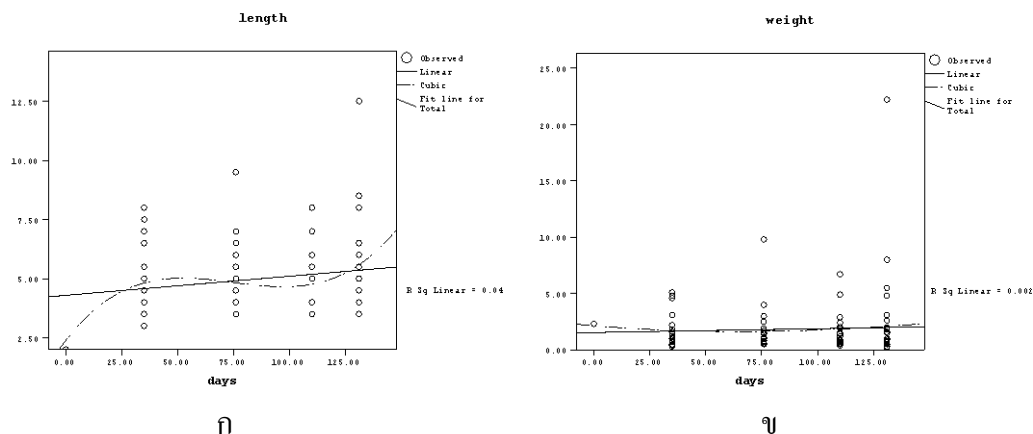
ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตโดยวัดความยาว (ก) และน้ำหนักลำตัว (ข) ของปลาทะเพียนในบ่อที่ 1

การเจริญเติบโตของปลาทะเพียนในบ่อที่ 2 พบอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดย $r^2 = 0.69$, $p < 0.01$ ของความยาวลำตัวและ $r^2 = 0.36$, $p < 0.01$ ของน้ำหนักลำตัว แต่น้อยกว่า บ่อที่ 1 เล็กน้อย (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตโดยวัดความยาว (ก) และน้ำหนักลำตัว (ข) ของปลาทะเพียนในบ่อที่ 2

การเจริญเติบโตของปลาทะเพียนในบ่อควบคุม พบอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นน้อย โดย $r^2 = 0.04$, $p > 0.05$ ของความยาวลำตัวและ $r^2 = 0.04$, $p > 0.05$ ของน้ำหนักลำตัว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตโดยวัดความยาว (ก) และน้ำหนักลำตัว (ข) ของปลาดูบเลี้ยงในบ่อควบคุม

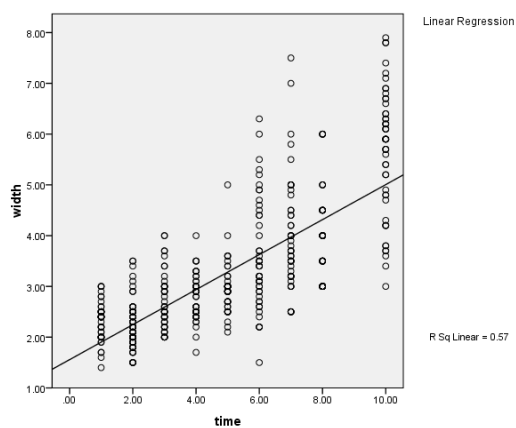
ผลการทดลองครั้งที่ 2

ทำการสุ่มตัวอย่างปลาดูบเลี้ยงทุกเดือน พบการเจริญเติบโตของปลาดูบเลี้ยงในบ่อทดลองที่ 1 (ภาพที่ 4) เจริญเติบโตได้ดีกว่าในบ่อทดลองที่ 2 (ภาพที่ 5) แต่ก็เจริญเติบโตได้ดีกว่าปลาดูบเลี้ยงในบ่อควบคุม อาจเป็นเพราะบ่อทดลองที่ 1 มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งจะมีผลต่อของเสียจากปลาและความหนาแน่นของปลาดูบเลี้ยงที่ปล่อยลงไป หรืออาจเป็นเพราะแร่ธาตุที่ละลายในน้ำซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของ phytoplankton ซึ่งจะเป็นอาหารของปลาดูบเลี้ยง เนื่องจากปลาดูบเลี้ยงเป็นปลากินพืชรวมทั้งแพลงตอนในน้ำด้วย

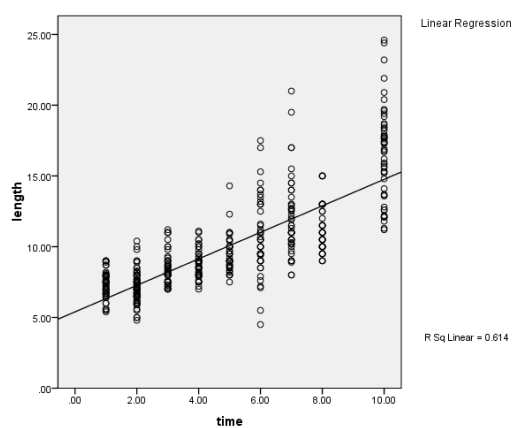
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะได้วิเคราะห์หา correlation ของการเจริญเติบโตในแต่ละเดือน



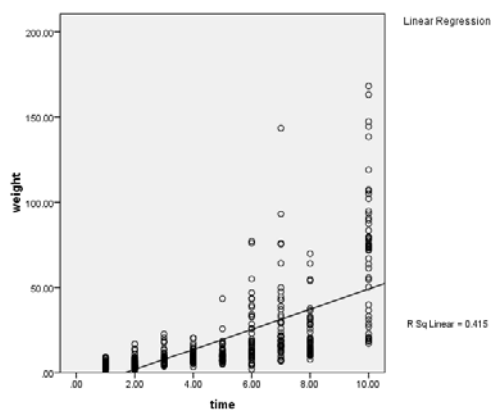
ภาพที่ 8 ภาพถ่ายปลาดูบเลี้ยง (*Puntius gonionotus*) ที่เลี้ยงในบ่อควบคุมและบ่อทดลอง ที่มีขนาดต่างๆ กัน



ก

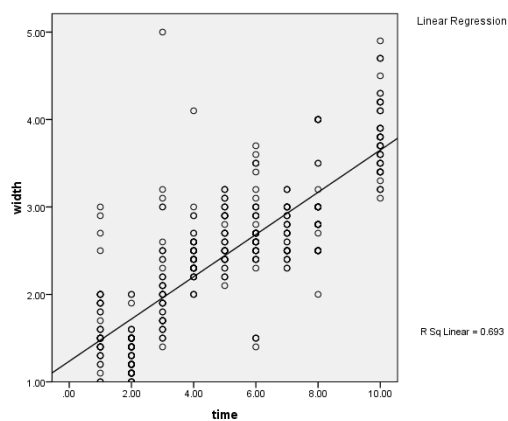


ข

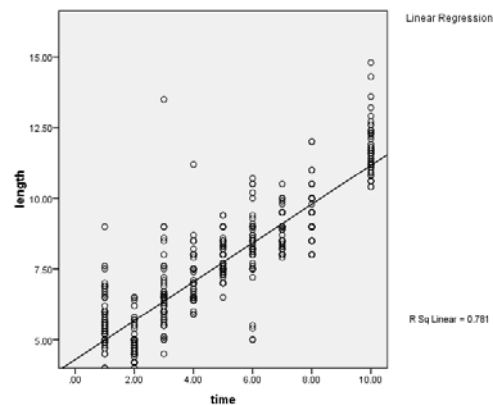


ค

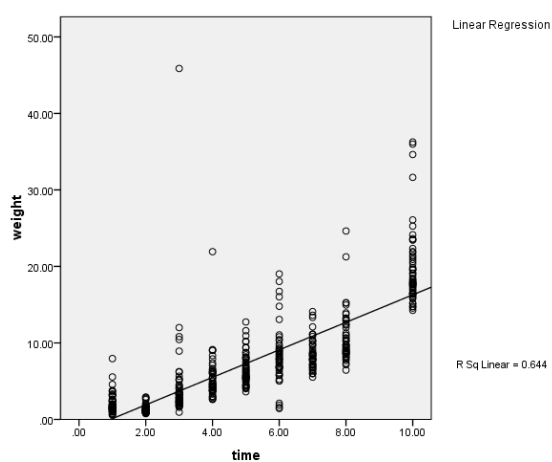
ภาพที่ 9 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของปลาดูในบ่อทดลองที่ 1 ก. ความกว้าง ข. ความยาว และ ค. น้ำหนักของปลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละเดือน โดยมีสมการ $T = -0.44 + 1.625(w)$, $T = -1.629 + 0.656(l)$, $T = 3.597 + 0.07(wt)$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.57$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.641$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.415$ ตามลำดับ (T คือ เวลา (เดือน) w คือความกว้าง l คือความยาว wt คือน้ำหนัก)



ก

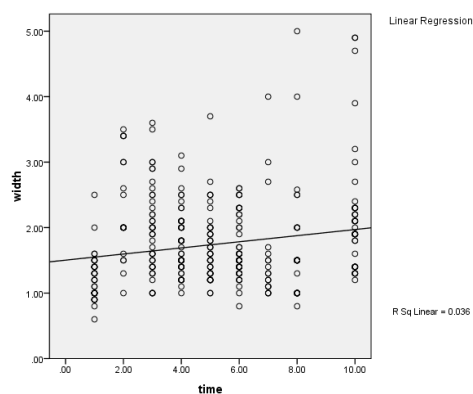


ข

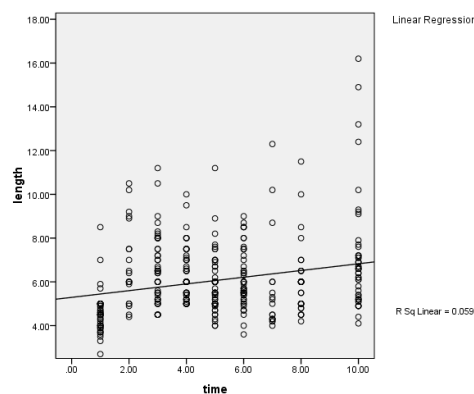


ค

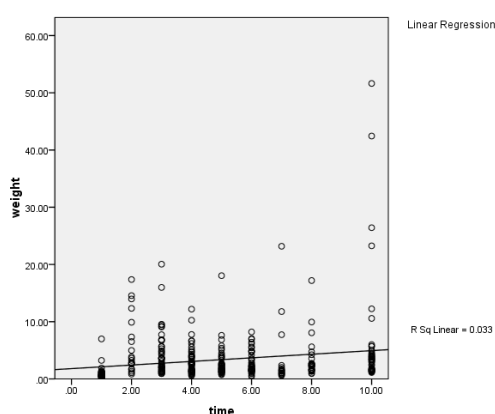
ภาพที่ 10 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของปลาดุกเลี้ยงในบ่อทดลองที่ 2 ก. ความกว้าง ข. ความยาว และ ค. น้ำหนัก ของปลาที่ทำการวัดในแต่ละเดือนโดยมีสมการ $T = -2.032 + 2.871(w)$, $T = -3.802 + 1.137(l)$, $T = 2.366 + 0.358(wt)$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.693$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.781$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.644$ ตามลำดับ (T คือเวลาเป็นเดือน w คือความกว้าง l คือความยาว wt คือน้ำหนัก)



