

ประสิทธิผลของ Bronopol ในการยับยั้งเชื้อไวรัส และ
ความเป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) วัยอ่อน



นางสาวญาณิน ลิ้มปานนท์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา โรคสัตว์น้ำ ภาควิชา อายุรศาสตร์


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN : 974-17-6165-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFICACY OF BRONOPOL FOR VIBRIO CONTROL AND TOXICITY EVALUATION ON
BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) LARVAE



Miss Yanin Limpanon

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Aquatic Animal Diseases

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN : 974-17-6165-1

ญาณิน ลิ้มปานนท์ : ประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งเชื้อ vibrio และความเป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) วัยอ่อน [EFFICACY OF BRONOPOL FOR VIBRIO CONTROL AND TOXICITY EVALUATION ON BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) LARVAE] อ.ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย
อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ และ ที่ปรึกษาร่วม : ดร.วารินทร์ ธนาสมหวัง 101หน้า. ISBN : 974-17-6165-1

ศึกษาการใช้ bronopol เพื่อป้องกันการติดเชื้อ vibrio ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) วัยอ่อน ทดสอบการออกฤทธิ์ของ bronopol โดย 1) antimicrobial agar dilution susceptibility tests 2) ผลของน้ำทะเลต่อประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrio 3) ความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน 4) ความเป็นพิษของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของลูกกุ้งวัยอ่อน และ 5) ประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อ vibrio ในกุ้งกุลาดำระยะ postlarva การศึกษาพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol ที่สามารถยับยั้งเชื้อ vibrio ที่ใช้ทดสอบจำนวน 109 isolates (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำกลั่น คือ 2-32 µg/ml และเมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt คือ 4-16 µg/ml การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol พบว่าความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะ protozoa II postlarva 6 และ postlarva 18 ตายครึ่งหนึ่งเมื่อแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Lethal Concentration 50; LC₅₀) เท่ากับ 2.9 16.44 และ 61.34 µg/ml ตามลำดับ การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อการเปลี่ยนระยะของลูกกุ้งวัยอ่อนที่แช่ ≤6 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า bronopol ที่ความเข้มข้น ≥ 2 µg/ml มีผลลดอัตราการเปลี่ยนระยะของลูกกุ้ง การศึกษาพิษของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของลูกกุ้งในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt พบว่า bronopol ความเข้มข้น 8 µg/ml (MIC₅₀) และ 16 µg/ml (MIC₉₀) มีผลทำให้ chaetoceros และ rotifer มีจำนวนลดลง แต่ไม่มีผลต่อจำนวน artemia เมื่อตรวจนับที่ 24 ชั่วโมง หลังการแช่ การทดสอบประสิทธิภาพของ bronopol พบว่า bronopol สามารถป้องกันลูกกุ้งระยะ postlarva จากการติดเชื้อ vibrio ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขา โรคสัตว์น้ำ	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2547	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม
	ลายมือชื่อที่ปรึกษาร่วม

4575555031: MAJOR AQUATIC ANIMAL DISEASES

KEYWORD: BRONOPOL / BLACK TIGER SHRIMP LARVAE/ VIBRIOSIS

YANIN LIMPANON: EFFICACY OF BRONOPOL FOR VIBRIO CONTROL AND TOXICITY EVALUATION ON BLACK TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*)

LARVAE. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.JANENUJ WONGTAVATCHAI, Ph.D

THESIS COADVISOR : ASS.PROF.MEENA SARIKAPUTI, Ph.D, DR.VARIN

THANASOMWANG, Ph.D. 101 PP. ISBN : 974-17-6165-1

The study is to conduct a protocol for the use of bronopol as a prophylactic treatment of epizootic vibriosis in larval stages of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *In vitro* and *in vivo* activities of bronopol against clinical vibrio isolates were studied: 1) antimicrobial agar dilution susceptibility test, 2) effect of components in sea water on antimicrobial activity, 3) acute and subacute toxicity of bronopol when applied in shrimp larval and postlarval stages, 4) toxicity of bronopol to the essential planktons and 5) prophylactic use of bronopol to control vibrio infection in shrimp postlarval stage. The observed Minimal Inhibitory Concentration (MIC) range for bronopol against 109 clinical vibrio isolates determined by antimicrobial agar dilution was 2-32 µg/ml on the test performed with Mueller Hinton Agar (MHA) dissolved in distilled water, and was 4-16 µg/ml with MHA dissolved in 30 ppt seawater. Acute toxicity of bronopol evaluated by Probit Analysis indicated the 24-hr Median Lethal Concentrations (LC₅₀) were 2.9, 16.44 and 61.34 µg/ml for protozoa II, 6 days and 18 days postlarvae (PL). Subacute toxicity of bronopol was studied in the morphological development of different larval stages exposed to sublethal concentrations of bronopol, ≤ 6 µg/ml, for 24 hr. Larvae exposed to ≥2 µg/ml bronopol presented lower metamorphosis, compared to the normal unexposed larvae. Bronopol at 8 µg/ml (MIC₅₀) and 16 µg/ml (MIC₉₀) in 30 ppt seawater showed no observed effect on artemia, while such treatment decreased the amount of chaetoceros and rotifer. The prophylactic use of bronopol tested in 30 ppt bioassay suggested the efficacy of bronopol to control vibrio infection in shrimp postlarvae.

