

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาอาการท้องแดงในปูทะเลไทย (*Scylla serrata* Forskal 1775): ปัจจัยทางกายภาพ ชีวภาพและพยาธิชีววิทยา

Study of Red Sternum Syndrome in Thai Mud Crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775): Physical, Biological and Path biology Factors

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|--|--|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุว อารีกิจเสรี | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร |
| 2. รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต พิวนิม | ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	1
Executive summary	3
บทนำ.....	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
ระเบียบวิธีการวิจัย.....	8
ขอบเขตการของการวิจัย.....	9
แผนดำเนินงานวิจัย.....	9
เนื้อหางานวิจัย	11
บทนำ.....	11
รายละเอียดของการดำเนินการวิจัย.....	13
ผลการทดลอง.....	19
วิจารณ์การทดลอง.....	39
กิตติกรรมประกาศ.....	43
เอกสารอ้างอิง.....	44
Output ที่ได้รับจากโครงการ	47
ภาคผนวก	48

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. แสดงน้ำหนักและความกว้างของกระดองปูที่ศึกษา.....	21
2. ลักษณะทางภายนอกและภายในของปูปกติกับปูทองแดง.....	22
3. เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในอวัยวะของปูที่มีอาการท้องแดง.....	26
4. จำนวนปูปกติที่ตายในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย.....	33
5. ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปร ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม.....	34
6. แสดงสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม.....	38
7. การวิเคราะห์การถดถอยระหว่างอัตราการตายต่อแพะเรือและอุณหภูมิ ^u น้ำและ อุณหภูมิในอากาศ.....	39

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการวัดปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปู.....	16
2. การเปิดหระดองปู การปลดเนื้อเยื่อ การ swap เชื้อจากบริเวณที่มีลักษณะอาการ โรคท้องแดงลงบนอาหาร.....	18
3. สภาพบ่อเพาะเลี้ยงของปูทะเล โดยเลี้ยงปู 1 ตัวในกรง 1 กรง.....	19
4. ลักษณะภายนอกปูที่มีท้องแดง.....	22
5. จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเชื้อแบคทีเรีย.....	23
6. จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านแสดงเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะของปู.....	24
7. เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในอวัยวะของปูที่มีอาการท้องแดง.....	26
8. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-A.....	28
9. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-A.....	28
10. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-B.....	29
11. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-B.....	29
12. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-D.....	30
13. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-D.....	30
14. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-E.....	31
15. แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-E.....	31
16. ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC5Hep-A...32	
17. ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC5Hep-B...32	
18. ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC5Hep-D...32	
19. ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC5Hep-E...32	
20. Box plot ของตัวแปร ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็มและออกซิเจนในน้ำ.....	36
21. อัตราการตายเฉลี่ยของปู ต่อ 1 แพเรือ ตามลำดับเวลาเก็บข้อมูล.....	37

รหัสโครงการ: MRG5080103

ชื่อโครงการ: ศึกษาอาการท้องแดงในปูทะเลไทย (*Scylla serrata* Forskal 1775):

ปัจจัยทางกายภาพ ชีวภาพและพยาธิชีววิทยา

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรา อารีกิจเสรี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

E-mail address: Maijackee@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษาความผิดปกติของปูทะเลไทย (*Scylla serrata* Forskal 1775) จากฟาร์มเลี้ยงปูในจังหวัดสมุทรสงคราม ประเทศไทย ที่มีอาการโรคท้องแดง พบว่าร่างกายส่วนนอกคือบริเวณข้อต่อของขาที่มีสีแดง ปูที่มีอาการท้องแดงนั้นมีอาการเชื้องซึม เคลื่อนที่น้อยและตายในที่สุด เมื่อเจาะ haemolymph มาตรวจสอบและพบว่า haemolymph ของปูที่มีอาการท้องแดงแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ haemolymph สีส้ม สีส้มขาวและสีขาวคล้ายนํ้านม จากนั้นได้ศึกษาอวัยวะภายในของปูที่มีอาการท้องแดงพบว่าอวัยวะภายในมีผล สีซีดและเมื่อตัดเนื้อเยื่อจาก 7 อวัยวะ ที่ประกอบด้วย ส่วนที่ปกคลุมของร่างกาย ตับ เหงือก กล้ามเนื้อท้อง กล้ามเนื้อก้ามปู กระเพาะอาหารและกล้ามเนื้อหัวใจ นำไปศึกษาทางกายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าปูที่มีอาการของโรคทุกระยะมีการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่ง แท่งโค้งงอและลักษณะกลมจากการศึกษาทางจุลชีววิทยาของปูที่มีอาการท้องแดงสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียในปูปกติ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปูที่มีอาการท้องแดงเรียงจากที่มีอาการมากไปสู่น้อยคือปูที่มี haemolymph สีขาวคล้ายนํ้านม ปูที่มีนํ้าเลือดสีส้มขาวและปูที่มีนํ้าเลือดสีส้ม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการที่ปูติดเชื้อจากแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด จากการศึกษาคาดว่าเชื้อแบคทีเรียอาจเข้าไปภายในร่างกายโดยเข้าไปกับนํ้าทะเลผ่านจากเหงือกแล้วเข้าสู่กระแสเลือดและไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ ผลจากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูต่ออัตราการตายของปู โดยใช้ตัวแปร 7 ตัวแปรคือ ความเป็นกรด-ด่างของนํ้า การวัดแสงที่ผิวนํ้า การวัดแสงที่ใต้นํ้า ความโปร่งแสงของนํ้า อุณหภูมิในนํ้าและอุณหภูมิอากาศ ความเค็มของนํ้า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในนํ้าและความเข้มแสงบริเวณบ่อเลี้ยง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Stepwise method of variable selection พบว่าได้แม่แบบ (model) คือ $ratio = 8.518 - 0.236tempair$ ได้แสดงว่าอุณหภูมิอากาศที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงปูเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่ออัตราการตายของปู (มีผลเพียง 10.10% ซึ่งถือว่าเมื่อเทียบไปแล้วแทบจะไม่มีผลต่อการตายของปู) ส่วนปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ไม่มีผลต่อการตายของปูแต่อย่างใด

Project Code: MRG5080103

Project Title: Study of Red Sternum Syndrome in Thai Mud Crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775): Physical, Biological and Pathobiology Factors

Investigator: Assist. Prof. Dr. Mayuva Areekijseeree

E-mail address: Maijackee@yahoo.com

Project Period: 2 years

Abstract

Observation of abnormal mud crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775), red sternum character, was carried out by collecting samples from crab farms in Samutsongkhram Province, Thailand. These crabs had soft carapaces, red chelae and joints, pale hepatopancreases, gills, and loose muscles. They also appeared less movement, and finally died. Examination of haemolymph revealed 3 broad stages of the syndrome, namely, orange, orange-white, and milky-white in colors. To identify the cause of syndrome, haemolymph and 7 organs of mud crabs; integuments, hepatopancreases, gills, abdominal muscles, claw muscles, stomachs, and hearts were dissected and histopathologically examined using transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM). Closer examination found infection of rod-, curve rod-, and coccus-shape bacteria in all investigated organs and haemolymph. Isolation of microorganisms from the infected tissues of red sternum syndrome crabs resulted in 4 types of bacteria. No any microorganism growth observed in the normal crabs. The severity of the red sternum syndrome was in the order from milky-white, orange-white, and orange, respectively. This was in agreement with more than one type of bacterial infections found. It was postulated that the bacteria entered the crabs via gills, migrated through circulation, before reaching these organs. The result from physical factors showed the first-order regression model based on all predictor variables was fitted. The analysis was performed to relate the ratio of death mud crabs to these 7 environmental factors (pH, transparency, water temperature, air temperature, salinity, dissolved oxygen and light density) using stepwise method of variable selection. The model was $ratio = 8.518 - 0.236temp_{air}$. Temperature of air was the only parameter (from the selected environmental parameters) affecting the ratio of death mud crab accounting for 10.10%. Variation in other factors, not in the extent of this study, could be likely to have contributed to the residual variation in the data set.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ 2550
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1. ชื่อโครงการ: ศึกษาอาการท้องแดงในปูทะเลไทย (*Scylla serrata* Forskal 1775): ปัจจัยทางกายภาพ ชีวภาพและพยาธิชีววิทยา

: Study of Red Sternum Syndrome in Thai Mud Crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775): Physical, Biological and Pathobiology Factors

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุภา อารีกิจเสรี

2.1 สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ วิทยาเขตพระราชวังสนาม

จันทร์ อำเภอมะนัง จังหวัดนครปฐม 73000

โทรศัพท์ 034-243429, 034-273 045-6

โทรสาร 034-255820 โทรศัพท์มือถือ 081-4937640

E-mail: maijackee@yahoo.com

2.2 ที่อยู่ 83/18 หมู่บ้านราชวดี ซอยพุทธบูชา 36 ถนนพุทธบูชา

ตำบลบางมด อำเภอทุ่งครุ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10140

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย: สาขาชีววิทยา

5. ระยะเวลาดำเนินงาน: 2 ปี

6. บทนำเรื่องปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของไทยที่มีมูลค่าการส่งออกสูง ซึ่งจากรายงานของกรมประมงต่างประเทศ กรมประมง (สรุปรายงานในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2548) พบว่าการส่งออกปูทะเลของไทยตลอดปีพ.ศ. 2547 นั้นมีมูลค่าสูงถึง 5,200 ล้านบาท ซึ่งเห็นได้ว่าปูเป็นสัตว์ทะเลที่ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปูมีรายได้ที่มั่นคง ตลอดจนปูทะเลเป็นอาหารโปรตีนที่ผู้คนในประเทศนิยมบริโภคเป็นอย่างมากเพราะรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่การทำฟาร์มเพาะเลี้ยงปูทะเลในไทยนั้นเกษตรกรยังพบปัญหาที่ทำให้ผลผลิตของปูลดลงอย่างมาก โดยปูทะเลที่เพาะเลี้ยงเกิดอาการท้องแดงและเมื่อเจาะ haemolymph พบว่า haemolymph ของปูเป็นสีส้มอ่อน สีส้มเข้ม ตลอดจนเป็นสีส้มขาวถึงสีขาวขุ่น (สีคล้ายน้ำมัน) ปูที่มีอาการนี้จะเคลื่อนไหวช้าลง เชื่องซึม สุดท้ายไม่เคลื่อนไหวและตายในที่สุด และเมื่อนำปูที่มีอาการของโรคนี้ไปปรุงอาหาร เนื้อปูนั้นจะทาน

ไม่ได้เพราะมีรสขมจึงทำให้เกษตรกรขายปูนี้ไม่ได้ จึงทำให้มีรายได้น้อยกว่าที่ควรจะได้รับ สาเหตุของอาการท้องแดงนั้นยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อนว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร เนื่องจากการเพาะเลี้ยงนั้นมีปูจำนวนหนึ่งมีอาการท้องแดงแต่ก็ไม่ได้เป็นกับปูทั้งหมดและจากการสืบค้นข้อมูลจากต่างประเทศทำให้ทราบว่า ปูที่มีอาการท้องแดงนั้นมีอาการคล้ายกับปูที่เป็นโรค Bitter crab disease (BCD) ในปู snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Taylor และ Khan, 1995) หรือ Pink crab disease (PCD) ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) (Stentiford และคณะ, 2002; Stentiford และคณะ, 2003) ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. และเมื่อนำปูมาปรุงอาหารจะมีรสขมเช่นกัน (Meyer และคณะ, 1987; Taylor และ Khan, 1995) สำหรับเชื้อ *Hematodinium* sp. จัดเป็นพาราสิตชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพวก crustaceans ยกตัวอย่างเช่น การแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. ต่อการประมงของปูและกุ้ง โดยเชื่อดังกล่าวจะอาศัยอยู่ในไข กระเพาะอาหาร เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและช่องภายในลำตัวของโฮสต์ Shields (1994) Stentiford และคณะ (2002) รายงานว่าปู edible crab (*Cancer pagurus*) ที่เป็นโรค PCD มีโครงสร้างของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อตับที่แตกต่างจากโครงสร้างปกติตรงเซลล์ที่เรียกว่า tubule cells ของตับและไม่พบเซลล์ไขมัน นอกจากนี้ Stentiford และคณะ (2003) ยังรายงานในปีต่อมาถึงการพบการติดเชื้อร่วมกันของ *Hematodinium* sp และยีสต์ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) และ velvet swimming crabs (*Necora puber*) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการติดเชื้อหรือมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคดังกล่าวเลย

นอกจากนี้ยังมีรายงานการระบาดของเชื้อรา *Legionidium* spp. และ *Sirolpidium* spp. (<http://inco-cams.seafdec.or.ph/camshwp1.html>) Chukanhom และ Hatai (2004) รายงานการติดเชื้อของไขปู โดยเชื้อรา *Saprolegnia*, *Achlya* และ *Allomyces* และ Boeger และคณะ (2005) รายงานการระบาดของโรค Lethargic crab disease ซึ่งมีสาเหตุมาจากราในดิวิชั่น Ascomycota ในปู mangrove crab (*Ucides cordatus*) นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้อีกว่า อาจจะมีโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Aphanomyces*, *Leptolegnia* และ *Fusarium* ที่เกิดขึ้นได้กับไขปู เนื่องจากเชื้อราเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำและไข่ของสัตว์น้ำได้หลายชนิด เช่น ปู กุ้ง ปลา และกบ เป็นต้น (Rand, 1996 Park และคณะ, 1978) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโรคที่เกิดจากจุลชีพจึงเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการฟักตัวอ่อนและสามารถก่อให้เกิดโรคในตัวอ่อนได้ (Lindner, 2005)

นอกเหนือจากการสำรวจจุลชีพที่ติดเชื้อในปูทะเลแล้ว การสำรวจตรวจสอบผลทาง

กายภาพของภาพแวดล้อมและบริเวณรอบๆ ที่เพาะเลี้ยงปูก็มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสภาพแวดล้อมจะมีการแปรผันอยู่ตลอดเวลาแม้ภายในปีเดียวกัน เช่นความแตกต่างของอากาศในแต่ละฤดูกาลอาจมีความผันผวนทางอากาศที่ไม่เหมือนกัน ความแปรผันทางสภาพแวดล้อมนี้ส่งผลให้ปูทะเลต้องมีการปรับตัวในการดำรงชีวิตอยู่ตลอดเวลา ซึ่งข้อมูลของระบบนิเวศวิทยานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างหนึ่งที่ใช้ในสำรวจหาสาเหตุของการเกิดโรคในปูทะเล ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค กลไกการติดเชื้อรวมไปถึงการแพร่ระบาดของเชื้อโรคอีกด้วย

จากปัญหาและข้อมูลทั้งหมดที่รวบรวมได้ การศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงทำให้สามารถหาวิธีทางป้องกันและหาทางรักษาโรคได้ และเนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงการติดเชื้อดังกล่าว ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานขั้นแรก แต่มีความสำคัญเพื่อมุ่งเป้าใหญ่ในการที่จะก่อประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตปูในอนาคต ในการศึกษาและการหาสาเหตุของโรคที่เกิดกับปูทะเลได้ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะเลี้ยงที่มีความผันแปรพร้อมกับการศึกษาสภาพพยาธิชีววิทยาของอาการโรคในปูโดยใช้ความรู้ทางจุลกายวิภาคศาสตร์และการใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการแยกเชื้อจุลินทรีย์แล้วนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมศึกษาทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อปูที่มีอาการท้องแดง ทำวิจัยรวบรวมข้อมูลในการวิเคราะห์หาวงจรของการเกิดโรค โดยต้องสังเกตการเพิ่มขึ้นและลดลงของอาการของโรคในแต่ละช่วงเวลาของปีและต้องศึกษาว่าอาการของโรคมีความสัมพันธ์กับกับภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยงในแต่ละช่วง เวลาหรือไม่ อย่างไร แต่อย่างไรก็ตามถ้าอาการของโรคไม่ได้เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ก็อาจเกิดจากอาหารหรือแร่ธาตุหรืออะไรก็ตามที่ปูได้รับในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทำวิจัยนี้ นับว่าเป็นข้อมูลที่มีค่าอย่างมากในการศึกษาวิจัยต่อไปถึงการหาทางป้องกันและการศึกษาการยับยั้งการเจริญหรือการก่อโรคตลอดจนหาสาเหตุของโรคที่แท้จริงได้

7. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยขั้นแรกเพื่อค้นหาสาเหตุของปูที่มีอาการท้องแดงโดยผสมความรู้ทางจุลกายวิภาคศาสตร์และทางจุลชีววิทยา เพื่อศึกษาพยาธิสภาพทั้งภายนอกและภายในอวัยวะต่างๆ เช่น เหงือก กล้ามเนื้อ ตับ หัวใจและส่วนปกคลุมร่างกายของปูที่มีอาการโรค ศึกษาพยาธิสภาพเชิงลึกของของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ โดยศึกษาว่าการติดเชื้อนี้เกิดจากจุลินทรีย์ใดสัณฐานวิทยาและรายละเอียดของจุลินทรีย์เป็นอย่างไร การติดเชื้อได้เกิดขึ้นในอวัยวะใดแล้วได้แพร่เชื้อในอวัยวะใดบ้าง โดยเชื้อจุลินทรีย์นี้ไปมีผลต่ออวัยวะภายในเซลล์หรือไม่ อย่างไร รวมทั้งได้ศึกษาสภาพแวดล้อมของฟาร์มเพาะเลี้ยงในตลอดช่วงปี ซึ่งจะได้ข้อมูลที่มีค่า สามารถใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคดังกล่าว เพื่อให้บรรลุถึงเป้าหมาย

ใหญ่ คือการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำชนิดนี้ต่อไป ซึ่งงานวิจัยในขั้นแรกประกอบด้วยวัตถุประสงค์ย่อยๆ คือ

7.1 เพื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูทะเล คือศึกษาสภาพของบ่อเพาะเลี้ยงที่ปูอาศัยอยู่ในช่วงปี

7.2 เพื่อศึกษาลักษณะภายนอกทั่วไปของปูที่มีอาการท้องแดง

7.3 เพื่อศึกษาพยาธิชีววิทยาเชิงลึกของอวัยวะที่สำคัญของปูที่มีอาการท้องแดง

7.4 เพื่อศึกษาเชื้อจุลชีพที่พบในอวัยวะที่สำคัญของปูที่มีอาการท้องแดง

8. ระเบียบวิธีการวิจัย

8.1 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูในรอบปี

สถานที่ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปู ศึกษาที่ฟาร์มเลี้ยงปูในจังหวัดสมุทรสงคราม โดยบ่อที่เพาะเลี้ยงมีขนาดกว้าง 100 เมตร และยาว 80 เมตร ความลึก 2 เมตร ในแต่ละบ่อเพาะเลี้ยงมีการระบายน้ำเข้าออกอย่างดีโดยมีประตูระบายน้ำสองด้าน ในหนึ่งบ่อมีการเพาะเลี้ยงปูประมาณ 6,000-7,000 ตัว การเพาะเลี้ยงเลี้ยงแยกหนึ่งตัวต่อ 1 กรง ซึ่งกรงมีลักษณะเป็นตะกร้าโปร่งทำด้วยพลาสติกมีฝาปิด มีขนาดประมาณ 16x18 เซนติเมตร และกรงลอยอยู่ในแพเรือที่อยู่ระดับพื้นน้ำ โดยศึกษาปัจจัยที่สำคัญดังต่อไปนี้

8.1.1 แสงที่ผิวและใต้น้ำ โดยวัดความเข้มข้นของแสงด้วยเครื่อง Radiometer เพื่อวัดพลังงานการส่องสว่างของแสงหรือใช้ Spectroradiometer วัดพลังงานของแสงที่ความยาวช่วงคลื่นจำเพาะ

8.1.2 วัดความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) โดยใช้เครื่อง Secchi-disc

8.1.3 วัดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือวัดอุณหภูมิสำเร็จรูปสำหรับวัดในน้ำสิ่งแวดล้อม

8.1.4 วัดความเค็มของน้ำ โดยใช้เครื่องมือ Refractometer

8.1.5 วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยวิธีทางอิเล็กทรอนิกส์ใช้หัววัดปริมาณออกซิเจน (Oxygen electrode) ในเครื่องมือที่เรียกว่า Dissolved oxygen meter หรือ DO meter

8.1.6 วัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำ โดยใช้เครื่อง pH meter

8.2 ศึกษาพยาธิสภาพเชิงลึกของของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อคือ เหงือก กล้ามเนื้อ ตับ หัวใจ และส่วนปกคลุมร่างกายของปูที่มีอาการของโรค โดยศึกษาว่าการติดเชื้อนี้เกิดจากจุลชีพใด สัตววิทยาและรายละเอียดของจุลชีพเป็นอย่างไร การติดเชื้อได้เกิดขึ้นในอวัยวะใด โดยเชื้อจุลชีพนี้ไปมีผลต่ออวัยวะภายในเซลล์หรือไม่และอย่างไร การศึกษาอาจใช้เทคนิคทาง histology โดยเทคนิคที่ใช้คือ

8.2.1 เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) มีรายละเอียดของวิธีการดำเนินงานคือ

ก. การเตรียมตัว haemolymph ของปูที่จะศึกษาซึ่งมีอาการโรค นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำโดยจัดการปูให้สลบด้วยการแช่ในน้ำใส น้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 15 นาที

ข. เมื่อปูสลบให้ตัดกระดองและส่วนที่ปกคลุมของร่างกายออก ตัดอวัยวะภายในที่ต้องการศึกษา เช่น ตับ เหงือก กล้ามเนื้อ กระเพาะและหัวใจเป็นชิ้นขนาด 2 ถึง 5 มิลลิเมตร รักษาสภาพด้วยกลูทารอลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วล้างตัวอย่างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ครั้งละ 10 นาที ทำ 2 ครั้ง

ค. ดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 50, 70, 80, 90 เปอร์เซ็นต์และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที

ง. ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤติด้วยเครื่องทำให้แห้ง ณ อุณหภูมิวิกฤติ (Critical point dryer machine)

จ. ติดตัวอย่างบนที่รองตัวอย่างด้วยเทปคาร์บอน (carbon tape) นำตัวอย่างใส่ในเครื่องเคลือบทอง (ion sputter) เคลือบทองให้มีความหนา 20 นาโนเมตร นำตัวอย่างศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 10 kV. พร้อมบันทึกภาพ

8.2.2 เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope: TEM) มีวิธีการคือ

ก. การเตรียมตัวอย่างอวัยวะที่สำคัญของปูที่มีอาการโรคทำโดยจัดการปูให้สลบด้วยการแช่ในน้ำใส น้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 15 นาที เมื่อปูสลบให้ตัดกระดองและส่วนที่ปกคลุมของร่างกายออก ตัดอวัยวะภายในที่ต้องการศึกษาคือ ตับ เหงือก กล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อท้อง กระเพาะและหัวใจเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิเมตร

ข. ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 Phosphate buffer pH 7.2 จากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำยารักษาสภาพครั้งแรก (primary fixative) ด้วยน้ำยากลูทารอลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 24 ชั่วโมง

ค. เมื่อครบเวลา ให้ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 แล้วรักษาสภาพตัวอย่างครั้งที่สอง (secondary fixative) ด้วยออสเมียมเตตระออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างออสเมียมเตตระออกไซด์ออกด้วยน้ำกลั่น (distilled water) 3 ครั้ง

ง. ตึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอะซิโตน (acetone) แล้วฝังชิ้นตัวอย่างใน spurr resin ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยการนำตัวอย่างไปเข้าตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน และย้ายเข้าตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

จ. ตัดตัวอย่างให้บางด้วยเครื่องตัดตัวอย่าง (Ultramicrotome) ให้ได้ความหนา 60 นาโนเมตร แล้วซ้อนตัวอย่างวางบน grid

ฉ. ย้อมตัวอย่างที่ตัดบาง (Thin section) ตัวอย่างด้วย 0.5 % Uranyl acetate และ Lead citrate เพื่อเพิ่มความเปรียบต่าง (contrast) ของตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 80 kV. พร้อมบันทึกภาพ

8.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อจากอวัยวะที่มีอาการท้องแดงและได้แยกบริสุทธิ์แล้วเก็บเป็น stock culture

8.3.1 สืบหาลักษณะทางคลินิก (clinical sign) และทำการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณที่สงสัยเพื่อตรวจฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)

8.3.2 ทำการ swap เชื้อจากบริเวณที่มีลักษณะของอาการโรคท้องแดง เช่น บริเวณแผลลงสู่อาหารสูตร Marine agar (MA) และอาหารสูตร Thiosulphate citrate bile sucrose (TCBS) agar สำหรับบริเวณที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรีย

8.3.3 แยกบริสุทธิ์เชื้อและเก็บเป็น stock culture

นำอวัยวะจากปูที่มีอาการท้องแดงและยังมีชีวิตอยู่มาบดในสารละลาย normal saline และทำการ spread plate ลงในอาหารสูตร Nutrient agar (NA) ที่ผสม 15 ppt ของ NaCl และ Thiosulphate Citrate bile sucrose (TCBS) agar ที่ผสม 15 ppt ของ NaCl และบ่มในตู้บ่มเชื้อ

8.3.4 ตรวจหาชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ข้อมูลที่ศึกษาลักษณะทางฐานวิทยาและทาง Molecular biology

8.4 สถานที่ทำการศึกษา

8.4.1 ห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

8.4.2 ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

8.4.3 ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

8.4.4 ฟาร์มเลี้ยงปูในจังหวัดสมุทรสงคราม

9. ขอบเขตการของการวิจัย

งานวิจัยจะทำภายใต้ขอบเขตดังนี้

9.1 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูในรอบปี จะออกแบบการศึกษาเป็นช่วงๆ ในรอบปี ซึ่งจะศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่สมควรและเหมาะสม

9.2 การศึกษาสภาพทางพยาธิชีววิทยาของเนื้อเยื่อที่สำคัญเช่น ตับ เหงือก กล้ามเนื้อ กระเพาะอาหาร และหัวใจ ที่มีอาการของโรค (อาจศึกษาอวัยวะมากกว่าหรือน้อยกว่านี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ดีและเหมาะสมที่สุด) โดยจะใช้เทคนิคทาง histology เช่น เทคนิคทาง LM, SEM หรือ TEM หรืออาจมีวิธีอื่นๆ ที่ทันสมัยเพิ่มเติมแล้วแต่กรณี ซึ่งอาจใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งหรือใช้ร่วมกันแล้วแต่กรณีเพื่อให้ได้ผลสำเร็จของงานที่ดีที่สุด

9.3 การศึกษาการจำแนกเชื้อที่พบในอวัยวะที่ศึกษาของปูที่มีอาการท้องแดง โดยจะทำการแยกบริสุทธิ์และเก็บเป็น stock culture และทำการตรวจหาชนิดของจุลชีพ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและใช้ Biochemical test หรือ Molecular biology เพื่อผลสำเร็จของงานที่ดีที่สุด

10. แผนดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 2 ปี

แผนงานวิจัย	เดือนที่							
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24
1. สืบค้นข้อมูล จัดซื้อของ เตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ	↔				↔			
2. ออกภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างทางกายภาพของฟาร์มและเก็บตัวอย่างปู	←						→	
3. ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูในรอบปี	←					→		
4. วิเคราะห์ผลสำรวจทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปู	←						→	
5. ศึกษาสภาพพยาธิชีววิทยาของเนื้อเยื่อ ที่สำคัญปูที่มีอาการของโรค							↔	→

โดยเทคนิคทาง histology 6. การจำแนกเชื้อที่พบในอวัยวะและ เลือดของปูที่มีอาการท้องแดง 7. เตรียม manuscript และ poster เพื่อส่งตีพิมพ์และนำเสนอผลงาน ระดับนานาชาติ 8. เขียนรายงานประจำ 6 เดือน รายงานประจำปีและรายงานฉบับ สมบูรณ์								
	←						→	
				↔				↔
				↔				↔

เนื้อหาทางวิจัย

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ 2550

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

การศึกษาอาการท้องแดงในปูทะเลไทย (*Scylla serrata* Forskal 1775): ปัจจัยทาง กายภาพ ชีวภาพและพยาธิชีววิทยา

1. บทนำ (Introduction) ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของไทยที่มีมูลค่าการส่งออกสูง ซึ่งจากรายงานของกองประมงต่างประเทศ กรมประมง (สรุปรายงานในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2548) พบว่าการส่งออกปูทะเลของไทยตลอดปี พ.ศ. 2547 นั้นมีมูลค่าสูงถึง 5,200 ล้านบาท ซึ่งเห็นได้ว่าปูเป็นสัตว์ทะเลที่ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปูมีรายได้ที่มั่นคง ตลอดจนปูทะเลเป็นอาหารโปรตีนที่ผู้คนในประเทศนิยมบริโภคเป็นอย่างมากเพราะรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่การทำฟาร์มเพาะเลี้ยงปูทะเลในไทยนั้นเกษตรกรยังพบปัญหาที่ทำให้ผลผลิตของปูลดลงอย่างมาก โดยปูทะเลที่เพาะเลี้ยงเกิดอาการท้องแดง และเมื่อเจาะ haemolymph พบว่า haemolymph ของปูเป็นสีส้มอ่อน สีส้มเข้ม ตลอดจนเป็นสีส้มขาวถึงสีขาวขุ่น (สีคล้ายน้ำมัน) ปูที่มีอาการนี้จะเคลื่อนไหวช้าลง เชื่องซึม สุดท้ายไม่เคลื่อนไหวและตายในที่สุด และเมื่อนำปูที่มีอาการของโรคนี้ไปปรุงอาหาร เนื้อปูนั้นจะทานไม่ได้เพราะมีรสขมจึงทำให้เกษตรกรขายปูนี้ไม่ได้ จึงทำให้มีรายได้น้อยกว่าที่ควรจะได้รับ สาเหตุของอาการท้องแดงนั้นยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อนว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงนั้นมีปูจำนวนหนึ่งมีอาการท้องแดงแต่ก็ไม่ได้เป็นกับปูทั้งหมด และจากการสืบค้นข้อมูลจากต่างประเทศทำให้ทราบว่า ปูที่มีอาการท้องแดงนั้นมีอาการคล้ายกับปูที่เป็นโรค Bitter crab disease (BCD) ในปู snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Taylor และ Khan, 1995) หรือ Pink crab disease (PCD) ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) (Stentiford และคณะ, 2002; Stentiford และคณะ, 2003) ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. และเมื่อนำปูมาปรุงอาหารจะมีรสขมเช่นกัน (Meyer และคณะ, 1987; Taylor และ Khan, 1995) สำหรับเชื้อ *Hematodinium* sp. จัดเป็นพาราสิตชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพวก crustaceans ยกตัวอย่างเช่น การแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. ต่อการประมงของปูและกุ้ง โดยเชื่อกันว่าจะอาศัยอยู่ในไข่ ภาวะอาหาร เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและช่องภายในลำตัวของโฮสต์ Shields (1994) Stentiford และคณะ (2002) รายงานว่าปู edible crab (*Cancer*

pagurus) ที่เป็นโรค PCD มีโครงสร้างของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อที่แตกต่างจากโครงสร้างปกติตรงเซลล์ที่เรียกว่า tubule cells ของตับและไม่พบเซลล์ไขมัน นอกจากนี้ Stentiford และคณะ (2003) ยังรายงานในปีต่อมาถึงการพบการติดเชื้อร่วมกันของ *Hematodinium* sp และยีสต์ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) และ velvet swimming crabs (*Necora puber*) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการติดเชื้อหรือมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคดังกล่าวเลย