ก



ข



ค

ภาพที่ 11 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของปลาตะเพียนในบ่อควบคุม ก. ความกว้าง ข. ความยาว และ ค. น้ำหนัก ของปลาในแต่ละเดือน โดยมีสมการ $T = 3.69 + 0.772(w)$, $T = 2.688 + 0.387(l)$, $T = 4.672 + 0.107(wt)$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.036$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.059$; $p < 0.01$, $R^2 = 0.033$ ตามลำดับ (T คือเวลาเป็นเดือน w คือความกว้าง l คือความยาว wt คือน้ำหนัก)

การเจริญเติบโตของปลาตะเพียนในบ่อทดลองเจริญได้ดีกว่าในบ่อควบคุม แต่ยังพบการติดเชื้อของพยาธิใบไม้ลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* แต่ก็ไม่พบหอยที่เป็นโฮสต์กลางของพยาธิชนิดในบ่อทั้งสามบ่อ จึงเชื่อว่าการติดเชื้อน่าจะเกิดจากการติดเชื้อจากบ่อเพาะอนุบาลลูกปลาซึ่งผู้เพาะเลี้ยงจะใช้หอย *Melanoides tuberculata* ในการช่วยทำความสะอาดก้นบ่อ ในหมู่บ้านที่ทำการเพาะเลี้ยงลูกปลามักมีการเลี้ยงสุนัขซึ่งเป็นโฮสต์ธรรมชาติ ถึงแม้จะทำการสำรวจลูกปลาแล้วแต่ ขณะที่ไปทำการซื้อลูกปลามาทำการตรวจหาเชื้อพยาธิ และไม่เจอในขณะที่ทำการสำรวจ แต่บ่อที่ทำการสำรวจนั้นไม่สามารถนำปลานั้นมาเลี้ยงได้ เพราะการจับลูกปลาจะจับขึ้นมาเป็นแต่ละบ่อ การไปซื้อใหม่หลัง

จากนั้นจะเป็นคนละบ่อกับที่ไปทำการสำรวจ ถึงแม้จะเป็นของเจ้าของเดียวกันแต่ก็เป็นคนละบ่อ ซึ่งแม้ว่าจะทำการสุ่มตรวจปลาก่อนที่จะปล่อยปลาลงบ่อทดลอง แต่ก็ยังไม่มากพอที่จะพบการติดเชื้อได้ ฉะนั้นการทำให้ปลาปราศจากการติดเชื้อพยาธิจะต้องเริ่มกระทำตั้งแต่การเพาะฟักตั้งแต่ออกจากไข่และการอนุบาลก่อนที่จะนำไปเลี้ยงต่อไป

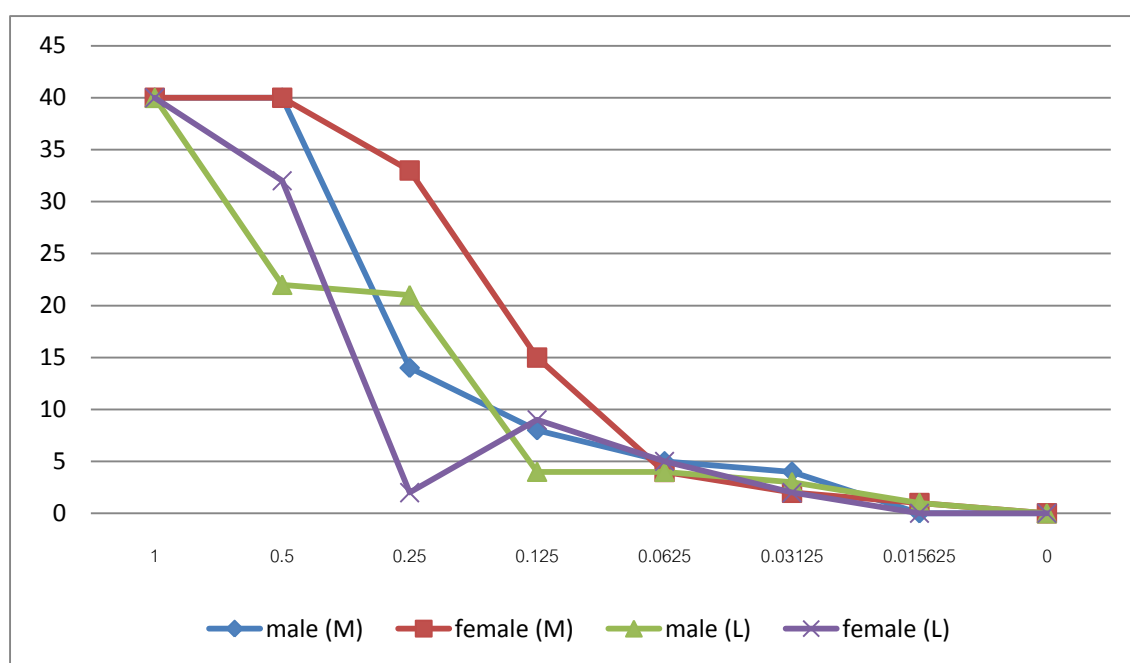
การทดสอบสารฆ่าหอย Bayluscide

การทดลองในห้องทดลอง

1) การทดลองขึ้นต้น

การทดลองขึ้นต้น โดยทดสอบสาร Bayluscide ในระดับความเข้มข้นที่ 0, 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 ppm หอยไซ *B. siamensis gonimphalos* ที่นำมาใช้ทดลองจะทำการตรวจหาการติดเชื้อพยาธิไม่โดย cercarial shedding 3 ครั้ง ใน 1 เดือน แบ่งหอยออกเป็น

จำนวนหอยที่ตาย

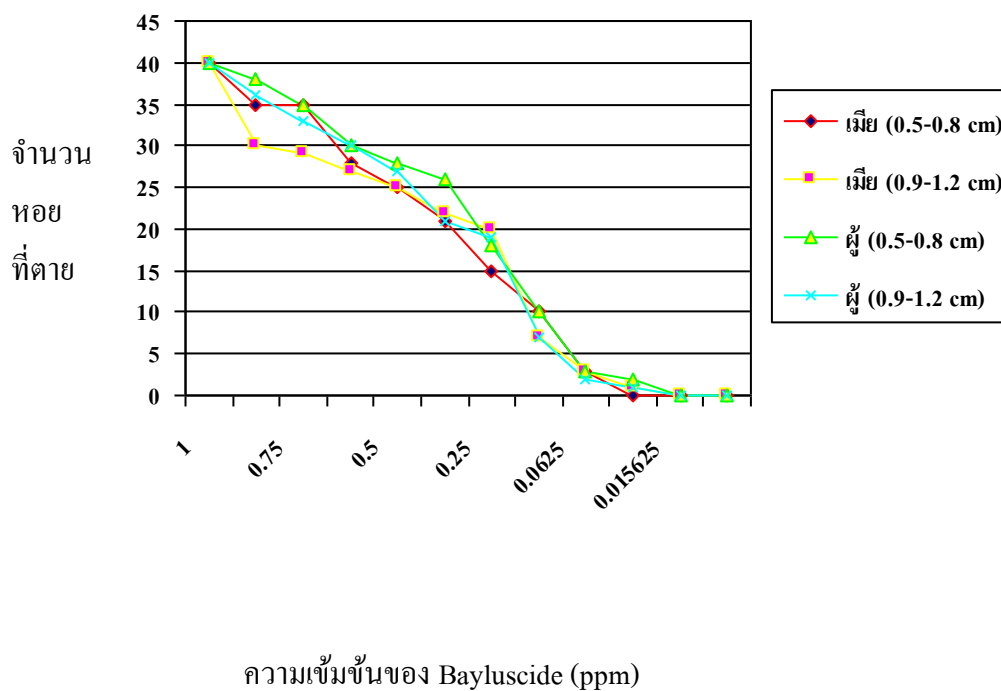


ความเข้มข้น Bayluscide (ppm)

ภาพที่ 12 กราฟแสดงจำนวนหอย *B. siamensis gonimphalos* เพศผู้และเพศเมีย

2) การทดลอง definitive

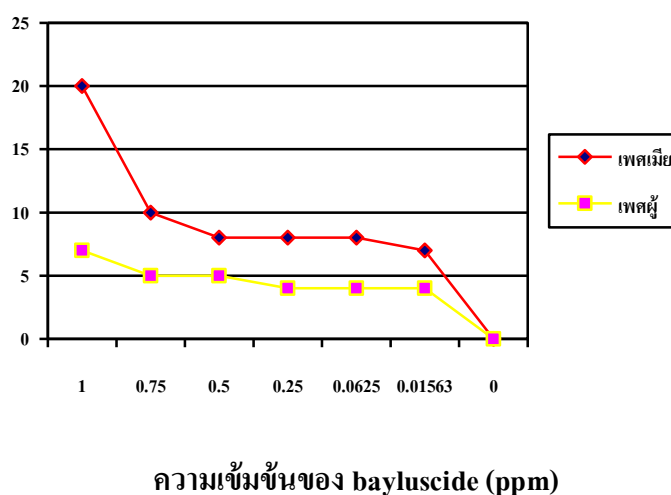
ทดสอบสาร Bayluscide ที่ความเข้มข้นที่ 0 (control), 0.015625, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.625, 0.75, 0.875, 1 ppm โดยทดสอบกับหอย *B. siamensis goniomphalos*



ภาพที่ 13 กราฟแสดงการทดสอบสาร Bayluscide ต่อหอย *B. siamensis goniomphalos* แบบ definitive

3) ผลการทดสอบสาร Bayluscide ต่อสัตว์ร่วมนิเวศน์ที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย

จำนวนกุ้งฝอยที่ตาย



ภาพที่ 14 แสดงผลของ Bayluscide ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันที่มีผลต่อการตายของกุ้งฝอย (จำนวน 20 ตัว/ความเข้มข้น)

ผลของ Bayluscide ต่อลูกปลาตะเพียน ที่ความเข้มข้น 1-0.015625 ppm ทำให้ลูกปลาตะเพียนตายหมด จะเหลือรอดเพียง 1-5 ตัวที่ความเข้มข้น 0.0625-0.015625 ppm