นอกจากนั้นยังมีรายงานการระบาดของเชื้อรา *Legenidium* spp. และ *Sirolopidium* spp. (<http://inco-cams.seafdec.or.ph/camshwp1.html>) Chukanhom และ Hatai (2004) รายงานการติดเชื้อของไขปู โดยเชื้อรา *Saprolegnia*, *Achlya* และ *Allomyces* และ Boeger และคณะ (2005) รายงานการระบาดของโรค Lethargic crab disease ซึ่งมีสาเหตุมาจากการในดีริช Ascomycota ในปู mangrove crab (*Ucides cordatus*) นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้อีกว่า อาจจะมีโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Aphanomyces*, *Leptolegnia* และ *Fusarium* ที่เกิดขึ้นได้กับไขปู เนื่องจากเชื้อราเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำและไขของสัตว์น้ำได้หลายชนิด เช่น ปู กุ้ง ปลา และกบ เป็นต้น (Rand, 1996 Park และคณะ, 1978) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโรคที่เกิดจากจุลชีพจึงเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการฟักตัวอ่อนและสามารถก่อให้เกิดโรคในตัวอ่อนได้ (Lindner, 2005)

นอกเหนือจากการสำรวจจุลชีพที่ติดเชื้อในปูทะเลแล้ว การสำรวจตรวจสอบผลทางกายภาพของภาพแวดล้อมและบริเวณรอบๆ ที่เพาะเลี้ยงปูก็มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสภาพแวดล้อมจะมีการแปรผันอยู่ตลอดเวลาแม้ภายในปีเดียวกัน เช่นความแตกต่างของอากาศในแต่ละฤดูกาลอาจมีความผันผวนทางอากาศที่ไม่เหมือนกัน ความแปรผันทางสภาพแวดล้อมนี้ส่งผลให้ปูทะเลต้องมีการปรับตัวในการดำรงชีวิตอยู่ตลอดเวลา ซึ่งข้อมูลของระบบนิเวศวิทยานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างหนึ่งที่ใช้ในการหาสาเหตุของการเกิดโรคในปูทะเล ชนิดของเชื้อจุลชีพที่ก่อโรค กลไกการติดเชื้อรวมไปถึงการแพร่ระบาดของเชื้อโรคอีกด้วย

จากปัญหาและข้อมูลทั้งหมดที่รวบรวมได้ การศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงทำให้สามารถหาวิธีทางป้องกันและหาทางรักษาโรคได้ และเนื่องจากประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงการติดเชื้อมีผลดังกล่าว ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานขั้นแรก แต่มีความสำคัญเพื่อมุ่งเป้าใหญ่ในการที่จะก่อประโยชน์ในการเพิ่มผลผลิตปูในอนาคต ในการศึกษาและการหาสาเหตุของโรคที่เกิดกับปูทะเลได้ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของแหล่งเพาะเลี้ยงที่มีความผันแปรพร้อมกับการศึกษาสภาพพยาธิวิทยาของอาการโรคในปูโดยใช้ความรู้ทางจุลกายวิภาคศาสตร์และการใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการแยกเชื้อจุลชีพแล้ว

นำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมศึกษาทางสัณฐานวิทยาของจุลชีพในเนื้อเยื่อปฐพีที่มีอาการท้องแดง ทำวิจัยรวบรวมข้อมูลในการวิเคราะห์หาวงจรของการเกิดโรค โดยต้องสังเกตการเพิ่มขึ้นและลดลงของอาการของโรคในแต่ละช่วงเวลาของปีและต้องศึกษาว่าอาการของโรคมีความสัมพันธ์กับกับภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยงในแต่ละช่วง เวลาหรือไม่อย่างไร แต่อย่างไรก็ตามถ้าอาการของโรคไม่ได้เกิดจากเชื้อจุลชีพ ก็อาจเกิดจากอาหารหรือแร่ธาตุหรืออะไรก็ตามที่ปฐพีได้รับในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทำวิจัยนี้ นับว่าเป็นข้อมูลที่มีค่าอย่างมากในการศึกษาวิจัยต่อไปถึงการหาทางป้องกันและการศึกษาการยับยั้งการเจริญหรือการก่อโรคตลอดจนหาสาเหตุของโรคที่แท้จริงได้

2. รายละเอียดของการดำเนินการวิจัย (Material and method)

2.1 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูในรอบปี โดยศึกษาปัจจัยที่สำคัญดังต่อไปนี้

2.1.1 วัดความเข้มข้นของแสงด้วยเครื่อง Radiometer เพื่อวัดพลังงานการส่องสว่างของแสง ใช้หน่วยวัดเป็น

2.1.2 วัดความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) ด้วยใช้เครื่อง Secchi-disc ใช้หน่วยวัดเป็น

2.1.3 วัดอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศ โดยใช้เครื่องมือวัดอุณหภูมิแบบสำเร็จรูปสำหรับวัดในงานสิ่งแวดล้อมที่ใช้หน่วยวัดเป็นองศาเซลเซียส

2.1.4 วัดความเค็มด้วยใช้เครื่องมือ Refractometer ใช้หน่วยวัดเป็นในหน่วยของส่วนในพันส่วน (ppt)

2.1.5 วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำโดยวิธีทางอิเล็กทรอนิกส์ใช้หัววัดปริมาณออกซิเจน (Oxygen electrode) ในเครื่องมือที่เรียกว่า Dissolved oxygen meter (DO meter) ใช้หน่วยวัดเป็นหน่วยของมิลลิกรัมต่อลิตร (mg l^{-1}) หรือส่วนในล้านส่วน (ppm)

2.1.6 วัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำด้วยเครื่อง pH meter

2.1.7 ออกแบบบันทึกการศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูตั้งตัวอย่างด้านล่าง

ตัวอย่างแบบบันทึกศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปู

สถานที่.....

วันที่.....เวลา

ผู้ตรวจวัด.....

ปัจจัย	บ่อที่ 1				บ่อที่ 2				บ่อที่ 3			
1. วัดความเป็นกรด-ด่าง												
2. วัดความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) (Secchi-disc)												
3. อุณหภูมิในน้ำ (องศาเซลเซียส)												
อุณหภูมิอากาศ (องศาเซลเซียส)												
4. วัดความเค็ม (Refractometer) ppt												
5. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen meter:DO meter)												
6. ความเข้มแสง (LUX)												
6.1 หัวบ่อเพาะเลี้ยง												
6.2 ท้ายบ่อเพาะเลี้ยง												



(ก) การวัดความเค็มด้วยใช้เครื่องมือ Refractometer



(ข) การวัดความเข้มข้นของแสงด้วยเครื่อง Radiometer เพื่อวัดการส่องสว่างของแสง



(ค) การวัดความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) ด้วยใช้เครื่อง Secchi-disc

ภาพที่ 1 แสดงการวัดปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปู

2.2 ศึกษาพยาธิสภาพเชิงลึกของของเนื้อเยื่อปูที่มีอาการท้องแดง

ศึกษาพยาธิสภาพเชิงลึกของของเนื้อเยื่อปูที่มีอาการของโรคเป็นการศึกษาถึงการติดเชื้อคือ ตับ เหงือก กล้ามเนื้อ กระเพาะอาหารและหัวใจ นี้เกิดจากจุลชีพว่าเป็นชนิดใด สัณฐานวิทยาและรายละเอียดของจุลชีพเป็นอย่างไร การติดเชื้อมันเกิดขึ้นในอวัยวะใดและเชื้อจุลชีพนี้ไปมีผลต่ออวัยวะภายในเซลล์หรือไม่ การศึกษาใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope: TEM) ที่มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 เตรียมตัวอย่างอวัยวะที่สำคัญของปูที่มีอาการโรคทำโดยจัดการปูให้สลบด้วยการแช่ในน้ำใส่น้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 15 นาที เมื่อปูสลบให้ตัดกระดองและส่วนที่ปกคลุมของร่างกายออก ตัดอวัยวะภายในที่ต้องการศึกษา เช่น ตับ เหงือก กล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อท้อง กระเพาะและหัวใจเป็นชิ้นขนาด 2 ถึง 3 มิลลิเมตร

2.2.2 ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 Phosphate buffer pH 7.2 จากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำยารักษาภาพครั้งแรก (primary fixative) ด้วยน้ำยากลูทาไรอัลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 24 ชั่วโมง

2.2.3 เมื่อครบเวลาจึงล้างตัวอย่างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 แล้วรักษาสภาพตัวอย่างครั้งที่สอง (secondary fixative) ด้วยออสเมียมเตตระออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างออสเมียมเตตระออกไซด์ออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

2.2.4 ดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอะซิโตน (acetone) แล้วฝังชิ้นตัวอย่างใน spurr resin ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยการนำตัวอย่างไปเข้าตูบที่ 45 องศาเซลเซียส 2 วัน และย้ายเข้าตูบที่ 60 องศาเซลเซียส 3 วัน

2.2.5 ตัดตัวอย่างให้บางด้วยเครื่องตัดตัวอย่าง (ultramicrotome) ให้ได้ความหนา 60 นาโนเมตร แล้วซ้อนตัวอย่างวางบน grid

2.2.6 ย้อมตัวอย่างที่ตัดบาง (Thin section) ตัวอย่างด้วย 0.5 % Uranyl acetate และ Lead citrate เพื่อเพิ่มความเปรียบต่าง (contrast) ของตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 80 kV. พร้อมบันทึกภาพ

2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อจากอวัยวะที่มีอาการท้องแดงและได้แยกบริสุทธิ์แล้ว เก็บเป็น stock culture

2.3.1 สำนวณลักษณะทางคลินิก (clinical sign) และทำการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อบริเวณที่สงสัยเพื่อตรวจฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)

2.3.2 ทำการ swap เชื้อจากบริเวณที่มีลักษณะของอาการโรคท้องแดงบริเวณแผลลงบนอาหารสูตร Nutrient Agar (NA) ผสมกับ 15ppt NaCl และ Thiosulphate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar สำหรับบริเวณที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรีย

2.3.3 แยกบริสุทธิ์เชื้อและเก็บเป็น stock culture

2.3.4 ตรวจหาชนิดของจุลชีพและเชื้อต่างๆ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเปิดกระดองปู การปดเนื้อเยื่อ การ swap เชื้อจากบริเวณที่มีลักษณะอาการโรค
ท้องแดงลงบนอาหารสูตร Nutrient Agar (NA) ผสมกับ 15ppt NaCl และ Thiosulphate
Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar

3. ผลการทดลอง (Results)

3.1 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูในรูปปี

จากการสำรวจสถานที่ทำการศึกษฟาร์มเลี้ยงปูในจังหวัดสมุทรสงคราม พบว่าบ่อเพาะเลี้ยงมีขนาดกว้าง 100 เมตร และยาว 80 เมตร ความลึก 2 เมตร ในแต่ละบ่อเพาะเลี้ยงมีการระบายน้ำเข้าออกอย่างดี โดยมีประตูระบายน้ำสองด้าน ในหนึ่งบ่อมีการเพาะเลี้ยงปูประมาณ 6,000-7,000 ตัว การเพาะเลี้ยงเลี้ยงแยกหนึ่งตัวต่อ 1 กรง แต่กรงมีใช้เป็นลักษณะตะกร้าที่มีลักษณะโปร่ง ทำด้วยพลาสติกมีฝาปิดขนาดประมาณ 16x18 เซนติเมตร และกรงลอยอยู่ในแพเรือที่อยู่ระดับพื้นน้ำ



ภาพที่ 3 สภาพบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเล โดยเลี้ยงปู 1 ตัวในกรง 1 กรง และกรงลอยอยู่ในแพเรือที่อยู่ระดับเดียวกับพื้นน้ำ

ในการสำรวจพบว่าปูทะเลประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์มีอาการท้องแดง คือที่ส่วนอกและข้อต่อขาของปูมีสีแดงจนสีแดงจัด อวัยวะภายในเปลี่ยนจากสีปกติไปเป็นสีซีดและบางอวัยวะเป็นสีส้ม ปูมีอาการเชื่องซึมไม่เคลื่อนไหวและตายในที่สุด

3.2 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปู โดยศึกษาปัจจัยที่สำคัญดังต่อไปนี้ การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal 1775) ในจังหวัดสมุทรสงคราม พบว่าสภาพบ่อเพาะเลี้ยงปู มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าอยู่ในช่วง 7.43-9.10 ค่าความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) อยู่ในช่วง 18.75-59.38 ค่าอุณหภูมิในน้ำอยู่ในช่วง 23.95-35.10 องศาเซลเซียส ค่าอุณหภูมิในอากาศอยู่ในช่วง 25.33-32.90 องศาเซลเซียส ค่าความเค็ม (Refractometer) อยู่ในช่วง 7.38-26.00 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen meter) อยู่ในช่วง 3.02-8.29 และมีความเข้มแสง (LUX) อยู่ในช่วง 20,100-629,000 ซึ่งเป็นค่าปัจจัยทางกายภาพของแหล่งน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ปกติ จากนั้นได้นำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.3 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง การศึกษาสภาพภายนอกของปูปกติและปูท้องแดง

3.3.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ปูที่นำมาศึกษาทั้งหมด นำมาชั่งน้ำหนักและวัดความกว้างของกระดอง พบว่าปูปกติจำนวน 31 ตัว มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 85.00-170.00 กรัม คิดเป็นน้ำหนักเฉลี่ย 129.90 ± 20.84 กรัม มีความกว้างกระดองอยู่ในช่วง 8.00-9.50 เซนติเมตร คิดเป็นความกว้างเฉลี่ย 8.66 ± 0.45 เซนติเมตร ส่วนปูที่เป็นอาการท้องแดงระยะที่ 1 ปูมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 85.00-135.00 กรัม คิดเป็นน้ำหนักเฉลี่ย 113.44 ± 15.89 กรัม มีความกว้างกระดองอยู่ในช่วง 8.00-9.50 เซนติเมตร คิดเป็นความกว้างเฉลี่ย 8.77 ± 0.46 เซนติเมตร ปูท้องแดงระยะที่ 2 มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 84.00-140.00 กรัม คิดเป็นน้ำหนักเฉลี่ย 118.72 ± 18.22 กรัม มีความกว้างกระดองอยู่ในช่วง 7.00-9.10 เซนติเมตร คิดเป็นความกว้างเฉลี่ย 8.22 ± 0.60 เซนติเมตร ปูท้องแดงระยะที่ 3 มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 89.00-152.00 กรัม คิดเป็นน้ำหนักเฉลี่ย 111.33 ± 18.62 กรัม มีความกว้างกระดองอยู่ในช่วง 7.60-9.50 เซนติเมตร คิดเป็นความกว้างเฉลี่ย 8.56 ± 0.49 เซนติเมตร (ตามตารางที่ 1)

3.3.2 การศึกษาสภาพภายนอก ภายในและการศึกษา haemolymph ของปูปกติและปูท้องแดง

จากการเก็บตัวอย่างปูทะเล นำมาจำแนกลักษณะระหว่างปูปกติและปูที่มีอาการท้องแดง โดยศึกษาจากลักษณะภายนอกได้แก่ บริเวณส่วนท้องและข้อต่อระหว่างขาและก้ามปู จำแนกได้คือปูปกติมีส่วนท้องสีขาว ข้อต่อระหว่างขาและก้ามปูจะมีลักษณะใส ส่วนปูที่มี

อาการท้องแดงส่วนท้องออกสีส้มจางจน สีส้มแดงซึ่งสีเข้มมากน้อยแตกต่างกัน บริเวณข้อต่อระหว่างขาและก้ามปูออกสีส้มแดง อาจมากหรือน้อยแตกต่างกันไป

ลักษณะภายนอกปูปกติ บริเวณท้องมีสีขาว ข้อต่อมีลักษณะใส เมื่อเปิดกระดองออกพบว่าอวัยวะภายในมีรูปร่างทรงตัว สีและรูปทรงปกติน้ำเลือดใส จากการสังเกตการเคลื่อนไหวและการตอบสนองต่อสิ่งที่มากระตุ้น พบว่าปูที่มีอาการท้องแดงจะเคลื่อนที่ช้าลง ในขณะที่ปูปกติมีการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อสิ่งที่มากระตุ้นได้ดีมาก สำหรับลักษณะภายนอกของปูที่มีอาการท้องแดง บริเวณท้องมีสีแดง บางครั้งพบว่าบางตัวที่ไม่แสดงอาการเคลื่อนที่ช้าแต่ก็มีที่มีอาการท้องแดงได้เช่นกัน ซึ่งสังเกตจากสีเลือดที่เปลี่ยนแปลงจากลักษณะใสไม่มีสีเป็นสีส้ม สีชมพูหรือสีขาวคล้ายนํ้านม บริเวณข้อต่อเป็นสีแดง เมื่อเปิดกระดองออกพบว่าอวัยวะภายในมีรูปร่าง สีและรูปทรงเปลี่ยนแปลงจากปกติ ตับและเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลืองหรือขาวซีด เหงือกซีดหรือเป็นสีน้ำตาลจนดำเข้ม (ภาพที่ 4 และ 5)

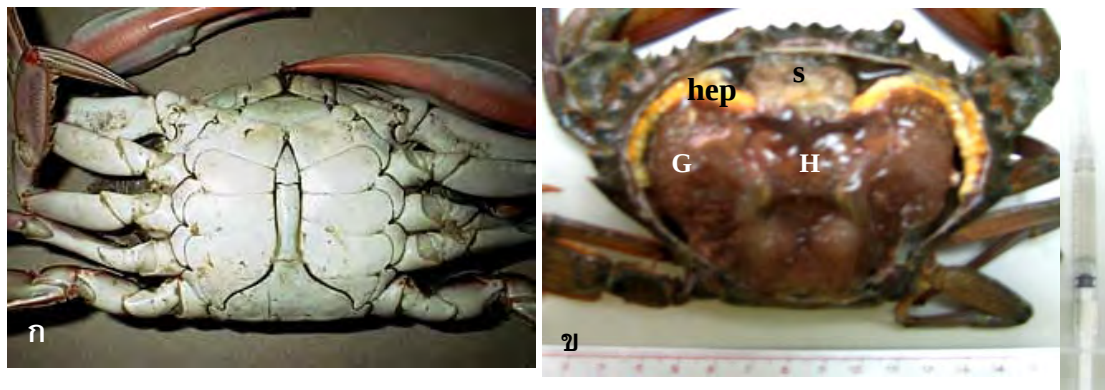
เมื่อเจาะ haemolymph เพื่อศึกษาสีน้ำเลือดพบว่าปูปกติมีน้ำเลือดใสไม่มีสี ในปูที่มีอาการท้องแดงพบสีของน้ำเลือดแบ่งเป็น 3 ระยะคือ ระยะที่ 1 คือปูที่น้ำเลือดสีส้ม (ส้มอ่อนถึงส้มเข้ม) ระยะที่ 2 คือปูที่น้ำเลือดสีส้มขาว และระยะที่ 3 คือปูที่น้ำเลือด สีขาวคล้ายนํ้านม (ภาพที่ 5) ความสามารถในการแข็งตัวของน้ำเลือด (clotting) แตกต่างจากปูปกติ คือปูที่มีอาการท้องแดงทั้ง 3 ระยะ มีความสามารถในการแข็งตัวของน้ำเลือด แตกต่างกัน โดยน้ำเลือดระยะที่ 3 จะไม่แข็งตัวและอาจต้องใช้เวลาานกว่าหรือไม่สามารถแข็งตัวได้เลย ส่วนปูระยะที่ 1 น้ำเลือดสีส้มจะแข็งตัวช้ากว่าเลือดปูปกติ ถ้าเรียงลำดับความสามารถในการแข็งตัวของน้ำเลือดจากสามารถแข็งตัวเร็วสุดไปช้าสุดคือน้ำเลือดของปูปกติ น้ำเลือดปูระยะที่ 1 น้ำเลือดปูระยะที่ 2 และน้ำเลือดปูระยะที่ 3 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักและความกว้างของกระดองปูที่ศึกษา

	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	ความกว้างของกระดองเฉลี่ย (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)
ปูปกติ	31	8.66±0.45	129.90±20.84
ปูท้องแดง			
ระยะที่ 1	18	8.77±0.46	113.44±15.89
ระยะที่ 2	18	8.22±0.60	118.72±18.22
ระยะที่ 3	18	8.56±0.49	111.33±18.62

ตารางที่ 2 ลักษณะภายนอกและภายในของปูปกติกับปูท้องแดง

อวัยวะหรือคุณสมบัติ ที่ศึกษา		ปูที่มีอาการท้องแดง		
		ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3
		(Haemolymph สีส้ม)	(haemolymph สีส้ม-ขาว)	(haemolymph สีขาว-นม)
ลักษณะภายนอก				
ส่วนนอก	สีขาว	สีแดง	สีแดง	สีแดง
การเคลื่อนไหว	ปกติ	ช้า	ช้า	ช้า
ลักษณะภายใน				
สีของเลือด	ใสไม่มีสี	ส้ม	ส้มขาว	ขาว
การแข็งตัวของเลือด	1 นาที	1 ถึง 5 นาที	6 ถึง 10 นาที	ไม่สามารถแข็งตัว
ตับ	สดคงตัว	นุ่มและ	นุ่มและ	นุ่มและ
เหงือก	ปกติ	สีส้ม	สีส้ม	สีซีด
กล้ามเนื้อ	ปกติ	นุ่ม	นุ่ม	นุ่ม



ภาพที่ 5 (ก) ลักษณะภายนอกปูปกติส่วนท้องเป็นสีขาวถึงเหลือง (ข) อวัยวะภายในคือ หัวใจ (h) กระเพาะอาหาร (s) ตับ (hep) และเหงือก (g) และ haemolymph สีใส

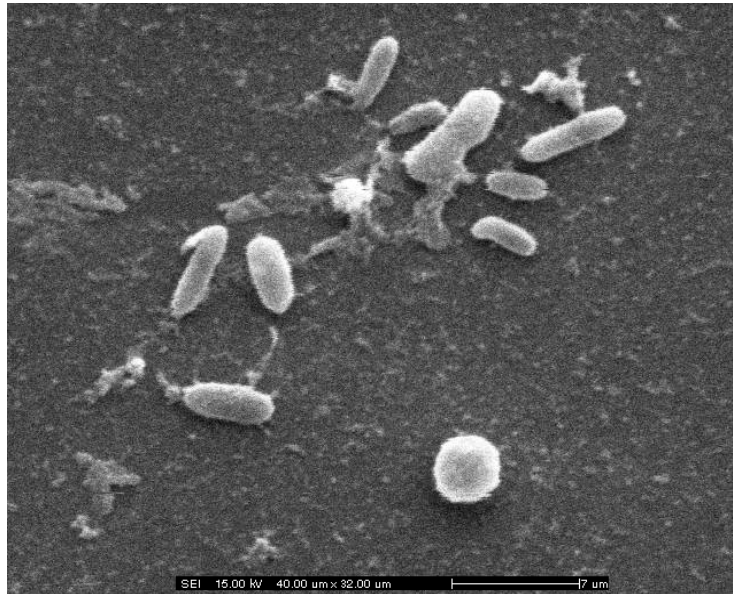




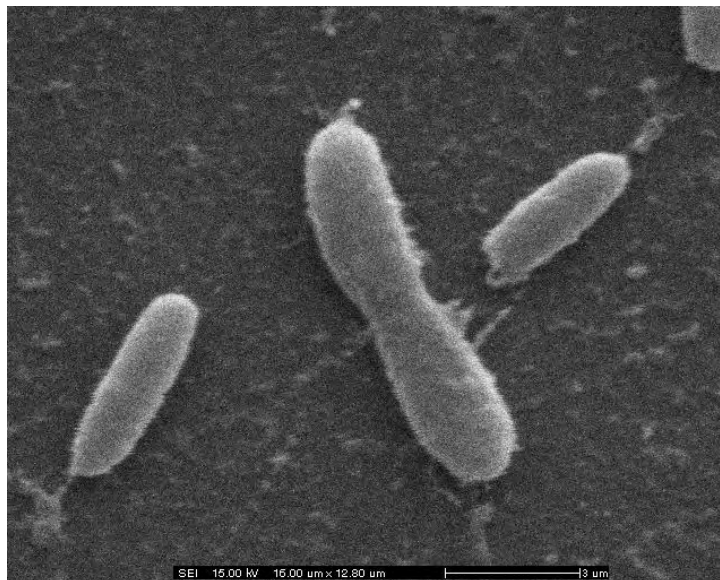
ภาพที่ 5 ลักษณะภายนอกปูที่มีอาการท้องแดงระยะที่ 1 ถึง ระยะที่3 (ก. ค. และ จ.) ส่วนท้องมีสีส้มอ่อนถึงแดงส้ม อวัยวะภายในคือ หัวใจ (h) กระเพาะอาหาร (s) ตับ (hep) และเหงือก (g) ของปูที่มีอาการท้องแดงเปลี่ยนเป็นสีส้ม เหลืองและน้ำตาลและ haemolymph ได้เปลี่ยนแปลงจากสีใสเป็นสีส้ม ส้มขาว ถึงสีขาวคล้ายน้ำนม (ข. ง. และ ฉ.) ภาพ ช. แสดงปูปกติ haemolymph ใส (1) และปูที่มีอาการท้องแดง haemolymph สีผิดปกติ (2)

3.4 การศึกษา haemolymph ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษาใน haemolymph ปูปกตินั้นไม่พบการติดเชื้อจากจุลชีพ พบว่าเม็ดเลือดรูปร่างทรงกลมไข่ haemolymph ของปูท้องแดงทั้ง 3 ระยะ พบว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียใน haemolymph รูปร่างแท่งตรงและโค้งงอ และรูปร่างกลม (ภาพที่ 6)



(ก)

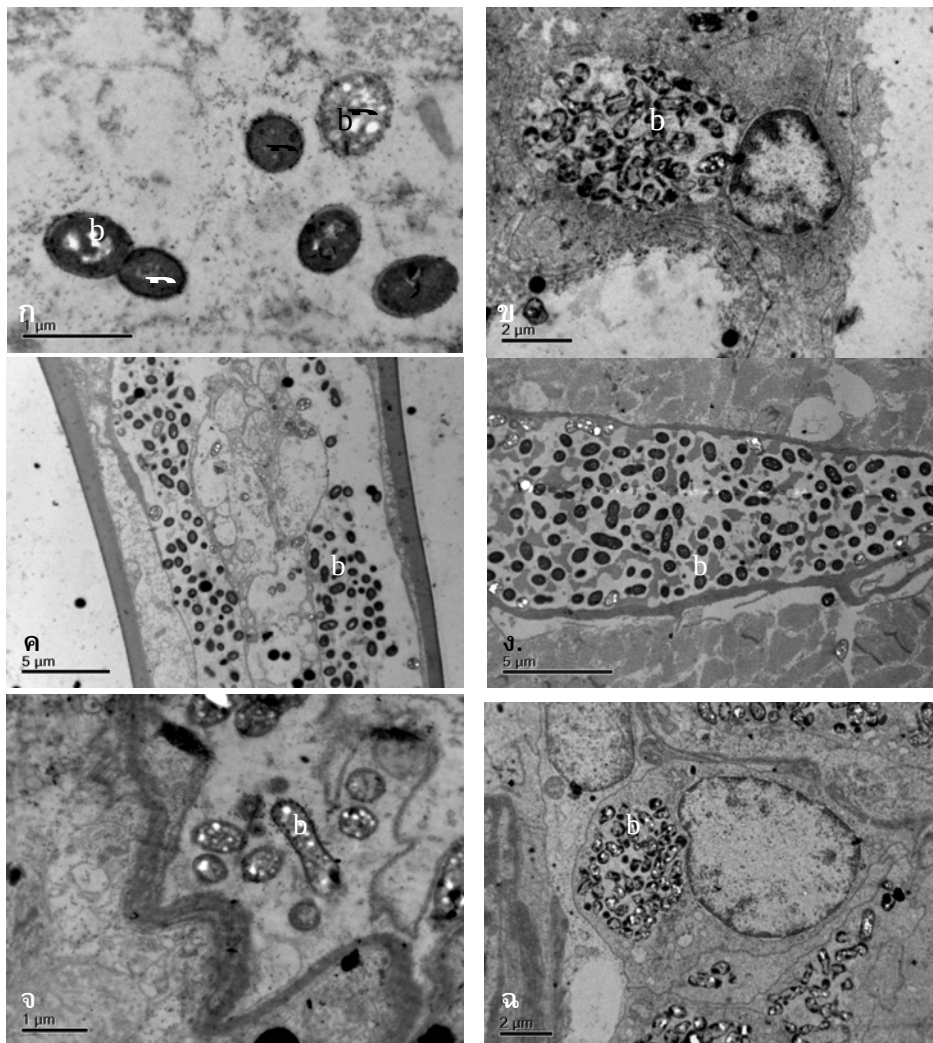


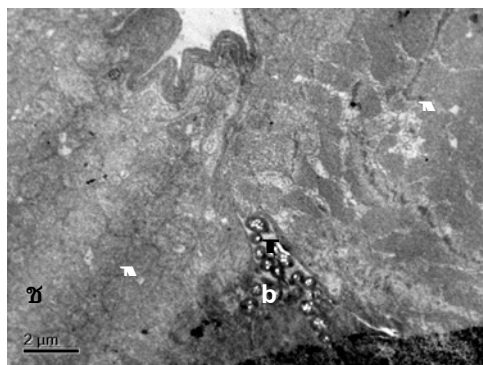
(ข)

ภาพที่ 6 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง (ก) เชื้อแบคทีเรียรูปร่างแท่ง โค้งงอและกลมใน haemolymph ของปูที่มีอาการท้องแดง และภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ข) เชื้อแบคทีเรียรูปร่างแท่งและตรง