ผลของ Bayluscide ต่อหอยขมชนิด *F. martensi martensi* และปลาหางนกยูง ในแต่ละความเข้มข้นทำให้หอยและปลาหางนกยูงตายเพียง 2-3 ตัว

- 5) การทดลองในภาคสนาม บ่อที่ 1, 2 และ 3 ใส่น้ำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20, 10 และ 5 มก/ลิตร ตามลำดับ ทำการสุ่มตรวจผลกระทบต่อหอยและสัตว์น้ำอื่นๆ ในวันรุ่งขึ้น ไม่พบสัตว์น้ำอื่นๆ เช่น ปลา กบ เขียด ปู กุ้ง ได้รับผลกระทบเลย ในระยะแรกที่ใส่น้ำ มีปลาตระกูลปลาตะเพียน กระโดดขึ้นเหนือพื้นน้ำ ว่ายตะแคง แล้วก็กลับมาว่ายน้ำได้ใหม่ ไม่พบปลาหรือสัตว์ที่ไม่ใช่เป้าหมายตาย และหลังจากใส่น้ำ 14 วัน การสำรวจหอยพบว่าหอย *B. siamensis goniomphalos* ตาย ในบ่อที่ 1, 2 และ 3 ประมาณ 31.25, 20.00 และ 10.94% ตามลำดับ

ผลของคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ค่า pH อยู่ในสภาพเป็นกรดอ่อนๆ ซึ่งน่าจะขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนที่ตกลงในบ่อปลาเช่นในเดือนกรกฎาคมมีค่า pH ที่เป็นกรดสูงกว่าเดือนอื่น รวมทั้งความเข้มข้นของเกลือที่ต่ำลงจากปริมาณน้ำฝนที่ตกลงมามากลงไปเรื่อยๆ และค่าความขุ่นมากขึ้นจากการชะล้างดินลงไปบ่อปลา (ตารางที่ 4, 5 และ 6) ในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน เป็นช่วงเวลาที่ปริมาณน้ำฝนลดลงและปริมาณน้ำในบ่อเริ่มลดลง ทำให้ค่าออกซิเจนละลายน้ำลดลงไปด้วยจากการใช้ออกซิเจนของแพลงตอนพืชและปลาและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ น้ำใสขึ้นดูได้จากค่า turbidity ที่ลดลงทำให้แสงแดดส่องลงไปให้แพลงตอนพืชเจริญเติบโตได้ดี จึงใช้ออกซิเจนมากขึ้น แต่ในบ่อควบคุมไม่พบการละลายของดินลงไปใต้น้ำมากนักเพราะในบ่อควบคุมไม่ได้ทำการขุดลอกคันบ่อและมีพืชปกคลุมคันบ่อ น้ำจึงชะหน้าดินลงไปใต้น้ำไม่มากเท่าบ่อทดลอง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 3 แสดงคุณภาพน้ำในบ่อควบคุมช่วงเดือน กรกฎาคม 2552 ถึงเดือน เมษายน 2553

เดือน	pH	Temp. (C)	Cond. (μ s/cm)	Salt. (ppm)	DO (ppm)	Tur. (NTu)
กรกฎาคม 2552	6.644	28.72	366.2	175.4	1.756	322.2
สิงหาคม 2552	7.202	32.72	917.6	458.4	1.264	58.2
กันยายน 2552	7.236	29.6	810.2	402.8	1.906	285.2
ตุลาคม 2552	7.184	27.9	810.2	402.8	1.32	146
พฤศจิกายน 2552	7.296	29.22	874	423	1.36	142.5
ธันวาคม 2552	6.798	25.28	1148.6	582	1.674	241
มกราคม 2553	7.106	24.32	1116.6	574	1.57	79.72
กุมภาพันธ์ 2553	7.044	24.94	1124	572.2	1.62	79.14
มีนาคม 2553	7.01	27.2	1054.5	531	1.34	52.7
เมษายน 2553	7.05	30.8	1096.4	546	0.97	205.2

Temp.= temperature, Cond.=conductivity, DO=dissolve oxygen, Tur.=turbidity

ตารางที่ 4 แสดงคุณภาพน้ำในบ่อดลองที่ 1 ช่วงเดือน กรกฎาคม 2552 ถึงเดือน เมษายน 2553

เดือน	pH	Temp. (c)	Cond. (μ s/cm)	Salt. (ppm)	DO (ppm)	Tur. (NTu)
กรกฎาคม 2552	6.926	29.04	452	219.2	2.49	134.2
สิงหาคม 2552	7.386	34.46	942.4	473	0.504	59
กันยายน 2552	7.196	30.42	951.2	477	1.86	61.58
ตุลาคม 2552	7.618	29.02	997.8	500.2	1.264	55.44
พฤศจิกายน 2552	7.49	29.08	906.8	559.4	0.846	77.5
ธันวาคม 2552	7.436	24.02	1249	641	0.69	108.88
มกราคม 2553	7.266	25.38	1141.2	561	0.994	74.34
กุมภาพันธ์ 2553	7.33	25.16	1144.8	564.6	1.702	80.5
มีนาคม 2553	7.54	26.69	1391.8	714	1.35	64.58
เมษายน 2553	7.06	33.02	1136.8	525.8	0.82	75.1

Temp.= temperature, Cond.=conductivity, DO=dissolve oxygen, Tur.=turbidity

ตารางที่ 5 แสดงคุณภาพน้ำในบ่อดทดลองที่ 2 ช่วงเดือน กรกฎาคม 2552 ถึงเดือน เมษายน 2553

เดือน	pH	Temp. (c)	Cond. (μ s/cm)	Salt. (ppm)	DO (ppm)	Tur. (NTu)
กรกฎาคม2552	6.96	30.14	435.4	211	1.448	66.12
สิงหาคม 2552	7.41	35.03	850.3	460.67	1.646	36.6
กันยายน 2552	7.35	31.03	945.5	471	1.402	30.25
ตุลาคม 2552	7.15	29.07	1001	500	1.133	53
พฤศจิกายน 2552	7.27	30.3	948.33	476.33	1.47	58.15
ธันวาคม 2552	7.31	25.36	1099.66	623.33	1.49	83.34
มกราคม 2553	6.99	25.2	1161.34	592	1.53	84
กุมภาพันธ์2553	7.12	25.12	1144.4	588.0	1.65	79.8
มีนาคม2553	6.88	28.67	1197.3	605.9	1.05	78.29
เมษายน2553	7.04	30.68	1536.2	772.6	0.54	60.48

Temp.= temperature, Cond.=conductivity, DO=dissolve oxygen, Tur.=turbidity

การเลี้ยงปลาในบ่อซีเมนต์ในโรงเรือน

ปล่อยลูกปลาดตะเพียนขนาด น้ำหนัก 4.61 กรัม กว้าง 2.31 ซม ยาว7.32 ซม เมื่อ เดือน กรกฎาคม 2552 จำนวนประมาณ 200 ตัว เลี้ยงปลาได้ 8 เดือน (ถึงเดือนเมษายน 2553) ได้ทำการจับปลา มาวัดขนาดและย่อยตรวจหาระยะเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิ พบว่าเหลือปลาอยู่ในบ่อ 43 ตัวปลา มีขนาด เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย น้ำหนัก 13.03 กรัม กว้าง 3.22 ซม ยาว 10.54 ซม จากการตรวจหาระยะเมตาเซอ์คาร์เรีย โดยการย่อยด้วยน้ำย่อยเปปซิน พบระยะเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิ *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* (ภาพที่ 3 และ 4) เหมือนในบ่อดินที่ทำการทดลองและบ่อควบคุม

วิจารณ์ผลการทดลอง

การติดเชื้อปรสิตในหอยและปลาในบ่อเลี้ยงปลาในหมู่บ้านที่เลือกทำการทดลอง จากการสำรวจ หอยพบหอยที่จะเป็นโฮสต์กลางที่ 1 ของพยาธิตัวแบนไม่ลำไส้ขนาดเล็กคือหอย *Melanoides tuberculata* เพียงตัวเดียว แสดงว่าในหมู่บ้านนี้ไม่ใช่แหล่งของหอยชนิดนี้และจากการสำรวจการติดเชื้อพยาธิในปลาก็พบเพียง *Haplorchis yokogawai* และ *Centrocestus caninus* เท่านั้น ไม่พบการติดเชื้อของ *H. taichui* ในปลาในบ่อเลี้ยงปลาเลย และปลาที่พบพยาธิชนิดนี้เป็นปลาซึ่งน่าจะมาจากธรรมชาติ ไม่ใช่พันธุ์ปลาที่ชาวบ้านซื้อมาเลี้ยงจากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลา จึงน่าจะติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมจากบ่อปลานั้นเอง ส่วนการติดเชื้อในหอย พบการติดเชื้อพยาธิตัวแบนในหอย *B. siamensis goniomphalos* ซึ่งมีทั้งการติดเชื้อพยาธิตัวแบนชนิด *O. viverrini* และเชอร์คาเรียพยาธิตัวแบนชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบในหอยชนิด *F. (S.) martensi martensi* หอยคัน (*L. auricularia rubiginosa*) และ *Segmentina* ที่ติดเชื้อพยาธิตัวแบนชนิดอื่นๆ และจากการย่อยหอยด้วยน้ำย่อย pepsin A พบการติดเชื้อ *Echinostoma revolutum metacercariae* ในหอย *I. umbilicata* แต่จากการทดลองเลี้ยงปลาไม่พบการติดเชื้อพยาธิตัวแบนชนิด *O. viverrini* ในปลาตะเพียนที่ทำการเลี้ยงทั้งในบ่อควบคุมและบ่อทดลอง ฉะนั้นจึงน่าจะอนุมานได้ว่าการติดเชื้อพยาธิตัวแบนไม่ลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* จึงน่าจะติดเชื้อมาจากบ่อเพาะพันธุ์ปลา

จากการทดลองพบว่าปลาตะเพียนที่ทำการเลี้ยงทั้งในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ รวมทั้งบ่อควบคุม ยังคงมีการติดเชื้อพยาธิตัวแบนไม่ลำไส้ขนาดเล็กชนิด *Haplorchis taichui* และ *H. pumilio* ซึ่งพบว่าผู้ทำการเพาะเลี้ยงปลาในฟาร์มปลามีการปล่อยหอยชนิด *Melanoides tuberculata* ซึ่งเป็นโฮสต์กลางที่ 1 ของพยาธิตัวแบนไม่ลำไส้ขนาดเล็กชนิดนี้ เพื่อทำความสะอาดก้นบ่อจากอาหารที่เหลือจากปลาหรือของเสียที่ปลาถ่ายออกมา จากการติดเชื้อพยาธิเหล่านี้จะต้องหาวิธีหรือให้ความรู้แก่ผู้เพาะเลี้ยงลูกปลาเกี่ยวกับการติดเชื้อของพยาธิเหล่านี้ การป้องกันการติดเชื้อ หรือใช้หอยชนิดอื่นที่สามารถทดแทนกันได้