3.5 ศึกษาพยาธิสภาพเชิงลึกของของเนื้อเยื่อปูด่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาทาง histology ของปูด่างทั้ง 3 ระยะ พบการติดเชื้อจากแบคทีเรีย รูปร่างกลม (rod) โค้งงอ (curve rod) และกลม (coccus-shapes) ภายในอวัยวะที่ศึกษา ปูด่างระยะที่ 1 เป็นระยะอาการของโรคน้อยที่สุดเลือดเริ่มเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นเลือดสีส้ม อวัยวะภายในเริ่มนิ่มและ เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบการติดเชื้อจากแบคทีเรียเป็นจำนวนน้อย ปูด่างระยะที่ 2 เป็นระยะอาการของโรคขั้นรุนแรงขึ้น เลือดเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีชมพู อวัยวะภายในนิ่มและและซืด เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบการติดเชื้อจากแบคทีเรียจำนวนมากและปูด่างระยะที่ 3 เป็นขั้นรุนแรงสุด อาการปูด่างที่พบในระยะนี้จะใกล้ตาย เลือดเป็นสีชาวลำคายน้ำนม เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกบริเวณส่วนนอกมีสีแดง ส่วนอวัยวะภายใน นิ่มและและสีซืด เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบการติดเชื้อจากแบคทีเรียจำนวนมากในทุกอวัยวะ อวัยวะที่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย คือ เหนือก ตับ หัวใจ กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อทรวงอก ส่วนที่ปกคลุมของร่างกายและกล้ามเนื้อท้องตามลำดับดังภาพที่ 7





ภาพที่ 7 จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านแสดงเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะของปูที่มีอาการท้องแดง (ก) ส่วนปกคลุมร่างกาย (ข) ตับ (ค) เหงือก (ง) กล้ามเนื้อท้อง (จ) กล้ามเนื้อก้ามปู (ฉ) กระเพาะและ (ช) กล้ามเนื้อหัวใจ (b คือแบคทีเรีย)

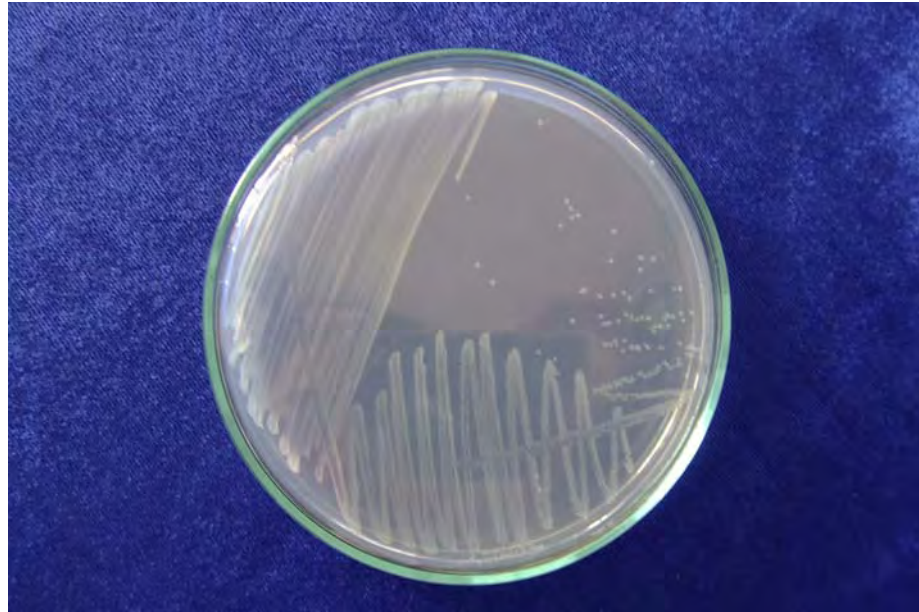
3.6 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในอวัยวะของปูที่มีอาการท้องแดงเป็น stock culture และตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์

เมื่อนำ hepatopancreas จากปูที่มีอาการท้องแดงและยังมีชีวิตอยู่มาบดในสารละลาย normal saline และทำการ spread plate ลงในอาหารสูตร Nutrient Agar (NA) ผสมกับ 15ppt NaCl และ Thiosulphate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar ผสมกับ 15ppt NaCl พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ เจริญบนอาหาร NA ผสมกับ 15ppt NaCl แต่พบว่าไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร TCBS ที่ผสมกับ 15 ppt NaCl (ตารางที่ 3) นอกจากนี้เมื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์จากปูที่ไม่มีอาการท้องแดง พบว่าไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญในอาหารทั้งสองชนิด

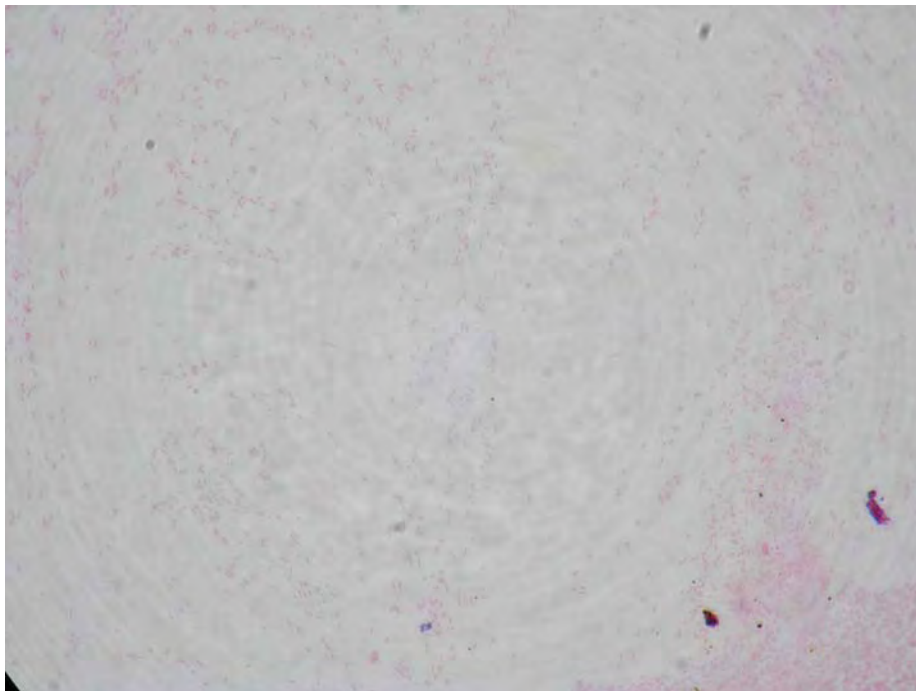
ตารางที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในอวัยวะของปูที่มีอาการท้องแดง

สายพันธุ์	จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/g)		ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์
	NA +15ppt NaCl	TCBS +15ppt NaCl		
RC2hep-A	4×10^5	0	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม โค้ง หนุน ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 8)	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 0.75-1.00 ไมโครเมตร (ภาพที่ 9)
RC2hep-B	3×10^4	0	โคโลนีมีสีครีม	แบคทีเรียแกรมลบ

			ลักษณะกลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 5-8 มิลลิเมตร (ภาพที่ 10)	รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด1.00-1.50 ไมโครเมตร (ภาพที่ 11)
RC2hep-D	4.5×10^3	0	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม โค้ง นูน ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง ประมาณ 1.00 มิลลิเมตร (ภาพที่ 12)	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 0.50-1.00 ไมโครเมตร (ภาพที่ 13)
RC2hep-E	5×10^3	0	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ค่อนข้างใส ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง ประมาณ 1.00 มิลลิเมตร (ภาพที่ 14)	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 1.00-1.25 ไมโครเมตร (ภาพที่ 15)



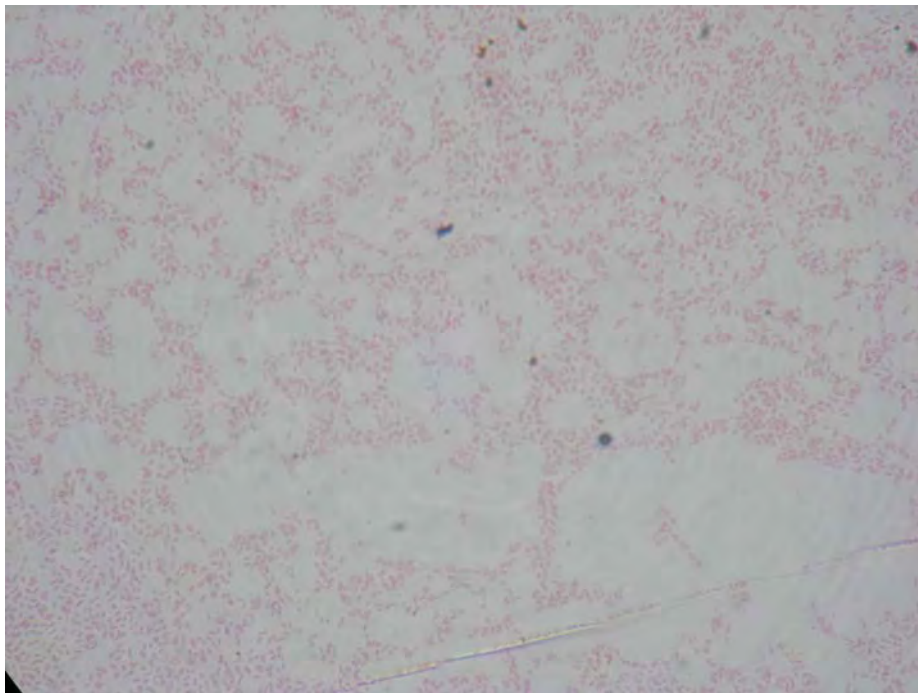
ภาพที่ 8 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-A



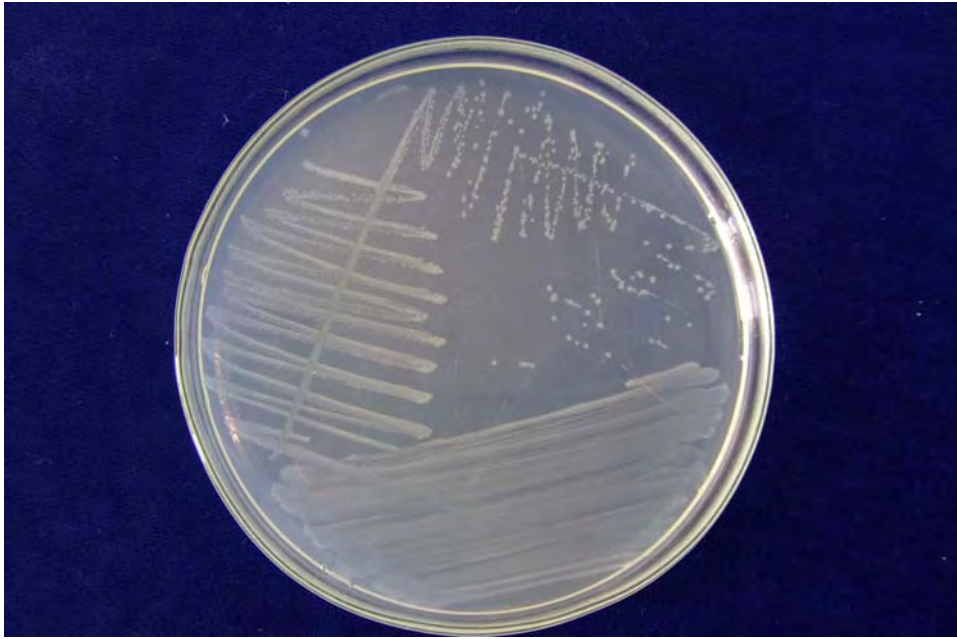
ภาพที่ 9 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-A



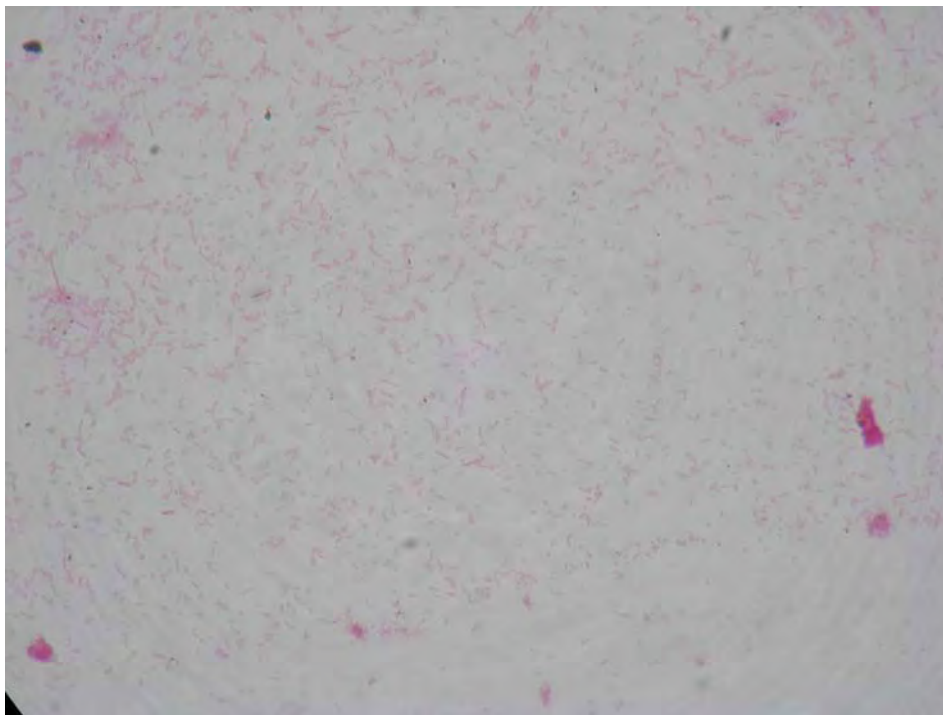
ภาพที่ 10 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-B



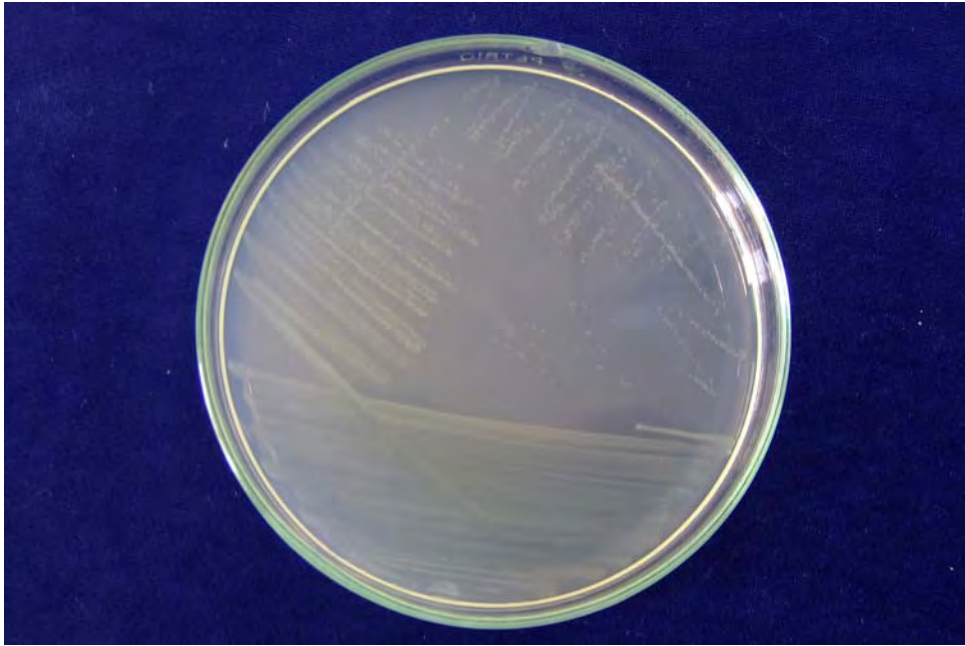
ภาพที่ 11 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-B