การทดลองใช้สารเคมีฆ่าหอยทั้งในห้องทดลองและในแหล่งน้ำธรรมชาติพบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าหอย Bayluscide มีความแตกต่างกันมาก อาจจะเนื่องมาจากหอยชนิดนี้มีฝาปิด และสามารถมุดดินได้ ฉะนั้นเมื่อสัมผัสกับสารนี้จึงมุดดินทำให้ไม่สามารถฆ่าหอยได้ร้อยเปอร์เซ็นต์แม้จะเพิ่มความเข้มข้นถึงสิบเท่าก็ตาม

กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

ผลงานตีพิมพ์

1. Chalida Thammasiri, Smarn Tesana, Apiporn Suwannatrai, Supawadee Piratae, Panita Khampoosa, Jutharat Kulsantiwong, Sattrachai Prasopdee, Wipaporn Ruangjirachuporn, Varima Wongpanich, Pairat

Tarbsripair 2009. Molluscicidal Effects of Bayluscide (niclosamide) on *Bithynia siamensis goniomphalos*, first intermediate host of liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. **KKU Res J (GS) 9: 107-117.**

2. วารสาร Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health เรื่อง Parasitic infection in cultivation fish in fish ponds in a village, Khon Kaen province, Thailand. กำลังเตรียม manuscript

นำเสนอผลงานวิจัย

1. ได้นำเสนอผลงานในที่ประชุม ชะอำ เพชรบุรี เมื่อวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552
2. ได้นำเสนอผลงานในที่ประชุม ชะอำ เพชรบุรี เมื่อวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553

ปัญหาและอุปสรรค

1. การเตรียมบ่อปลาเพื่อทำการทดลองครั้งใหม่ โดยสูบน้ำออก จับปลา โดยเฉพาะปลาช่อน ยังไม่สามารถจับออกได้หมด เพราะการสูบน้ำออกทำในฤดูฝน ไม่สามารถสูบน้ำออกจนแห้ง น้ำฝนจะลงไปเติมน้ำในบ่อตลอด ทำให้มีน้ำตลอด ไม่สามารถโรยปูนขาว และตากบ่อให้แห้งได้
2. การชลประทานจะปล่อยน้ำเพื่อทำนาเดือนกันยายน ทำให้ต้องรอน้ำจากคลองชลประทาน เพื่อกรองน้ำลงบ่อเลี้ยงปลา
3. ช่วงต้นปีฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาจะหยุดการเพาะเลี้ยงในฤดูหนาว และจะต้องรอนตัวอ่อนที่ฟักออกมาได้ขนาดประมาณ 1 นิ้วจึงจะจับขายเป็นลูกพันธุ์ปลา จึงทำให้การเริ่มเลี้ยงปลาล่าช้ากว่ากำหนด

ความเห็นและข้อเสนอแนะ

1. การเพาะเลี้ยงลูกปลาในฟาร์มปลาควรได้มีการแนะนำการเพาะเลี้ยงเพื่อไม่ให้ติดเชื้อพยาธิ ตั้งแต่ยังเป็นลูกปลาเล็กๆ ให้คำแนะนำผู้ทำฟาร์มลูกปลาได้ตระหนักถึงการปนเปื้อนของเชื้อพยาธิในลูกปลา การจัดการสิ่งแวดล้อมที่จะป้องกันการปนเปื้อนเชื้อพยาธิลงไปในบ่อเพาะพันธุ์ปลา น้ำที่ใช้เลี้ยงปลา การกำจัดหอยในบ่อเพาะพันธุ์ปลา การให้อาหารปลาที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อปรสิต

2. ควรมีหน่วยงานที่จะทำการสำรวจลูกปลาจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาเพื่อป้องกันการติดเชื้อปรสิต โดยเฉพาะปรสิตที่จะติดต่อกับคน

เอกสารอ้างอิง

1. Bhaibulaya, M., Indra-Ngarm, S. *Amaurornis phoenicurus* and *Ardeola bacchus* as experimental definitive hosts for *Capillaria philippinensis* in Thailand. Int J Parasitol 1979; 9: 321-322.
2. Bunnag, D., Pungpark, S., Harinasuta, T., Viravan, C., Vanijanonta, S., Suntharasamai, P., Migasena, S., Charoenlarp, P., Riganti, M., LooAreesuwan, S. *Opisthorchis viverrini*: clinical experience with praziquantel in Hospital for Tropical Diseases. Arzneimittelforschung 1984; 34: 1173-4.
3. Cross, J. H., Basaca-Sevilla, V. *Capillariasis philippinensis*: a fish-borne parasitic zoonosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22 Suppl: 153-157.
4. de Souza, C. P., Paulini, E. Influence of pH in the biology analysis with PCF and Baylucide. Rev Bras Malariol Doencas Trop 1967; 19: 413-20.
5. Elkins, D. B., Haswell-Elkins, M. R., Mairiang, E., Mairiang, P., Sithithaworn, P., Kaewkes, S., Bhudhisawasdi, V., Uttaravichien, T. A high frequency of hepatobiliary disease and suspected cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small community in north-east Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg 1990; 84: 715-9.
6. Haswell-Elkins, M. R., Sithithaworn, P., Elkins, D. *Opisthorchis viverrini* and cholangiocarcinoma in Northeast Thailand. Parasitol Today 1992; 8: 86-9.
7. Jongsuksantigul P, Chaeychomsri W, Techamontrikul P, Jeradit P, Suratanavanit P. Study on prevalence and intensity of intestinal helminthiasis and opisthorchiasis in Thailand. J Trop Med Parasitol 1992; 15: 80-95.
8. Jongsuksantigul, P., Imsomboon, T. Epidemiology of opisthorchiasis and national control program in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1998; 29: 327-32.
9. Jongsuksantigul, P., Imsomboon, T. Opisthorchiasis control in Thailand. Acta Trop 2003; 88: 229-32.
10. Ooi, H. K., Wang, W. S., Tu, C. Y., Chang, H. Y., Chen, C. I. Natural mass infection by heterophyid metacercariae in aquacultured Japanese eel in Taiwan. Dis Aquat Organ 1999; 35: 31-36.
11. Pinlaor, S., Ma, N., Hiraku, Y., Yongvanit, P., Semba, R., Oikawa, S., Murata, M., Sripa, B., Sithithaworn, P., Kawanishi, S. Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. Carcinogenesis 2004; 25: 1535-42.
12. Radomyos, P., Bunnag, D., Harinasuta, T. Report of *Episthmium caninum* (Verma, 1935) Yamaguti, 1958 (Digenea: Echinostomatidae) in man. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1985; 16: 508-11.
13. Radomyos, P., Radomyos, B., Tungtrongchitr, A. Multi-infection with helminths in adults from northeast Thailand as determined by post-treatment fecal examination of adult worms. Trop Med Parasitol 1994; 45: 133-5.
14. Radomyos, B., Wongsaroj, T., Wilairatana, P., Radomyos, P., Praevanich, R., Meesomboon, V., Jongsuksantikul, P. Opisthorchiasis and intestinal fluke infections in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1998; 29: 123-7.

15. Saowakontha, S., Pipitgool, V., Pariyanonda, S., Tesana, S., Rojsathaporn, K., Intarakhao, C. Field trials in the control of *Opisthorchis viverrini* with an integrated programme in endemic areas of northeast Thailand. *Parasitology* 1993; 106 (Pt 3): 283-8.
16. Sriamporn, S., Pisani, P., Pipitgool, V., Suwanrungruang, K., Kamsa-ard, S.
17. & Parkin, D. M. (2004). Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Tropical Medicine and Internal Health*, 9, 588-94.
18. Tesana S, Kaewkes S, Phinlaor S. Infectivity and survivorship of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in fermented fish. *J Parasit Trop Med Assoc Thailand* 1986; 9: 21-29.
19. Tesana S, Kaewkes S, Srisawangwonk T, Phinlaor S. The distribution and density of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in cyprinoid fish in Khon Kaen province. *J Parasitol Trop Med Assoc Thailand* 1985; 8: 36-39.
20. Tesana, S., Takahashi, Y., Sithithaworn, P., Ando, K., Sakakura, T., Yutanawiboonchai, W., Pairojkul, C., Ruangjirachuporn, W. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of cholangiocarcinoma in immunized Syrian golden hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* and administered with dimethylnitrosamine. *Parasitol Int* 2000; 49: 239-51.
21. Upatham, E. S. Viyanant, V. Brockelman, W. Y. Kurathong, S. Lee, P. Kraengraeng, R. Rate of re-infection by *Opisthorchis viverrini* in an endemic northeast Thai community after chemotherapy. *Int J Parasitol* 1988; 18: 643-9.
22. Vatanasapt V, Tangvoraphonkchai V, Titapant V, Pipitgool V, Viriyapap D, Sriamporn S. A high incidence of liver cancer in Khon Kaen Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990; 21: 489-494.
23. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, et al., Cancer in Thailand 1988-1991 (IARC Technical report No. 16). International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1993.
24. Vichasri S, Viyanant V, Upatham ES. *Opisthorchis viverrini*: intensity and rates of infection in cyprinoid fish from an endemic focus in northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1982; 13: 138-141.

ภาคผนวก ก (manuscript ที่เตรียมส่งตีพิมพ์)

Environmental management in fish pond to prevent parasitic infection in fish cultivation

Smarn Tesana, Pairat Thapsripair, Apiporn Suwannatrai, Surat Haraay, Supawadee Piratae, Panita Khampoosa, Chalida Thammasiri, Sastrachai Prasobdee, Jutharat Kulsantiwong and Prapart Chalokpanrat³

Food-borne Parasite Research Group, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Department of Biology, Faculty of Science, Department of Fishery, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen province 40002, Thailand.

Abstract

Environmental management in fish pond to prevent parasitic infection in fish cultivation, cyprinid fish in the species of *Barbonymus gonionotus* was studied. The original 27 fish ponds in the village of Khon Kaen province, northeast Thailand were survey for snail and fish intermediate hosts for baseline data. Sixteen species of snails and 14 species of fish were found in 27 fish ponds. Snail hosts acted as first and second intermediate hosts were positive for human parasitic infection; *Bithynia siamensis goniomphalos* was *Opisthorchis viverrini* (1/1,065 snails in one pond, 0.09%) and *Idiopoma umbilicata* was found *Echinostoma revolutum* metacercariae in one pond. Two parasite species, *Centrocestus caninus* and *Haplorchis yokogawai* were found in fish species of *Luciosoma bleekeri* in one pond. Two experimental fish ponds size about 900 and 400 square meters, respectively and one control pond about 400 square meters. The experiment ponds were built fence using metal roof surrounding the ponds but not for control one. The water was passed the filter of fine sand well filtration for fish cultivation. Fish food was supplied by floating industrial fish food. *B. gonionotus* offspring of 6,000, 4,000 and 4,000 were released into 2 experimental and control ponds, respectively. The growth of *B. gonionotus* was ...in big pond better than small one, but both of them were better than the control one. No parasite was found in the sampling 50 fish each pond for monthly.