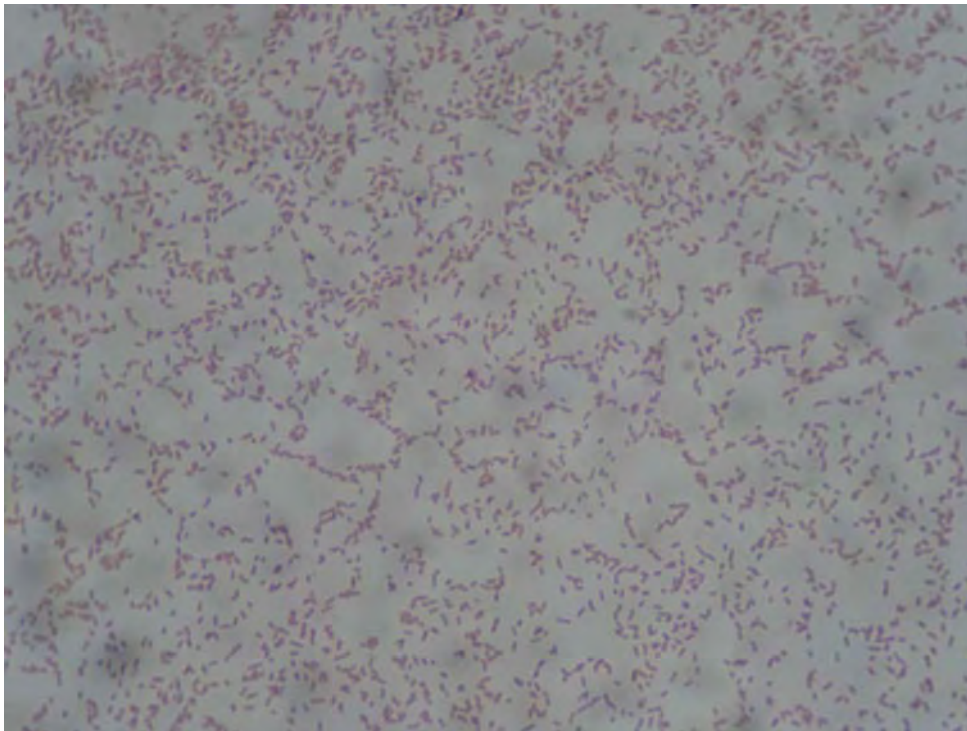
ภาพที่ 12 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-D



ภาพที่ 13 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-D



ภาพที่ 14 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-E



ภาพที่ 15 แบคทีเรียสายพันธุ์ RC2hep-E

เมื่อนำ DNA จากแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มาเพิ่มจำนวนของยีน 16S rRNA (ภาพที่ 16-19) และนำไปหาลำดับกรดนิวคลีอิกและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อที่จะระบุชนิดของแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-A และสายพันธุ์ RC2Hep-D เป็น *Morganella morganii* และสายพันธุ์ RC2Hep-E เป็น *Pseudomonas* sp. ในขณะที่ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-B เหมือนกับแบคทีเรียที่จากทะเลแต่ยังไม่ทราบชนิด

```
TAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGGC
GGTAACAGGGAGAAAGCTTGCTTCTCTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGG
ATCTGCCTGATGGCGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCTTCGG
ACCAAAGCGGGGGACCTCCGGGCCTCGCGCCATCAGATGAACCCATATGGGATTAGCTTGTA
GGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTT
CAGTCGGGAGGAAGGTGTTAAGGTTAATAACCTTAGCAATTGACGTACCGACAGAAGA
```

ภาพที่ 16 ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-A

```
TAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGC
GGTAGCATTCTAGCTTGCTAGAAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAAT
CTGCCGAGTAGTGGGGGATAGCCAGAGAAATTTGGATTAATACCGCATAACGCCCTACGGGG
GAAAGGAGGGGATCTTCGACCTTTGCTATTTCGATGAGCCTGCGTGAGATTAGCTTGTTGG
TGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG
GGAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCA
GCAGTGAGGAAAGGTGACAGTTAATACCTGTTA
```

ภาพที่ 17 ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-B

```
ATTAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGGGCG
GTAACAGGGAGGCTTGCTAATCTCTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGA
TCTGCCTGATGGCGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCTTCGGA
CCAAAGCGGGGGACCTCCGGGCCTCGCGCCATCAGATGAACCCATATGGGATTAGCTTGTA
GTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA
```

ภาพที่ 18 ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-D

```
AAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCG
GTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCC
TAGTGGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAG
CGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCCATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGCACTTT
```

ภาพที่ 19 ลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-E

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-A, RC2Hep-B, RC2Hep-E ที่ความเข้มข้น 3×10^4 cfu/ml ฉีดเข้าสู่ปูปกติตัวละ 100 ไมโครลิตร (คิดเป็น 3×10^6 cfu ต่อปูปกติ 1 ตัว) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถก่อโรคในปูปกติได้ ถึงแม้ว่าการฉีดเชื้อสายพันธุ์ RC2Hep-A เข้าสู่ปูปกติในการทดลองครั้งที่ 1 จะสามารถทำให้ปูตายได้ และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียออกมาจากปูที่ตายได้ แต่การทดลองครั้งที่ 2, 3 และ 4 นั้นไม่สามารถทำให้ปูตายได้เลย ถึงแม้ว่าจะติดตามผลเป็นเวลา 30 วัน (จากตารางที่ 4) จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้อาจไม่ใช่เชื้อที่เป็นสาเหตุของอาการท้องแดง แต่ปูที่มีอาการท้องแดงอาจเป็นปูอาการที่เกิดจากปูนั้นมีสุขภาพไม่ดี ทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ นั้นไปก่อให้เกิด Secondary infection และสามารถเจริญอยู่ในปูที่สุขภาพไม่ดีได้

ตารางที่ 4 จำนวนปูปกติที่ตายในแต่ละวันหลังจากที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย

	วันที่														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ RC2Hep-A															
การทดลองที่ 1 (ปูจำนวน 3 ตัว)				1			1								
การทดลองที่ 2 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 3 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 4 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ RC2Hep-B															
การทดลองที่ 1 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 2 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 3 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 4 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
เชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ RC2Hep-E															
การทดลองที่ 1 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 2 (ปูจำนวน 3 ตัว)															

การทดลองที่ 3 (ปูจำนวน 3 ตัว)															
การทดลองที่ 4 (ปูจำนวน 3 ตัว)															

3.7 ผลทางกายภาพของบ่อเลี้ยงปูและผลทางสถิติ

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูทะเล (*Scylla serrata* Forskal 1775) ในจังหวัดสมุทรสงคราม พบว่าสภาพบ่อเพาะเลี้ยงปูทะเลในช่วงรอบปี มีข้อมูลจากการปัจจัยศึกษาโดยมีตัวแปร 7 ตัวแปรคือ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความโปร่งแสงของน้ำ (Transparency) อุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศ (Temperature หน่วยวัดเป็นองศาเซลเซียส) ความเค็ม (Salinity หน่วยวัดเป็น ppt) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen meter) ความเข้มแสงหัวบ่อและความเข้มแสงท้ายบ่อ (หน่วยวัดเป็น LUX) ได้ถูกนำมาพิจารณา โดยแสดงค่าสถิติเบื้องต้นไว้ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวแปรปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

ตัวแปร	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	Mean	SD
ความเป็นกรด-ด่าง	7.43	9.10	8.63	0.34
ความโปร่งแสง	18.75	59.38	31.52	9.72
อุณหภูมิน้ำ	23.95	35.10	29.06	2.20
อุณหภูมิอากาศ	25.33	32.90	29.45	1.99
ความเค็ม	7.38	26.00	15.68	5.73
ออกซิเจนในน้ำ	3.02	8.29	5.06	1.10
ความเข้มแสงหัวบ่อ	24600.00	127200.00	78622.22	24546.92
ความเข้มแสงท้ายบ่อ	20100.00	629000.00	88351.29	69077.72

จากตารางที่ 5 สภาพทั่วไปของบ่อเลี้ยงปูมีค่าทางกายภาพคือ

3.7.1 ความเป็นกรด-ด่างมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.63 (SD=0.347) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 7.43 และค่าสูงสุดเท่ากับ 9.10

3.7.2 ความโปร่งแสงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 31.52 (SD=9.72) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 18.75 และค่าสูงสุดเท่ากับ 59.38

3.7.3 อุณหภูมิของน้ำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 29.06 องศาเซลเซียส (SD=2.20) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 23.95 องศาเซลเซียสและค่าสูงสุดเท่ากับ 35.10 องศาเซลเซียส

3.7.4 อุณหภูมิอากาศมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 29.45 องศาเซลเซียส (SD=1.99) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 23.33 และค่าสูงสุดเท่ากับ 32.90 องศาเซลเซียส

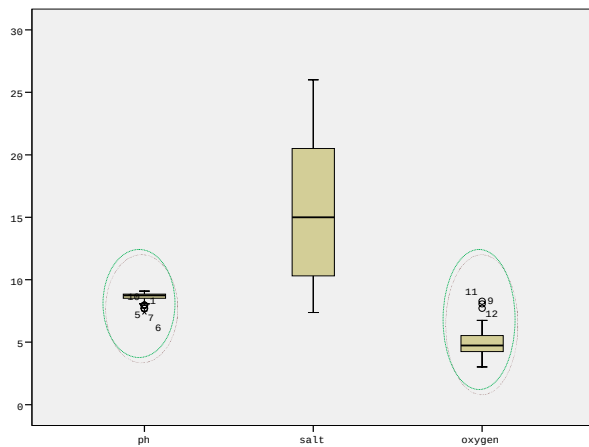
3.7.5 ความเค็มมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.68 ppt (SD=5.73) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 7.38 ppt และค่าสูงสุดเท่ากับ 26.00 ppt

3.7.6 ออกซิเจนในน้ำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.06 (SD=1.10) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 3.02 และค่าสูงสุดเท่ากับ 8.29

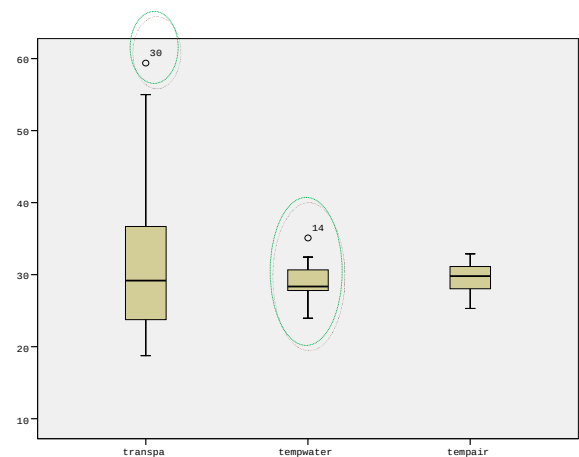
3.7.7 ความเข้มแสงห้วงอ้อมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 78,622.22 LUX (SD=24546.92) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 24,600 LUX และค่าสูงสุดเท่ากับ 127,200 LUX

3.7.8 ความเข้มแสงห้วงท้ายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88,351.29 LUX (SD=69077.72) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 20,100 LUX และค่าสูงสุดเท่ากับ 629,000 LUX

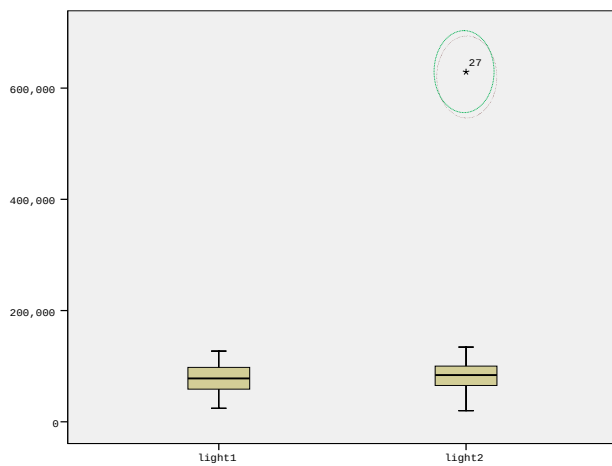
การตรวจสอบข้อมูลเบื้องต้นของทั้ง 8 ตัวแปร ตรวจสอบโดยใช้ Boxplot ดังแสดงในภาพที่ 20



(a) กรด-ด่าง ความเค็ม ออกซิเจนในน้ำ



(b) ความโปร่งแสง อุณหภูมิน้ำ อุณหภูมิอากาศ



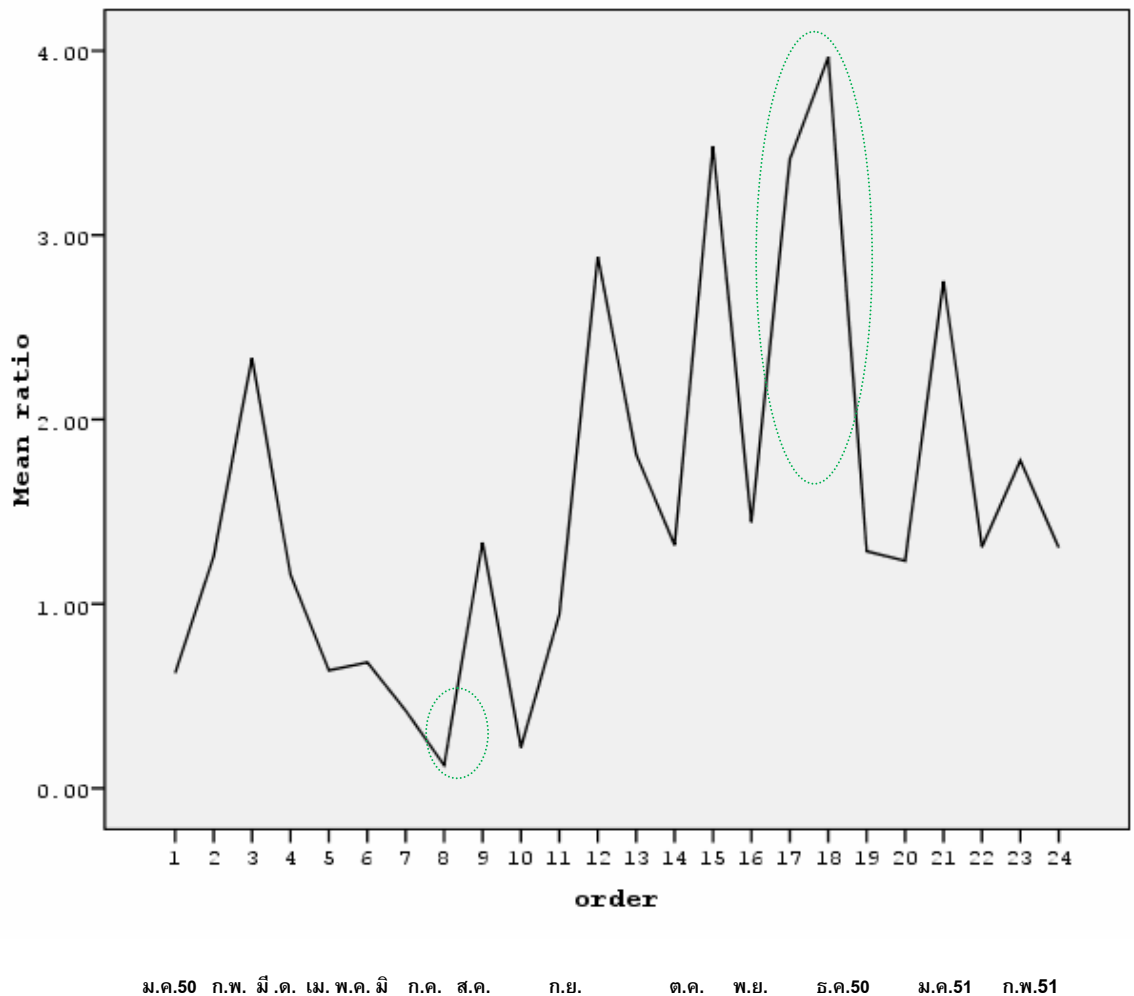
(c) แปรความเข้มแสงหัวบ่อ ความเข้มแสงท้ายบ่อ