Keywords: fish cultivation, fish pond, free-parasitic infection, snail intermediate host, fish intermediate host, environmental management, northeast Thailand

Introduction

Snail and fish-borne parasitic infection still be one of the most important health problems in Thailand especially in northeastern part where the local people prefer to eat raw or improperly cooked fish and snails. The important parasitic infections such as *Opisthorchis viverrini*, echinostomes, minute intestinal flukes, *Angiostrongylus cantonensis*, *Gnathostoma spinigerum*, *Capillaria philippinensis* etc. those of parasites require snails and/or fish as intermediate hosts (Jongsuksantikul 2003; Tesana et al., 2009). *O. viverrini* was an important agent for cholangiocarcinoma and was classified as group 1 carcinogen (IARC, 1994). Local dish of raw, fermented or improperly cooked cyprinoid fish in northeast namely “Koi-pla, Pla-som, Pla-jom, Mum-pla and Pla-ra” were daily meals and mainly source of infection. Those dishes were also the source of *C. philippinensis* infection. For big fish such as snake head fish, cat fish, they prepare as “Larb-pla” and act as source of *G. spinigerum* infection. And raw or improperly cooked snail dish especially the preparation dish of Apple snails (*Pila, Pomacea*) and *Filopuludina* snails was called “Koi-Hoy, Som-tum (seasoning with Apple or *Filopuludina* snails)”, commonly ate for local people which was source of *A. cantonensis* and echinostomes (Tesana et al., 2009). Fish cultivation in land was important food for protein source for people especially for poor, however there were many parasitic infection in fresh water fish. The products of fish cultivation were high for many tons each year. By the convenient of transportation for foods from the source to consumers the distribution of parasitic infection also wide spread.

Materials and Methods

Snail survey

Snail sample were identified for species by following Brandt (1974), Upatam et al (19). They were examined for trematode infection by cercarial shedding (day and nighttime) and further digestion by pepsin A 0.25% (BDH, England) pH 2.2 for an hour at 37 °C in shaking water bath. For collection of nematode parasites, Bearmann apparatus was used and the debris on the apparatus was collected for sedimentation in sediment jars with 0.85% sodium chloride solution. Fish also was identified for species and digested as above procedure. The digestive juice was sieved and washed with 0.85% sodium chloride solution until supernatant was clear. The sediment was searched for parasites under stereoscope at 40 X.

Ceracriae were identified by following

Fish survey

The areas of snail and fish intermediate hosts survey is in Ban Napieng, Amphoe Muang, Khon Kaen province, northeast Thailand. The sampling area is located in northeast of Khon Kaen town about 10 km distance. Those of fish ponds were encouraged for fish cultivation from Khon Kaen Fishery Department. They were provided plant eating fish offsprings such as Tilapia and cyprinoid fish. Twenty seven fish ponds were surveyed for parasitic infection and was accepted to join the project for fish and snail collections from the owners. They reared cyprinoid fish including fish from natural source. The villagers usually feed fish with rice bran. Total of 27 fish ponds were surveyed for parasitic infection in snails and fish in Ban Napieng. All of snails in fish ponds were collected as much as we can. Fish in ponds were collected by using fish net about 1 cm net size. Snail sample were collected by manual and scoop collection at the edge of reservoirs and Ekman dredge in deep water.

Environmental management

Results

Snail sample was found for 16 species/subspecies from the 27 sampling ponds i.e. *Bithynia (Digoniostoma) siamensis goniomphalos*, *Clea (Anentome) helena*, *Filopaludina (Siamopaludina) martensi cambodjensis*, *F. (S.) martensi martensi*, *F. (S.) martensi munensis*, *F. (Filopaludina) sumatrensis polygramma*, *Idiopoma umbilicata*, *Lymnaea (Radix) auricularia rubiginosa*, *Melanoides tuberculata*, *Pomacae canaliclata* *Trochotaia trochoides*, *Wattebledia siamensis*, *P. pesmei*, *F. sumatrensis spiceosa*, *Physa*, *Segmentina* (Table 1). Ten species of fish sample i.e. *Channa straita*, *Anabas testudineus*, *Oreochomis niloticus*, *Luciosoma bleekeri*, *Puntius gonionotus*, *Mystacoleucus marginata*, *Cirrhina microlepis*, *Puntius gonionotus*, *Oxyeleotris marmoratus*, *Trichogaster trichopterus* (Table 2).

By cercarial shedding, the highest prevalence of infection was found in *B. siamensis goniomphalos* (1.69-25.00%) and infected with *Opisthorchis viverrini* cercaria 0.09%, Virgulate cercaria 1.69-17.65%, Ubiquita cercaria 2.22-4.35%, Furcocyctocercous cercaria 0.28-4.35%, Strigea cercaria 2.77%, Armatae cercaria 0.55% and un-identified cercaria 1.11-5.88%. In second order was *F. (S.) martensi martensi* infected with trematode 0.28-1.41% i.e. Amphistome cercaria (0.79-5.55%) and Virgulate cercaria (0.79- 2.22%). *L. auricularia rubiginosa* and *Segmentina* infected with trematode cercaria 2.75% and 6.66%, respectively. After that the soft tissue of snails was digested with 2% artificial pepsin A. There were only *Echinostoma revolutum* metacercariae found in *I. umbilicata*.

T. trichopterus, *C. straita* and *A. testudineus* were infected with acanthocephalan. *Centrocestus caninus* and *Haplochis yokogawai* metacercariae were found in *L. bleekeri*.

Table 1 Species of snails collected from fish pond and infection rate of trematode infection by cercarial shedding

Number	Species of snail	Number of snails	Infection rate (%)
1.	<i>B. siamensis goniomphalos</i>	3,216	1.69-25.00
2.	<i>Clea helena</i>	85	0
3.	<i>F. martensi cambodjensis</i>	7	0
4.	<i>F. martensi martensi</i>	3,373	0.79-5.55
5.	<i>F. martensi munensis</i>	52	0
6.	<i>F. sumatrensis polygramma</i>	5,804	0
7.	<i>I. umbilicata</i>	660	0
8.	<i>L. auricularia rubiginosa</i>	353	2.75
9.	<i>M. tuberculata</i>	1	0
10.	<i>P. canaliclata</i>	2,511	0
11.	<i>T. trochoides</i>	1	0
12.	<i>W. siamensis</i>	28	0
13.	<i>P. pesmei</i>	8	0
14.	<i>F. sumatrensis spiceosa</i>	2	0
15.	<i>Physa</i>	53	0
16.	<i>Segmentina</i>	73	6.66

For examination of parasitic infection in snail host was done by cercarial shedding and digestion with pepsin A. The highest infection rate of trematode infection by cercarial shedding was in *B. siamensis goniomphalos* 1.69-25.00% the type of highest rate was Virgulate cercaria 1.69-25.00% and the following order was Ubiquita cercaria 2.22-4.35%, Furcocyctoceros cercaria 0.28-4.35%, Strigea cercaria 2.77%, Armatae cercaria 0.55%, Un-identified cercaria 1.11-5.88% and Amphistome cercaria 0.28-1.41%. One out of 27 ponds was found the infection of *O. viverrini* in one *B. siamensis goniomphalos* from the total of 1,065 snails (1/1,065, 0.09%) in that pond. The infection in *F. (S.) martensi martensi* was found trematode infection 0.79-5.55% with the type of Virgulate cercaria 0.79- 2.22% and *L. auricularia rubiginosa* found unknown cercaria 2.75% and *Segmentina* found unknown

cercaria 6.66%. *Echinostoma revolutum* metacercariae were found in *I. umbilicata* by digestión with pepsin A.

The parasitic infection in 14 species of fish i.e. *Channa straita*, *Anabas testudineus*, *Oreochomis niloticus*, *Luciosoma bleekeri*, *Barbonymus gonionotus*, *Mystacoleucus marginata*, *Cirrhina microlepis*, *Trichopsis vittata*, *Trichogaster trichopterus*, *Trichogaster microlepis*, *Probarbus jullieni*, *Rasbora tornieri*, *Oxyeleotris marmoratus* and *Cyclocheilichthys apogon* were examined (Table 2) with pepsin A and found only *Centrocestus caninus* infection in *Luciosoma bleekeri* in one pond which was able to infect to man.

Table 2 Parasitic infection in each species of fish from fish ponds.

number	Species of fish	Number of fish	Parasitic infection
1.	<i>Channa straita</i>	8	acanthocephalan
2.	<i>Anabas testudineus</i>	42	acanthocephalan
3.	<i>Oreochomis niloticus</i>	59	-
4.	<i>Luciosoma bleekeri</i>	493	<i>C. caninus</i> , <i>H. yokogawai</i>
5.	<i>Barbonymus gonionotus</i>	24	-
6.	<i>Mystacoleucus marginata</i>	1	-
7.	<i>Cirrhina microlepis</i>	4	-
8.	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	1	-
9.	<i>Trichogaster trichopterus</i>	187	acanthocephalan
10.	<i>Trichogaster microlepis</i>	12	-
11.	<i>Trichopsis vittata</i>	4	-
12.	<i>Rasbora tornieri</i>	9	-
13.	<i>Probarbus jullieni</i>	12	-
14.	<i>Cyclocheilichthys apogon</i>	24	-

Discussion

Fish cultivation in fish ponds in a village in Khon Kaen province was supported ^{ผู้ปลูก} for villagers such as Tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Cyprinus carpio*, *Barbonymus gonionotus* etc. from Provincial Fishery and also the knowledge for rearing. However there were many species of natural fish enter into fish ponds during draining water from irrigation canals into fish ponds such as *Channa straita*, *Luciosoma bleekeri*, *Trichogaster trichopterus* etc. They served as second intermediate host of *C. caninus* and *H. yokogawai*. Even though there was no *O. viverrini* infection in fish survey but in snail host, *B. siamensis goniomphalos* was found the infection. The fish in that pond was not susceptible for *O. viverrini* infection they were not in family Cyprinidae.

In rainy season, rain water will flush feces containing parasite eggs into reservoirs to meet those intermediate hosts. If those humans or reservoir hosts dogs and cats defecated on surrounding ponds the feces will contaminated into reservoirs. Most of fish released in fish pond was varied in number such as *Probarbus jullieni*, *Cirrhinus microlepis*, were less in number and mixed with Tilapia (*Oreochromis niloticus*) or *Barbonymus gonionotus* which depended on the size of ponds.