ภาพที่ 20 (a) Boxplot ของตัวแปร ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็มและออกซิเจนในน้ำ

(b) Boxplot ของตัวแปรความโปร่งแสง อุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศ

(c) Boxplot ของตัวแปรความเข้มแสงหัวบ่อและความเข้มแสงท้ายบ่อ

จากการตรวจสอบด้วย Boxplot พบว่าตัวแปรหลายตัวมีค่านอกกลุ่มปะปนอยู่ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ออกซิเจนในน้ำ ความโปร่งแสง อุณหภูมิน้ำและความเข้มแสงท้ายบ่อ โดยที่ตัวแปรส่วนใหญ่มีลักษณะการแจกแจงที่ใกล้เคียงปกติ ยกเว้นตัวแปรความโปร่งแสงซึ่งมีการแจกแจงค่อนข้างเบ้ขวา ซึ่งหมายความว่าค่ากลางของข้อมูลส่วนใหญ่ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีค่าน้อย พิจารณาตัวแปรอัตราการตายของปูต่อ 1 แพเรือ (ที่ใช้วางกรงปู) เพื่อดูแนวโน้มการตายตามลำดับการเก็บข้อมูล ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 อัตราการตายเฉลี่ยของปู ต่อ 1 แพเรือ ตามลำดับเวลาการเก็บข้อมูล

หมายเหตุ: 1 คือข้อมูลเดือน มกราคม 2550, 2-3 คือข้อมูลเดือนกุมภาพันธ์ 2550, 4 คือข้อมูลเดือนมีนาคม 2550, 5 คือข้อมูลเดือนเมษายน 2550, 6 คือข้อมูลเดือนพฤษภาคม 2550, 7-8 คือข้อมูลเดือนมิถุนายน 2550, 9 คือข้อมูลเดือนสิงหาคม 2550, 10-11 คือข้อมูลเดือนกันยายน 2550, 12-13-14 คือข้อมูลเดือนตุลาคม 2550, 15-16 คือข้อมูลเดือนพฤศจิกายน 2550, 17-18-19 คือข้อมูลเดือนธันวาคม 2550, 20-21-22 คือข้อมูลเดือนมกราคม 2551 และ 23-24 คือข้อมูลเดือนกุมภาพันธ์ 2551

ตารางที่ 6 แสดงสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (7 ตัวแปร) และอัตราการตายต่อ 1 แพเรือ โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Pearson

Correlations										
		ph	transpa	empwater	tempair	salt	oxygen	light1	light2	ratio
ph	Pearson Correlation	1	-.035	.076	-.094	-.340**	-.053	.074	-.105	.150
	Sig. (2-tailed)		.769	.523	.434	.004	.659	.534	.382	.208
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
transpa	Pearson Correlation	-.035	1	-.187	-.282*	.038	-.248*	-.174	.269*	.050
	Sig. (2-tailed)	.769		.116	.016	.748	.036	.143	.023	.676
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
empwater	Pearson Correlation	.076	-.187	1	.829**	-.466**	.268*	.063	.096	-.284*
	Sig. (2-tailed)	.523	.116		.000	.000	.023	.599	.422	.016
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
tempair	Pearson Correlation	-.094	-.282*	.829**	1	-.147	.211	.112	.080	-.319**
	Sig. (2-tailed)	.434	.016	.000		.218	.075	.349	.504	.006
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
salt	Pearson Correlation	-.340**	.038	-.466**	-.147	1	-.138	.371**	.040	.008
	Sig. (2-tailed)	.004	.748	.000	.218		.247	.001	.736	.948
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
oxygen	Pearson Correlation	-.053	-.248*	.268*	.211	-.138	1	-.136	.100	.085
	Sig. (2-tailed)	.659	.036	.023	.075	.247		.256	.406	.475
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
light1	Pearson Correlation	.074	-.174	.063	.112	.371**	-.136	1	.046	.050
	Sig. (2-tailed)	.534	.143	.599	.349	.001	.256		.701	.676
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
light2	Pearson Correlation	-.105	.269*	.096	.080	.040	.100	.046	1	.122
	Sig. (2-tailed)	.382	.023	.422	.504	.736	.406	.701		.308
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72
ratio	Pearson Correlation	.150	.050	-.284*	-.319**	.008	.085	.050	.122	1
	Sig. (2-tailed)	.208	.676	.016	.006	.948	.475	.676	.308	
	N	72	72	72	72	72	72	72	72	72

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

จากตารางที่ 6 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Pearson พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างบางปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของบ่อปูที่นำมาศึกษา เช่น อุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิในอากาศมีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูงในทางบวก ($r=0.829$, $P<0.01$) ความเค็มและอุณหภูมิของน้ำมีความสัมพันธ์ในทางลบ ($r=-0.466$, $P<0.01$) ส่วนอัตราการตายต่อ 1 แพเรือ มีความสัมพันธ์ทางลบกับอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิในอากาศ ($r = -0.284$, -0.319 , $P < 0.05$, $P < 0.01$) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายต่อ 1 แพเรือและอุณหภูมิ น้ำและอุณหภูมิในอากาศ (ตัวแปรอิสระ) โดยใช้การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น เล็กตัว

แปรอิสระด้วยวิธี Stepwise พบว่ามีเพียงตัวแปรอุณหภูมิในอากาศที่มีความสำคัญในการอธิบายความผันแปรของอัตราการตายของปูที่เลี้ยง ต่อเรือด้วยสมการด้านล่าง

$$ratio = 8.518 - 0.236tempair$$

(ratio คืออัตราการตาย, tempair คืออุณหภูมิในอากาศ) และจากข้อมูลตารางที่ 7 คือถ้าอุณหภูมิในอากาศเพิ่มขึ้น 1 หน่วยองศาเซลเซียส อัตราการตายจะลดลง (ตามอุณหภูมิ ณ วันที่เก็บ) แต่สามารถอธิบายความผันแปรได้เพียง 10.10 เปอร์เซ็นต์ คือค่าอุณหภูมิในอากาศสามารถอธิบายความผันแปร (ของข้อมูล) ต่ออัตราการตายของปูได้เพียง 10.10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นตัวแปรหรือปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยอื่นที่ไม่ได้นำมาพิจารณาอาจมีผลต่อการอธิบายความผันแปรของอัตราการตายของปูต่อ 1 แพเรือได้

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์การถดถอยระหว่างอัตราการตายต่อ 1 แพเรือและอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิในอากาศ

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.319 ^a	.101	.089	1.41239

a. Predictors: (Constant), tempair

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	8.518	2.477		3.439	.001
	tempair	-.236	.084	-.319	-2.811	.006

a. Dependent Variable: ratio

4. วิจารณ์การทดลอง (Discussion)

จากผลการศึกษาอาการท้องแดงในปูทะเลโดยเรียงจากที่มีอาการมากไปสู่น้อยคือปูทะเลที่จุด haemolymph ออกมามีสีขาวคล้ายน้ำมัน ปูที่มี haemolymph สีส้มขาวและปูที่มี haemolymph สีส้ม ซึ่งสอดคล้องกับอาการของโรคและอวัยวะที่ศึกษา คืออวัยวะมีลักษณะที่นิ่มเหลวและสีซีดก็เรียงจากมากไปน้อยตามลำดับเหมือนข้างต้น ลักษณะ haemolymph สีขาวคล้ายน้ำมันนี้ คล้ายกับการติดเชื้อจาก *Hematodinium* sp. ในสัตว์ crustacean ชนิดต่าง (Meyer และคณะ, 1987; Shields., 1994; Taylor และ Khan., 1995; Shields และ Squyers., 2000; Stentiford และคณะ, 2002) คือเมื่อสัตว์ได้รับเชื้อโรคขั้นรุนแรงทำให้ haemolymph ไม่สามารถแข็งตัวได้ (Meyer และคณะ, 1987; Shields และ Squyers., 2000) ซึ่งการแข็งตัวของ haemolymph นั้นเป็นกลไกสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของพวก crustacean มีรายงานที่เสริมเพิ่มเติมว่าการที่ haemolymph ไม่แข็งตัวนี้เป็นเพราะมีการติดเชื้อจากจุลชีพหรือพาราสิตจำนวนมาก (Stentiford และ Shields., 2005) โดยมีรายงานของ Lee และคณะ (1999) ที่ทดลองฉีด extracellular products (ECP) ที่ผลิตจาก *V. harveyi* จากกุ้งกุลาดำคือ tiger prawn (*Penaeus monodon*) แล้วพบว่า 2 ชั่วโมงต่อมาพบว่า haemolymph ของกุ้งในกลุ่มทดลองสูญเสียความสามารถในการแข็งตัวและจากรายงานของ Salaenoi และคณะ (2006) ได้นำ haemolymph ของปูทะเลที่มีอาการท้องแดงที่มีขาวขุ่นคล้ายน้ำมันมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน haemolymph พบว่าไม่พบแถบโปรตีนของออกซีไฮโมไซยานินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75 kDa และการวิเคราะห์ปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบใน haemolymph ได้แก่ ทองแดง (copper) และสังกะสี (zinc) พบว่ามีปริมาณธาตุน้อยกว่าปูปกติ 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ แต่ปริมาณแคลเซียม (calcium) แมกนีเซียม (magnesium) และเหล็ก (iron) มีปริมาณมากกว่าปูปกติ

การศึกษาพบการติดเชื้อของอวัยวะจากปูที่มีอาการท้องแดงระยะที่ 3 ได้ศึกษาพบแบคทีเรีย 4 ชนิด และเมื่อเพิ่มจำนวนของยีน 16S rRNA แล้วนำไปหาลำดับกรดนิวคลีอิกและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อที่จะระบุชนิดของแบคทีเรียพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-A และสายพันธุ์ RC2Hep-D เป็น *Morganella morganii* และสายพันธุ์ RC2Hep-E เป็น *Pseudomonas* sp. ในขณะที่ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-B เหมือนกับแบคทีเรียที่จากทะเลแต่ยังไม่ทราบชนิด แต่จากรายงานต่างๆ ที่ได้เคยทำวิจัยในปูทะเล *Scylla serrata* (Forsk.) ว่าพบว่ามีพาราสิตที่ก่อให้เกิดโรคที่มีอาการคล้ายกันนี้ โดย Hudson และ Lester (1994) ได้ศึกษาปู *Scylla serrata* (Forsk.) จำนวน 130 ตัว จากอ่าว Moreton รัฐควีนแลนด์ ในประเทศออสเตรเลีย พบว่ามีพาราสิตจำนวน 10 ชนิด ที่อาศัยรวมอยู่กับโฮสต์ 4 ชนิด ที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงคือ โปรโตซัวที่พบใน

เลือด (blood protozoan) *Hematodinium* sp. โปรโตซัวที่มีขน (ciliates) บนผิวหนังของร่าง คือ *Epistylis* sp. กับ *Acineta* sp. และเพรียง (barnacle)

สำหรับการศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจากอวัยวะ 7 อวัยวะ คือส่วนที่ปกคลุมของร่างกาย ตับ เหงือก กล้ามเนื้อท้อง กล้ามเนื้อก้ามปู กระเพาะอาหารและกล้ามเนื้อหัวใจ แสดงให้เห็นว่าปูที่มีอาการท้องแดงทุกระยะมีการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่ง แท่งโค้งงอและลักษณะกลม ซึ่งสอดคล้องกับการที่ปูติดเชื้อจากแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด โดยผลจากการศึกษาทางจุลชีววิทยาของปูที่มีอาการท้องแดงสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ แต่กลับไม่พบเชื้อแบคทีเรียในปูปกติ ซึ่งแสดงว่าอาการท้องแดงได้บ่งบอกว่าปูอ่อนแอด้วยสาเหตุใดยังไม่ทราบและทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งแตกต่างกับรายงานจากต่างประเทศที่พบว่าปูทะเลและสัตว์ทะเลที่มีอาการท้องแดงมีการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. ดังรายงานของ Shields (1994) พบการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. ในการเลี้ยงปูและกุ้ง ในไข่ (oocyte) กระเพาะอาหาร เนื้อเยื่ออ่อนนุ่มและช่องว่างภายในลำตัว (haemal sinuses) มีรายงานการแพร่ระบาดที่ติดเชื้อ *Hematodinium* sp. ที่เป็นสาเหตุโรค Bitter crab disease (BCD) โดย Eaton และคณะ (1991) รายงานว่าปู Tanner crabs (*Chionoecetes bairdi*) จากหมู่เกาะ Sullivan ทางตะวันออกเฉียงใต้ในรัฐอลาสก้า เกิดโรค BCD เมื่อเข้าสู่ฤดูร้อนซึ่งพบการแพร่ระบาดและการติดเชื้อมากที่สุด เมื่อเข้าสู่ฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาวก็จะเริ่มลดลงตามลำดับและเมื่อเข้าสู่ฤดูใบไม้ผลิจะเริ่มพบการแพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้นอีกครั้ง นอกจากนี้ Octolasmis Taylor และ Khan (1995) ศึกษาการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. (Dinoflagellata: Syndinidae) ที่เป็นสาเหตุของโรค BCD ในปู *Chionoecetes opilio* ที่ หมู่เกาะ Newfoundland ประเทศแคนาดา ในปี ค.ศ. 1992 ถึง ค.ศ. 1993 พบว่ามีการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. จำนวน 3.7 เปอร์เซ็นต์ ของปูที่จับทั้งหมด 135 ตัว นอกเหนือจากนี้ Field และคณะ (1998) ศึกษาการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. ในกุ้ง Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) บริเวณรอบชายฝั่งตะวันตกของประเทศสกอตแลนด์ โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนเมษายน ค.ศ. 1992 ถึงเดือนมีนาคม ค.ศ. 1995 พบว่ามี *Hematodinium* sp. มีการแพร่ระบาดอยู่ในช่วงครึ่งปีแรกคือมีการแพร่ระบาดสูงสุดในฤดูใบไม้ผลิและก่อนเข้าสู่ฤดูร้อน และยังพบว่ากุ้งเพศเมียที่มีขนาดกลางจะมีการติดเชื้อมากที่สุด ส่วน Stentiford และคณะ (2002) ศึกษาทางมิวซัพยาธิวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกันและเทคนิคทางพีซีอาร์ (PCR) ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) ที่แสดงอาการติดเชื้อโรค Pink crab disease (PCD) ในช่วงฤดูหนาวของปี ค.ศ. 2000 ถึง ค.ศ. 2001 พบว่ามีการติดเชื้อคล้าย *Hematodinium* sp. ที่ทำให้เกิดโรค PCD โดยพบ *Hematodinium* sp. ระยะพลาสโมเดียมและระยะเจริญเต็มวัยในเลือดและทำให้ tubule cell ของตับมีเซลล์ลดน้อยลง

Stentiford และคณะ (2003) ศึกษาในปู *Cancer pagurus* และปู *Necora puber* ที่แสดงอาการติดเชื้อ PCD จาก South coast ของเกาะ Guernsey และบริเวณส่วนหัวเข้าชายฝั่ง Newton ประเทศอังกฤษ ระหว่างเดือนธันวาคม ค.ศ. 2001 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ค.ศ. 2002 และนำมาศึกษาทางพยาธิวิทยาและศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าปู *Cancer pagurus* ติดเชื้อ *Hematodinium* sp. ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และปู *Necora puber* มีการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อจากยีสต์ร่วมกับการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. ด้วย