In each fish pond, they released the different species of fish and numbers depending on size of fish ponds and the kinds of fish they preferred. Many of fish was come with water drainage to fish pond and also snails and infected fish were obtained from the surveyed fish ponds. Those of fish pond have no fences to protect reservoir host or man to defecate on the edges of fish pond then rain water will flooded feces of infected contaminated with parasite eggs into fish ponds in rainy season. People in this village they have fish ponds for water supply of vegetation in the period of no water in irrigation canals. Their fish were supply for foods from the excess of vegetables and some of rice bran.

References

- IARC; 1994. Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 61, 121-175.
- Sriamporn, S., Pisani, P., Pipitgool, V., Suwanrungruang, K., Kamsa-ard, S. and Parkin, D. M.; 2004. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection

and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand.

Trop. Med. Inter. Hlth. 9, 588-594.

Brandt R.A.M.; 1974. The non marine aquatic Mollusca of Thailand. Archiv. Mollusk.105, 1-423.

Chitramvong, Y.P.; 1991. The Bithyniidae (Gastropoda: Prosobanchia) of Thailand: comparative internal anatomy. Walkerana. 5, 161-206.

Chitramvong, Y.P.; 1992. The Bithyniidae (Gastropoda: Prosobanchia) of Thailand: comparative external morphology. Malacol. Rev. 25, 21-38.

Chitramvong, Y.P. and Upatham, E.S.; 1989. A new species of freshwater snail for Thailand (Prosobranchia : Bithyniidae). Walkerana 3, 179-186.

Tesana, S., Srisawangwong, T., Sithithaworn, P., Laha, T. and Andrews, R. 2009. Prevalence and intensity of infection with third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* in mollusks from Northeast Thailand. Am J Trop Med Hyg 80, 983-987.

Molluscicidal Effects of Bayluscide (niclosamide) on *Bithynia siamensis goniomphalos*, First Intermediate Host of Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini*

ผลของการฆ่าหอยของเบลูไซด์ (นิโคลซามาไมด์) ต่อหอยไซ (*Bithynia siamensis goniomphalos*) โฮสต์กลางที่ 1 ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini*

Chalida Thammasiri (ชลิดา ชวรมศิริ)* Dr.Smarn Tesana (ดร.สมาน เทศนา)**

Apiorn Suwannatrai (อภิพร สุวรรณไตรย์)*** Supawadee Piratae (สุภาวดี ปิระเดช)***

Panita Khampoosa (พนิดา คำภูษา)**** Jutharat Kulsantiwoog (จุฑารัตน์ กุลสันติวงศ์)****

Sattracthai Prasopdee (ศาสตราจารย์ ประสิทธิ์)**** Dr.Wipaporn Ruangjirachuporn (ดร.วิภาภรณ์ เรืองจิระชูพร)****

Dr.Varima Wongpanich (ดร.วิริมา วงศ์พาณิชย์)***** Dr.Pairat Tarleripair (ดร.ไพรัช ทาบริไพร)*****

ABSTRACT

The effects of Bayluscide were studied on both immature and adults *Bithynia siamensis goniomphalos* for its molluscicidal efficiency. The lethal concentration (LC_{50}) values of immature and adults were 0.28 and 0.17 mg/l, respectively and LC_{95} values were 0.60 and 0.49 mg/l, respectively. The effects on non-target aquatic animals, with no lethal effect to Hoi Kom (*Filopandina martensi martensi*), slightly effects to guppy fish (*Poecilia reticulata*) but highly effects to Pla Sew Kaosan (*Oryzias mekongensis*). Histological studies of the effects of Bayluscide on *B. siamensis goniomphalos* were performed by paraffin sections and hematoxylin-eosin staining. Separation of epithelial layer of digestive tracts and muscle layers were clearly defined in the treated groups. Cells of digestive glands were swollen, shrinkage of calcium cells and their lumens become narrower while no changes in other tissues compared to the control group.

*Student, Master of Science, Program in Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

**Corresponding Author, Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

***Ph.D. Students Program in Parasitology

****Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

*****Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

*****Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University

Molluscicidal Effects of Bayluscide (niclosamide) on *Bithynia siamensis goniomphalos*, First Intermediate Host of Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini*

**ผลของการฆ่าหอยของเบลูไซด์ (นิโคลซามาไมด์) ต่อหอยไซ
(*Bithynia siamensis goniomphalos*) โฮสต์กลางที่ 1
ของพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini***

Chalida Thammasiri (ชลิดา ธรรมศิริ)* Dr.Smarn Tesana (ดร.สมาน เทศนา)**

Apiporn Suwannatrai (อภิพร สุวรรณไตรย์)*** Supawadee Piratae (สุภาวดี ปิระเต)***

Panita Khampoosa (พนิดา คำภูษา)*** Jutharat Kulsantiwong (จุฑารัตน์ กุลสันติวงศ์)***

Sattracthai Prasopdee (ศาสตราชัย ประสพดี)*** Dr.Wipaporn Ruangjirachuporn (ดร.วิภากรณ์ เรืองจิระชูพร)****

Dr.Varima Wongpanich (ดร.วิริมา วงศ์พานิชย์)***** Dr.Pairat Tarbsripair (ดร.ไพรัช ทาบสีแพร)*****

ABSTRACT

The effects of Bayluscide were studied on both immature and adults *Bithynia siamensis goniomphalos* for its molluscicidal efficiency. The lethal concentration (LC_{50}) values of immature and adults were 0.28 and 0.17 mg/l, respectively and LC_{95} values were 0.60 and 0.49 mg/l, respectively. The effects on non-target aquatic animals, with no lethal effect to Hoi Kom (*Filopaludina martensi martensi*), slightly effects to guppy fish (*Poecilia reticulata*) but highly effects to Pla Sew Kaosan (*Oryzias mekongensis*). Histological studies of the effects of Bayluscide on *B. siamensis goniomphalos* were performed by paraffin sections and hematoxylin-eosin staining. Separation of epithelial layer of digestive tracts and muscle layers were clearly defined in the treated groups. Cells of digestive glands were swollen, shrinkage of calcium cells and their lumens become narrower while no changes in other tissues compared to the control group.

*Student, Master of Science, Program in Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

**Corresponding Author, Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

***Ph.D. Students Program in Parasitology

****Assistant Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

*****Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

*****Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเบลูไซด์ ต่อหอยไซ (Bithynia siamensis goniomphalos) โดยหาประสิทธิภาพการฆ่าหอย ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ฆ่าลูกหอย และตัวเต็มวัยได้ร้อยละ 50 (LC_{50}) ที่ 0.28 และ 0.17 และค่าความเข้มข้นที่ฆ่าลูกหอย และตัวเต็มวัยได้ร้อยละ 95 (LC_{95}) ได้แก่ 0.60 และ 0.49 มก/ล ตามลำดับ ผลต่อการมีชีวิตรอดของสัตว์น้ำที่ไม่ใช่เป้าหมาย พบว่าไม่มีผลต่อ หอยขม (*Filopaludina martensi martensi*) มีผลต่อปลาช่อนขาวสารแคระ (*Oryzias mekongensis*) มากที่สุด รองลงมาเป็นปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหอย *B. siamensis goniomphalos* หลังจากสัมผัสสารเคมีโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าเยื่อทางเดินอาหารมีรอยแยกกับกล้ามเนื้อ เซลล์ช่องต่อมย่อยอาหารบวม เซลล์เคลือบเยื่อหุ้ม และท่อของต่อมย่อยอาหารตีบแคบลง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เนื้อเยื่ออื่นๆ

Key Words : *Opisthorchis viverrini*, Bayluscide, *Bithynia siamensis goniomphalos*, Lethal concentration

คำสำคัญ : พยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* เบลูไซด์ หอยไซ *Bithynia siamensis goniomphalos* Lethal concentration

Introduction

Bithynia siamensis goniomphalos a fresh-water snail, plays role as first intermediate host of liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Opisthorchiasis is still an important public health problem in many parts of Southeast Asia including Thailand, Lao People's Democratic Republic, Cambodia and South of Vietnam (Ditrich *et al.*, 1990; Jongsuksuntigul and Imsomboon, 1998; Le *et al.*, 2006). It was the causative of hepatobiliary diseases such as cholangitis, obstructive jaundice, hepatomegaly, cholecystitis, and cholelithiasis (Sripa, 2003). Furthermore, both experimental and epidemiological evidences strongly implicate that liver fluke infection was the major risk factor of cholangiocarcinoma, the cancer of the epithelial bile ducts (Thamavit *et al.*, 1994; Sriamporn *et al.*, 2004). Cholangiocarcinoma in Khon Kaen province was remarkable highest incidence as 93.8 to 317.6 per 100, 000 person-years by age-standardized over 35 years of age (Sriamporn *et al.*, 2004).

O. viverrini adult worms resided in the intra- hepatic bile ducts rather than in extra-hepatic bile ducts *i.e.* gall bladder and the pancreatic duct of definitive and reservoir hosts. Adult female worms laid eggs and passed with faeces into the external environment, the fresh water reservoir. After mature embryonated eggs were eaten by *Bithynia siamensis goniomphalos*, the first intermediate host in northeast Thailand, miracidia were liberated in the digestive tracts then penetrated snail tissue to form sporocysts. Rediae and cercariae were produced by the asexual reproduction subsequently. Then further developing to be metacercariae after they penetrated cyprinoid fish (Harinasuta and Harinasuta, 1984).

B. siamensis goniomphalos is a member of snail in family Bithyniidae. It is an operculate freshwater snail and its habitat is locally in northeast Thailand. Its shell is conic or ovate-conical in shape with delicate spiral lines but no strong sculpture, reddish-brown colour and highly eroded apex. It is separated sex. Its sizes are 10.2-14.9

mm in length and 5.6–8.5 mm in width (Brandt, 1974).

Bayluscide (Niclosamide) is commonly used to control snail population as molluscicide. The lethal effects are widely ranges on snails, cestodes and *Cercariae* by affecting the respiration and the carbohydrate metabolism. It most likely disturbs oxidation processes by inhibiting oxygen uptake. Widely use for molluscicide on the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in paddy fields. In public health purpose, it was used for control the snail intermediate hosts of *Schistosoma* spp. The chemical compound is rapidly degraded in water without long-term effect to aquatic organisms. It is also applied to commercial management of fish ponds in order to clean unwanted fish and snails before re-cultivation new batch of fish. Bayluscide is highly toxic to fish however the applications to fish ponds were practical use due to its short half-life in water and rapidly degraded within a few days before rearing of new fish (World Health Organization, 2006).

The objective of this study was to investigate the molluscicidal concentrations of Bayluscide on *B. siamensis goniomphalos*, the effect to non-target organisms and tissue changes after exposure to the chemical compound.

Materials and methods

Preparation of the *Bithynia siamensis goniomphalos*

B. siamensis goniomphalos was collected from Toong Samg pond, Muang district, Khon Kaen province. The snails were examined for trematode infection at laboratory of Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University by cercarial shedding both at night and

daytime. The non-infected snails were used for the study and were divided into 2 groups as adult snails with shell length 8–15 mm and immature snails with shell length 3–5 mm. (Figure 1). The snails were maintained in laboratory for one week to adapt to laboratory condition and fed with snail food (Kruatrachue *et al.*, 1982) before using.



Figure 1 Shell of *B. siamensis goniomphalos* adult (8–15 mm in length) and immature snails (3– 5 mm. in length)

Preliminary screening of molluscicidal effect of Bayluscide on *B. siamensis goniomphalos*

Preliminary screening of molluscicidal effect of Bayluscide was determined the sublethal and lethal concentrations and also toxicity test were performed by following the procedures of Wangsomnuk, (2005). The snails both of adult and immature, 20 snails/each concentration (5 snails/cup, 4 replicas) were exposed to Bayluscide® (Niclosamide 70% wettable powder, Nanjing Essence Fine-Chemical Co., Ltd., China) in 8 various concentrations of the active ingredient (two fold dilutions) of Bayluscide from 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625 and 0 (control) mg/l in plastic cup. Each cup contained 150 ml of Bayluscide solution (full

volume of cup) then covered with pore lid to prevent escaping of the snails. They were exposed for 24 hours at room temperature (range 26 – 30°C). After exposure, the snails were soaked in dechlorinated tap-water and kept for a period of 24 hours for observation their viability comparing to the control group. The quality of water using in experiment were measured such as temperature, dissolved oxygen, conductivity, salinity, turbidity and pH.

For detection viability of snails was done by needle stimulation, the alive snails would close their opercula. The death snails were protruded out the soft tissue without retraction or lost their opercula. The death snails would not move when leaving in a cup.

Definitive molluscicidal effects on *B. siamensis goniomphalos*

Definitive molluscicidal effects, the Bayluscide concentrations were calibrated due to baseline data of preliminary screening. The lethal (1 mg/l) and sublethal concentrations of Bayluscide were subdivided each interval into 12 concentrations as 1, 0.75, 0.5, 0.375, 0.25, 0.1875, 0.125, 0.09375, 0.062, 0.04685, 0.03125 and 0 (control) mg/l. The exposure of adult and immature snails was done as the procedure in preliminary screening. The mortality of the snails was investigated and recorded during the period of 1, 6, 12 and 24 h. The behavior and macroscopic visible reactions and mortality of the snails were observed and recorded. Lethal concentrations at 50 and 95% (LC_{50} and LC_{95}) were calculated by using Probit Analysis program (Sparks and Sparks, 1986).

Effective concentrations of Bayluscide on non-target aquatic animals

Non-target fresh water animals such as guppy fish (*Poecilia reticulata*), Pla Sew Kaosan (*Oryzias mekongensis*) and Hoi Kom (*Filopaludina martensi martensi*) were tested with 6 Bayluscide concentrations as 0.15 mg/l (sublethal concentration), 0.20 mg/l (LC_{25}), 0.28 mg/l (LC_{50}), 0.38 mg/l (LC_{75}), 0.60 mg/l (LC_{95}) and 0 mg/l (control) of Bayluscide solution (20 aquatic animals/each concentration) and observed the inactive, dead of those animals at 24, 48 and 72 h of exposure times and recorded as accumulative mortality.

Histological examination of the snails after exposure to Bayluscide

Tissue processing and sectioning

Snails were exposed to 6 Bayluscide concentrations as 0.15 mg/l (sublethal concentration), 0.20 mg/l (LC_{25}), 0.28 mg/l (LC_{50}), 0.38 mg/l (LC_{75}), 0.60 mg/l (LC_{95}) and 0 mg/l (control) same as the concentrations which tested to the non-target animals. Twenty four hours after exposure the snails from each group were soaked in dechlorinated tap-water then snails from each batch were removed the operculum and immediately fixed in Bouin's fixative for an hour. After that the soft tissues were removed from the shells by using needles and cut the muscle which tied head-foot portion to the shells. They were fixed overnight in the same fixative. Specimens were washed several times with distilled water then dehydrated with a graded ethanol (50, 70, 80, 95, and 100 % (twice) for an hour each) and clearing in xylene. They were infiltrated with paraffin-alcohol mixtures then embedded in paraffin wax.

The samples were sectioned for 5 μ m thickness and stained with hematoxylin and eosin (Kim *et al.*, 2006).

Statistical Analysis

Number of death of adult and immature snails was analyzed for the relation to the concentrations of Bayluscide by using SPSS version 11.5.

Results

Preliminary screening of molluscicidal effects of Bayluscide on *B. siamensis goniomphalos*

Sublethal concentrations (the lowest concentration without death, 0%) for adult and immature snails were the same (0.03 mg/l) and also lethal concentration (the lowest concentration with all death, 100%) 1.00 mg/l (Table 1). The water quality using in the experiment were measured as following values; temperature 26 °C, dissolved oxygen 0.19 mg/l conductivity 600 μ S/cm, salinity 222 ppm, turbidity 24 NTU and pH 7.2.

Definitive molluscicidal effects on *B. siamensis goniomphalos*

The concentrations of Bayluscide for lethal effects of 50 and 95 % were analyzed from the data of definitive test by Probit Analysis program. For LC_{50} and LC_{95} of adult snails were 0.17 and 0.49 mg/l, respectively. LC_{50} and LC_{95} of immature snails were 0.28 and 0.60 mg/l, respectively (Figure 2). Immature *B. siamensis goniomphalos* was higher tolerant to Bayluscide than adult snails significantly ($P < 0.05$). The number of death snails was increased due to increasing of Bayluscide concentrations ($P < 0.05$).

Effects of Bayluscide on non-target aquatic animals

The effective concentration of Bayluscide on non-target fresh water animals such as guppy fish (*Poecilia reticulata*), Pla Sew Kaosan (*Oryzias mekongensis*), Hoi Kom (*Filopaludina martensi martensi*) were shown the results in Table 2 with ineffectiveness to Hoi Kom, slightly mortality effects to guppy fish and lethal effects to Pla Sew Kaosan.

Table 1 Preliminary screening for the effect of Bayluscide on *B. siamensis goniomphalos* adults and immature snails

Concentrations of Bayluscide (mg/l)	Number of death snails (%)	
	Adult (n=20)	Immature (n=20)
1	20 (100)	20 (100)
0.5	17 (85)	14 (70)
0.25	15 (75)	10 (50)
0.125	13 (65)	4 (20)
0.0625	2 (10)	1 (5)
0.03125	0	0
0.015625	0	0
control	0	0

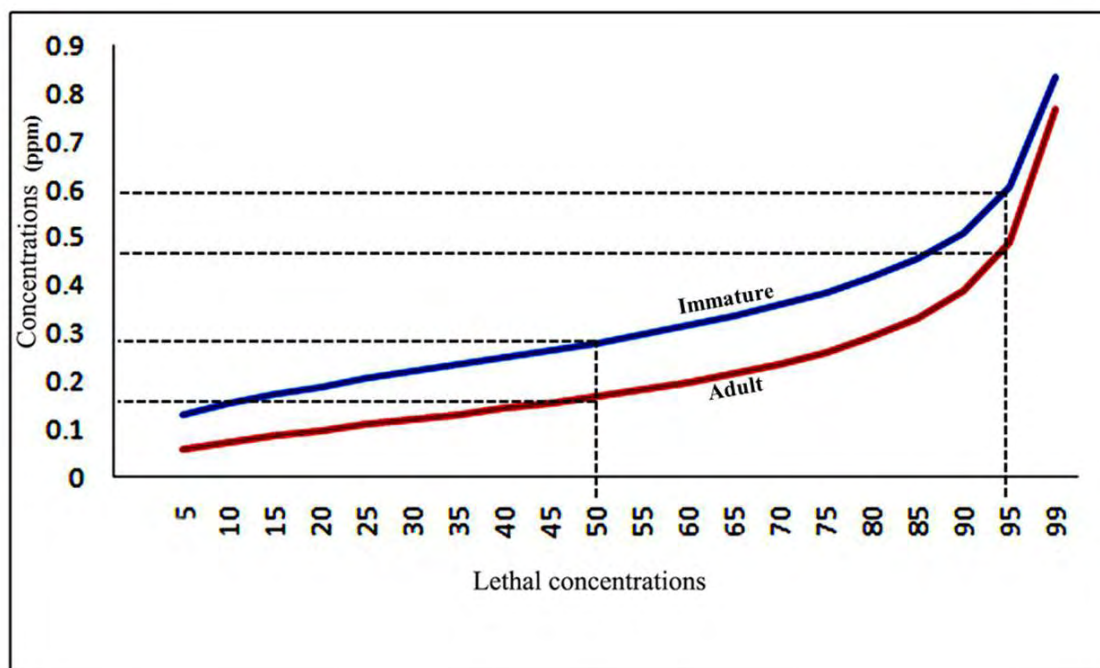


Figure 2 Graph of accumulative number of death of immature and adult of *B. siamensis goniomphalos* related to Bayluscide concentration obtained the data from Probit analysis.

Table 3 The effects of Bayluscide on three kinds of fresh water animals (20 animals/each concentration)

concentration of Bayluscide	Accumulative number of death (Observation at exposure time, h)									
	24					48				
	Hoi Kom	Pla Sew Koasan	Guppy fish		Hoi Kom	Pla Sew Koasan	Guppy fish		Hoi Kom	Pla Sew Koasan
			Male	Female			Male	Female		
0.15 mg/l	0	20	3	0	0	20	3	0	0	20
0.20 mg/l	0	20	5	2	0	20	5	2	0	20
0.28 mg/l	0	20	1	0	0	20	1	0	0	20
0.38 mg/l	0	20	2	0	0	20	2	0	0	20
0.86 mg/l	0	20	10	12	0	20	20	20	0	20
		*	**	***						

* control group, 6 death
** control group, 2 death.
*** control group, 1 death.