Pestal และคณะ (2003) ศึกษาการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. ในปู *Chionoecetes opilio* จากอ่าว Conception หมู่เกาะ Newfoundland ประเทศแคนาดา ระหว่างวันที่ 20 กันยายนถึงวันที่ 9 ตุลาคม ค.ศ. 1998 โดยศึกษาลักษณะภายนอกและนำเลือด มาตรวจหาการติดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. สูงขึ้นมากกว่าการรายงานการแพร่ระบาดที่พบครั้งแรกของ Taylor และ Khan (1995)

Shields และคณะ (2005) รายงานการแพร่ระบาดของโรค BCD ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. ในปู snow crab (*Chionoecetes opilio*) จากหมู่เกาะ Newfoundland ประเทศแคนาดา โดยทำการสำรวจตั้งแต่ ค.ศ. 1997 ถึง ค.ศ. 2003 จากอ่าว Conception อ่าว Bonavista และแหล่งจับปลาชื่อ Avalon พบว่าใน ค.ศ. 1999 พบการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. บริเวณอ่าว Bonavista และอ่าว Conception ใน ค.ศ. 2000 พบการแพร่ระบาดของ *Hematodinium* sp. บริเวณอ่าว Conception ในปูเพศผู้ประมาณ 2 ถึง 9 เปอร์เซ็นต์ และในปูเพศเมียประมาณ 19 ถึง 26 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานยังพบว่าปูเพศเมียและปูเพศผู้ที่มีขนาดเล็กมีการติดเชื้อ *Hematodinium* sp. มากที่สุด

ในงานวิจัยนี้พบแต่การติดเชื้อแบคทีเรียโดยไม่พบพาราสิตและจากการที่ได้นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RC2Hep-A, RC2Hep-B, RC2Hep-E ที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการท้องแดงฉีดเข้าสู่ปูปกติ แล้วพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถก่อโรคในปูปกติได้ ถึงแม้ว่าการฉีดเชื้อสายพันธุ์ RC2Hep-A เข้าสู่ปูปกติในการทดลองครั้งที่ 1 จะสามารถทำให้ปูตายได้ และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียออกมาจากปูที่ตายได้ แต่การทดลองอีก 3 ครั้งก็ไม่เกิดผลเช่นเดียวกับปู ซึ่ง dose ที่ฉีดก็ถือว่าเป็น dose ที่เพียงพอต่อการก่อโรคแล้วและแม้ว่าจะติดตามผลต่ออีก 30 วัน ก็ไม่ส่งผลต่อการก่อโรคท้องแดงและปูทะเลนั้นก็ไม่ได้แสดงอาการอ่อนแอ จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้อาจไม่ใช่เชื้อที่เป็นสาเหตุของอาการท้องแดง แต่ปูที่มีอาการท้องแดงอาจเป็นอาการที่เกิดจากปูนั้นมีสุขภาพไม่ดี ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นั้นไปก่อให้เกิด Secondary infection และสามารถเจริญอยู่ในปูที่สุขภาพไม่ดี

ได้ ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้คาดว่าเชื้อแบคทีเรียอาจเข้าไปภายในร่างกายโดยเข้าไปกับน้ำทะเลผ่านจากเหงือกแล้วเข้าสู่กระแสเลือดและไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ แต่มีรายงานที่กล่าวถึงการฉีดพาราสิตสู่ปูปกติของ Shields และ Squyers (2000) ที่ฉีดเชื้อ *Hematodinium perezii* ระดับความเข้มข้น 1,000-100,000 เซลล์เข้าปู blue crabs (*Callinectes sapidus*) เพศเมียแล้วพบว่าปูเริ่มตายในวันที่ 14 หลังจากฉีดเชื้อและพบความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ลดลง พาราสิตจะเพิ่มขึ้นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ หลังจากฉีดเชื้อในวันที่ 14 จากนั้นพาราสิตจะเพิ่มขึ้น 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากฉีดเชื้อในวันที่ 21 และติดเชื้อพาราสิตเพิ่มขึ้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากฉีดเชื้อในวันที่ 35

ผลจากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพของฟาร์มเพาะเลี้ยงปูต่ออัตราการตายของปู โดยใช้ตัวแปร 7 ตัวแปร คือการวัดแสงที่ผิวและใต้ น้ำ ความโปร่งแสงของน้ำ อุณหภูมิในน้ำและในอากาศ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำและความเป็นกรด-ด่าง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Stepwise method of variable selection พบว่าได้แม่แบบ (model) คือ $ratio = 8.518 - 0.236tempair$ ซึ่งแสดงว่าอุณหภูมิจากอากาศที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงปูเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่ออัตราการตายของปู (มีผลเพียง 10.10% ซึ่งถือว่าเมื่อเทียบไปแล้วแทบจะไม่มีผลต่อการตายของปู) ส่วนปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ไม่มีผลต่อการตายของปูแต่อย่างใด

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

ดิฉันขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้พิจารณาให้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ในปี พ.ศ. 2550 แก่ดิฉันในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาและ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่ได้สนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ดิฉันขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ผิวนิม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กมลชนก พาณิชยการ ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือทางด้านสถิติ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขันและผู้ช่วยศาสตราจารย์

ดร. ธนาพร ชื่นอิ่ม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือทางจุลชีววิทยาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณ คุณนวลอนงค์ นาคคง ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกด้านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและให้ความช่วยเหลือต่างๆ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณคุณวิบูลย์ ลีศิริชัยกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ฟาร์มเพาะเลี้ยงปูในการทำวิจัยสุดท้ายนี้ดิฉันขอขอบคุณทุกๆ ท่านในครอบครัว “อารีกิจเสรี” ที่ได้ให้ความเข้าใจและคอยเป็นกำลังใจให้ จนทำให้ดิฉันสามารถทำงานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- Boeger, W. A. et al. 2005. Lethargic crab disease: multidisciplinary evidence supports a mycotic etiology. Mem inst oswaldo cruz, Rio de Janeiro. 100: 161-167.
- Davis, J. W., and R. K. Sizemore. 1982. Incidence of vibrio species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. Applied and environmental microbiology 43: 1092-1097.
- Eaton, W. D. et al. 1991. Preliminary results on the seasonality and life cycle of the parasitic dinoflagellate causing bitter crab disease in Alaskan tanner crabs (*Chionoecetes bairdi*). J. Invertebr. Pathol. 57: 426-434.
- Field, R. H. et al. 1998. Distribution and seasonal prevalence of *Hematodinium* sp. Infection of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) around the west coast of Scotland. Journal of marine science 55: 846-858.
- Fishbein, M., Mehlman, I.J., and J. Pitcher. 1970. Isolation of *vibrio parahaemolyticus* from the processed meat of Chesapeake bay blue crabs. Applied microbiology 20:176-178.
- Johnson, P.T. 1976. Bacterial infection in blue crab. *Callinectes sapidu*: course of infection and histopathology. J. Invertebr. Pathol. 28: 25-36.

- Hudson, D.A., and R. J. G., Lester. 1994. Parasites and symbionts of wild mud crabs *Scylla serrata* (Forskall) of potential significance in aquaculture. *Aquaculture* 120: 183-199.
- Huq, A. et al. 1986. Colonization of gut of blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Applied and environmental microbiology* 52: 586-588.
- Kaewsangiem, S., Salaenoi, J., Narkkong, N., Veerapraditsin, T., and M. Areekijseree. 2006. Histopathology of red sternum syndrome in mud crab (*Scylla serrata* Forskall 1775) collected from soft-shell crab farm. *Journal of microscopy of Thailand* 20: 207-208.
- Lindner, B. 2005. Impact of mud crab hatchery technology in Vietnam. *Impact Assessment Series Report* 36: pp 66.
- Meyer, T. R. et al. 1987. Bitter crab disease: A fatal dinoflagellate infection and marketing problem for Alaskan Tanner Crabs *Chionoecetes bairdi*. *Dis. Aquat. Org.* 3: 195-216.
- Park H. C., Sorenson W.G. and R.J. Davis. 1978. Aquatic oomycetes in farm ponds in Bryan County, Oklahoma. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 58: 48-53.
- Pestal, et al. 2003. Monitoring the prevalence of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. in snow crabs *Chionoecetes opilio* from Conception Bay, Newfoundland. *Dis.Aquat.Org*, 53: 67-75.
- Salaenoi, J., Sangcharoen, A., Thongpan, A. and M. Mingmuang. 2006. Morphology and haemolymph composition changes in red sternum mud crab (*Scylla serrata*) *Kasetsart Journal (Nat.Sci.)* (in press).
- Shields, J. D. 1994. The parasitic dinoflagellates of marine crustaceans. *Ann. Rev. Fish Dis*, 4: 241-271.
- Shields, J. D., and C. M. Squyers. 2000. Mortality and hematology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, experimentally infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii*. *Fish. Bull.* 98:139-152.

- Shield, J.D. et al. 2005. Epidemiology of bitter crab disease (*Hematodinium* sp.) in snow crabs *Chionoecetes opilio* from Newfoundland, Canada. Dis. Aquat. Org, 64 (2005): 253-264.
- Stentiford, G.D., Neil, D.M., and R.J.A. Atkinson. 2001. The relationship of *Hematodinium* infection prevalence in a Scottish *Nephrops norvegicus* population to season, molting and sex. Journal of marine science 58: 814-823.
- Stentiford, G.D. et al. 2000. Alterations in the biochemistry and ultrastructure of the deep abdominal flexor muscle of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* during infection by a parasitic dinoflagellate of the genus *Hematodinium*. Dis. Aquat. Org. 42: 133-141
- Stentiford, G.D. et al. 2002. Infection by *Hematodinium*-like parasitic dinoflagellate cause Pink Crab Disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus*. Journal of Invertebrate Pathology 79:179-191.
- Stentiford, G.D. et al. 2003. Co-infection by a yeast-like organism in *Hematodinium*-infected European edible crabs *Cancer pagurus* and velvet swimming crabs *Necora puber* from the English Channel. Dis Aquat. Org. 54:195-202.
- Taylor, D. M. and R. A. Khan. 1995. Observations on the Occurrence of *Hematodinium* sp. (Dinoflagellata: Syndinidae), the Causative Agent of Bitter Crab Disease in Newfoundland snow crab (*Chionoecetes opilio*). Journal of Invertebrate Pathology 65: 283-288.
- Vogan, et al. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus*-isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. Microbiology 148: 743-754.
- Chukanhom K and Hatai K. 2004. Freshwater fungi isolated from eggs of the common crab (*Cyprinus carpio*) in Thailand. Mycoscience 45 (1): 42-48.

Out put ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานวิจัยได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ได้ส่ง Manuscript เรื่อง Histopathology and classification of microorganisms from the infected tissues of red sternum syndrome in mud crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775) ในวารสารระดับนานาชาติชื่อ “J. of Invertebrate Pathology” ซึ่งวารสารนี้มี impact factor ประมาณ 1.2 (ผลงานวิจัยอยู่ในภาคผนวก)

2. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.1 กิจกรรมของผลงานส่วนแรก (ปีที่ 1) ผู้วิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง “Pathobiological Study of Red Sternum Syndrome in Thai Mud Crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775)” ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส” จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานการอุดมศึกษา ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ จอมเทียน เมืองพัทยา ระหว่างวันที่ 11-13 ตุลาคม พ.ศ. 2550 (ผลงานวิจัยอยู่ในภาคผนวก)

2.2 ผู้วิจัยจะได้นำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง “Histopathology and classification of microorganisms from the infected tissues of Red sternum syndrome in mud crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775)” ในการประชุม ที่จะจัดขึ้นโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานการอุดมศึกษา นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส” จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานการอุดมศึกษา ณ โรงแรมริเจน-ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี ระหว่างวันที่ 16-18 ตุลาคม พ.ศ. 2551 (ผลงานวิจัยอยู่ในภาคผนวก)

ลงนาม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรา อารีกิจเสรี
(หัวหน้าโครงการวิจัยที่รับทุน)

ภาคผนวก ข

ผลงานวิจัยที่ส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ภาคผนวก ค

กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

การนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการระดับประเทศ

เรื่อง “Pathobiological Study of Red Sternum Syndrome in
Thai Mud Crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775)”

และ

เรื่อง “Histopathology and classification of microorganisms from the infected
tissues of Red sternum syndrome in mud crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775)”

Pathobiological Study of Red Sternum Syndrome in Thai Mud Crabs

(*Scylla serrata* Forskal 1775)

Areekijserree, M.^{1*}, Chuenlm, T.², Kaewsangiem, S.¹, Narkkong, N.³, Pewnim, T.⁴

¹Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand

²Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand

³Central Instruments Center, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand

⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand

Abstract

Mud crab (*Scylla serrata* Forskal 1775) is one of intensive commercial animals of Thailand that has been exported accounted for more than 5,000 millions baht in 2005. This is because of their good taste and high nutrition. In Thailand, distribution of mud crabs was along the coastal water and they also have been cultured for more than 20 years. The culture of mud crabs was found in several provinces; Chantaburi, Trat, Samutsongkram, Ranong and Trang. From our observation of the soft-shell mud crab farm in Samutsongkram province (during December 2006 to June 2007), we found some crabs showing the abnormal symptom. These crabs had soft carapace, red chelae and joint, pale hepatopancreas, gill and loose muscles, while their haemolymphs were reddish in color. They also appeared limited movement and their meat seemed bitter. The crabs also showed signs of inactive, non-moving, and finally dead. To identify the cause of syndrome, haemolymph and 7 organs of mud crab; integument, hepatopancreas, gill, muscle, claw muscle, stomach and heart were dissected and examined using electron microscopy. The results indicated that red sternum mud crabs were infected with rod-shape or curved rod-shape bacteria in all investigated organs and haemolymphs. More investigation should be done to confirm the exactly causes of red sternum syndrome. Nevertheless this study could be used as a fundamental data that could be useful for further analysis.

Keywords: electron microscopy, pathobiology, mud crab, Red sternum syndrome

* Corresponding author.

Tel.: 6634-243429, 01-4937640; Fax: 6634-255820

E-mail address: Maijackee@yahoo.com

**Histopathology and classification of microorganisms from the infected tissues of
Red sternum syndrome in mud crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775)**

Areekijsee, M.^{1*}, Chuen-Im, T.², Kaewsangiem, S.¹, Narkkong, N.³, Pewnim, T.⁴

¹*Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand*

²*Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand*

³*Central Instruments Center, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham,
Thailand*

⁴*Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand*

Abstract

Observation of abnormal mud crabs (*Scylla serrata* Forskal 1775), red sternum character, was carried out by collecting samples from crab farms in Samutsongkhram province, Thailand. These crabs had soft carapaces, red chelae and joints, pale hepatopancreases, gills, and loose muscles. They also appeared less movement, and finally died. Examination of haemolymph revealed 3 broad stages of the syndrome, namely, orange, orange-white, and milky-white in colors. To identify the cause of syndrome, haemolymph and 7 organs of mud crabs; integuments, hepatopancreases, gills, abdominal muscles, claw muscles, stomachs, and hearts were dissected and histopathologically examined using transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM). Closer examination found infection of rod-, curve rod-, or coccus-shape bacteria with thin and thick cell wall in all investigated organs and haemolymph. Isolation of microorganisms from the infected tissues of red sternum syndrome crabs resulted in 5 types of bacteria. No any microorganism growth observed in the normal crabs. Interestingly, these isolated bacteria can be classified following the severity of the disease. Additionally, the degree of bacterial infection found was following to the stages of disease. It was postulated that the bacteria entered the crabs via gills, migrated through circulation, before reaching these organs.

Keywords: histopathology, mud crabs, Red sternum syndrome

* Corresponding author.

Tel.: 6634-243429, 01-4937640; Fax: 6634-255820, E-mail address: Maijackee@yahoo.com