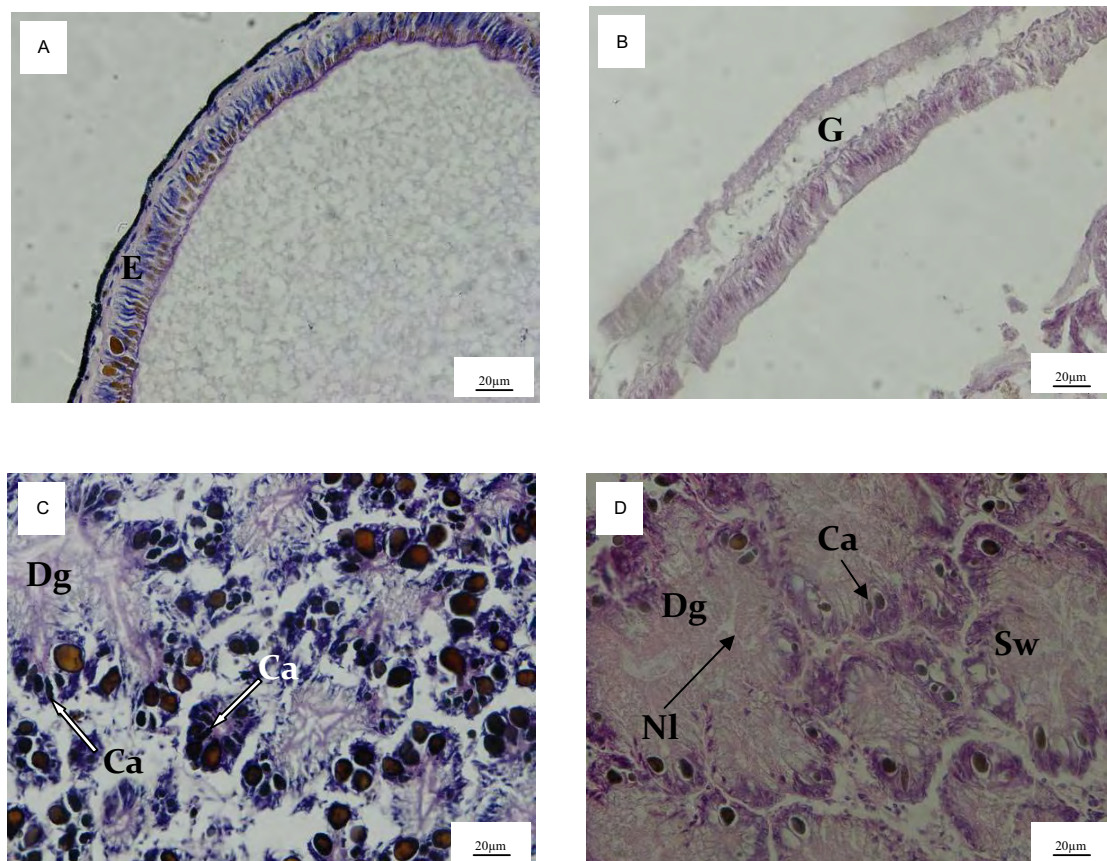


Figure 3 Paraffin -sections of snails stained with hematoxylin and eosin, A: Epithelial lining (E) of digestive tract of control group; B: Separation of epithelial lining from muscle layer showing gap (G) of digestive tract; C: digestive glands (Dg) of control group showing normal calcium cells (Ca); D: swelling of digestive gland (Sw), narrow lumen (NI) of digestive glands and shrinkage of calcium cells (Ca) in treated snails.

Histological changes of the snails after exposed to molluscicide

Histological changes in tissue sections of snails were observed and taken photographs. In digestive tract, epithelial lining was separated from muscle layers showing long gaps with clearly defined in the treated groups (Figure 3 B).

Cells of digestive glands were swollen, shrinkage of calcium cells and their lumen become narrower (Figure 3 D), and no alteration was

found in other tissues compared to the control group.

Discussion and Conclusions

Bayluscide is widely use for snail control for schistosomiasis in African and South American countries, in endemic areas (Giovanelli *et al.*, 2002; Greer *et al.*, 1996; Takougang *et al.*, 2006., 2007).

B. siamensis goniomphalos is operculate snails. It usually crawl on the surface of ground up to 3 meters deep (Suwannatrai et al., manuscript in preparation) or on water plants. Its habitat is more or less different from the snails of schistosome intermediate hosts, such as *Biomphalaria glabrata* for *Schistosoma mansoni* and *Bulinus* sp for *S. haematobium* which were pulmonate snails. They normally float on surface of water or on water plants. When application of molluscicide it was easily contact to those snails directly. The lethal concentration of those snails less than 0.5 mg/l (Greer et al., 1996; Takougang et al., 2006; Takougang et al., 2007) or LC_{50} and LC_{90} (0.007 and 0.175 mg/l, respectively) (Giovanelli et al., 2002) were also lower than *B. siamensis goniomphalos* (0.60 mg/l). Therefore it was different from *B. siamensis goniomphalos* which is operculate snails and lives in deep water and sometime hides under ground in cold season. Therefore the molluscicide may difficult to contact to *B. siamensis goniomphalos*. The size of snails may effect to concentration of Bayluscide such as *Pomacea canaliculata*, big size snails had higher concentrations of LC_{50} and LC_{90} (0.4 and 0.73 mg/l, respectively) (Wangsomnuk, 2005) than in *B. siamensis goniomphalos*. Adult of *B. siamensis goniomphalos* snails were death in greater number than immature snails in the same concentrations of Bayluscide, the same as results of the experiment study in fresh-water snails, the intermediate hosts of schistosomes. The number of death snails increased with the increasing of Bayluscide concentrations in both adult and immature snails (Ali, 2005). But it was different effects on snail host of *Schistosoma mansoni*

which juvenile snails were more susceptible to chemical when compared with adult snails (Arijo et al., 2007). The differences in this present study from previous ones were possibly due to the wide range of snails' size (8–15 mm) which may mix between mature and aged ones.

The effects of Bayluscide on non-target aquatic animals, with no lethal effect to Hoi Kom (*Filopaludina martensi martensi*), slightly effects to guppy fish but highly effected to Pla Sew Kaosan. In the field study, fish, frogs and tadpole were killed at minimal concentrations of 0.25 mg/l of Bayluscide and number of death was increased with the increasing of concentrations (Takougang et al., 2006).

Histological appearance of *B. siamensis goniomphalos* exposed to Bayluscide, showed similar results to *B. glabrata* which showed the separation between epithelial lining and muscle layer. But in this study, there was no change in reproductive organs as in the study on *B. glabrata* which were reductions of spermatozoa and oocyte. Also its lumen of digestive gland of *B. glabrata* became wider (Zhou et al., 1993) but inversed results on the present study.

Acknowledgements

This work is a part of master degree thesis in Parasitology, faculty of Medicine, Khon Kaen University. This study was support by The Thailand Research Fund (TRF) grant no. DBG5080003 and support by grants from Prof. Vitoon Viyanant, Thammasart University.

References

- Ali, TH. 2005. Effects of synthetics molluscicide niclosamide and plant extracts (*Euphorbia* and *Melia*) molluscicide against the different developmental stages of the fresh-water snail *Physa acuta*, the (Draparnaud) vector of trematode parasite in Mosul area, North Iraq. Priorities of scientific research in the Arab World, and specialized domains in Science [serial online] [cited 2009 Feb 15]. Available from: URL: http://www.astf.net/SRO/sro4/english_pages/Eng_9_c.html
- Arijo, AG., Qureshi, TA., and Pathan, ZA., 2007. A studies on chemical control of *S. mansoni* intermediate host. Pak J Biol Sci, 10: 2606-8.
- Brandt, R. 1974. The non marine aquatic Mollusca of Thailand. Archiv Mollusk, 105, 1-143.
- Ditrich, O., Scholz, T., and Giboda, M., 1990. Occurrence of some medically important flukes (Trematoda: Opisthorchiidae and Heterophyidae) in Nam Ngum water reservoir, Laos. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 21(3), 482-8.
- Giovanelli, A., Silva, CL., Medeiros, L., and Vasconcellos, M.C., 2002. The molluscicidal activity of niclosamide (Bayluscide WP70(R)) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). Mem Inst Oswaldo Cruz, 97(5), 743-5.
- Greer, GJ., Tchounwou, PB., Takougang, I., and Monkiedje, A., 1996. Field tests of a village-based mollusciciding programme for the control of snail hosts of human schistosomes in Cameroon. Trop Med Int Health, 1(3), 320-7.
- Harinasuta, C., and Harinasuta, T., 1984. *Opisthorchis viverrini*: life cycle, intermediate hosts, transmission to man and geographical distribution in Thailand. Arzneimittelforschung, 34(9B), 1164-7.
- Jongsuksuntigul, P., and Imsomboon, T., 1998. Epidemiology of opisthorchiasis and national control program in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 29(2), 327-32.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, KA., Powell, EN. 2006. Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, 27, 1-76.
- Kruatrachue, M., Jantataeme, S., Viyanant, V., and Upatham, ES. 1982. Comparative methods of infecting mice with *Schistosoma mekongi*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 13(1), 77-80.
- Le, TH., Van De, N., Blair, D., Sithithaworn, P., and McManus, DP., 2006. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. Exp Parasitol, 112(2), 109-14.

- Sparks, TC., and Sparks, A., 1986. Micro Probit 1987. DowElanco Greenfield. Inc
- Sriamporn, S., et al., 2004. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. Trop Med Int Health, 9(5), 588–94.
- Sripa, B., 2003. Pathobiology of opisthorchiasis: an update. Acta Trop, 88(3), 209–220.
- Takougang, I., Meli, J., and Angwafo, F., 3rd, 2006. Field trials of low dose Bayluscide on snail hosts of schistosome and selected non-target organisms in sahelian Cameroon. Mem Inst Oswaldo Cruz, 101(4), 355–8.
- Takougang, I., Meli, J., Wabo Pone, J., and Angwafo, F., 3rd, 2007. Community acceptability of the use of low-dose niclosamide (Bayluscide), as a molluscicide in the control of human schistosomiasis in Sahelian Cameroon. Ann Trop Med Parasitol, 101(6), 479–86.
- Thamavit, W., Pairojkul, C., Tiwawech, D., Shirai, T., and Ito, N., 1994. Strong promoting effect of *Opisthorchis viverrini* infection on dimethylnitrosamine-initiated hamster liver. Cancer Lett, 78(1–3), 121–5.
- Wangsomnuk, P. 2005. Comparison between crude extract of *Brassia actinophylla* and *Lantana camara* as plant molluscicide. [unpublished]. Research report. Faculty of Science. Khon Kaen University. [in Thai].
- World Health Organization. 2006. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. Sixth edition. World Health Organ Tech Rep Ser, 87–91.
- World Health Organization. 2006 Specifications and Evaluations for public health pesticides niclosamide. World Health Organ Tech Rep Ser [serial online] 2006 [cited 2009 Jan 15]. Available from:URL:<http://www.who.int/whopes/quality/newspecif/en/>.
- Zhou, X., Upatham, ES., Kruatrachue, M., Sretarugsa, P., 1993. Effects of Niclosamide and *Eucaliptus camaldulensis* on *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. J Sci Soc Thailand, 19 (23), 117–128.