Department Veterinary Medicine Student's signature

Field of Aquatic Animal Disease Advisor's signature

Academic year 2004 Co-advisor's signature

Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับความอนุเคราะห์และเกื้อกูลทั้งจากคณาจารย์ ผู้เชี่ยวชาญ และบุคลากรหลายท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.สพ.ญ.ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งให้ทั้งความรู้ ข้อคิด และสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ตลอดกระบวนการ ดร.วารินทร์ ธนาสมหวัง ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับคำแนะนำ และความอนุเคราะห์ตลอดการทดลอง ผศ.สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล สำหรับคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการทดลอง การเขียนและการนำเสนอวิทยานิพนธ์

รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ รศ.สพ.ญ.รัตนภรณ์ พรหมาสา ที่กรุณาตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ รศ.อัจฉรา ธวัชสิน สำหรับคำแนะนำทางด้านสถิติ และอาจารย์หน่วยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ

ทั้งนี้งานวิจัยส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณพรทิพย์ ทองบ่อ คุณอ่อนสี วงศ์คำ คุณแกลบ ทองจำรูญ และเจ้าหน้าที่โรงเพาะฟัก ศูนย์วิจัยและพัฒนาชายฝั่งสมุทรสาคร กรมประมงทุกท่าน ที่ให้ความรู้ และช่วยเหลือในการทดลอง ขอขอบคุณ คุณนพพรรัช ภาคิพันธ์ คุณมาลินี กิตกำธร สพ.ญ.สุกัญญา ผลิตกุล สพ.ญ.ณิธาวัน เจริญพร และสพ.ญ.นุชนารอด ทิพย์มงคลศิลป์ รวมถึงครอบครัวของผู้เขียนซึ่งมีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1. กุ้งกุลาดำ	4
1.1 การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ	4
1.1.1 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ	4
1.1.2 ระยะของลูกกุ้งกุลาดำและการจำแนก	4
1.2 แพลงก์ตอนที่ใช้เป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อน	10
2. Vibriosis ในกุ้งกุลาดำ	11
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ vibrio	11
2.2 การก่อโรคของเชื้อ vibrio ในกุ้งกุลาดำ	15
2.3 การจัดการปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ	17
3. bronopol	19
3.1 ลักษณะทั่วไปและการออกฤทธิ์	19
3.2 ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์	20
3.3 ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษ	21
3.4 รายงานการใช้ bronopol ในการรักษาโรคในสัตว์น้ำ	26

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	27
1. การทดสอบประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งเชื้อไวรัส	27
1.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัสโดยวิธี antimicrobial agar dilution susceptibility tests (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)	27
1.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ในน้ำทะเล	32
1.3 การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt	33
1.4 การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง (<i>in vivo</i>)	33
2. การศึกษาความเป็นพิษของ bronopol	34
2.1 การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol โดยหาค่าความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนตายครึ่งหนึ่ง ในเวลา 24 ชั่วโมง (lethal concentration 50; LC ₅₀)	34
2.2 การศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนแปลงระยะของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ...	35
2.3 การศึกษาผลของ bronopol ต่อจุลพยาธิสภาพของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน	36
2.4 การศึกษาผลของ bronopol ต่ออาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ได้แก่ chaetoceros rotifer และ artemia	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง	39
1. การทดสอบประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งเชื้อไวรัส	39
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ในน้ำจืด (ความเค็ม 0 ppt) และในน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)	39
การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt	46
การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง (<i>in vivo</i>)	48

	หน้า
2. การศึกษาความเป็นพิษของ bronopol	50
การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol โดยหาค่าความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้กิ้งกูดำวัยอ่อนตายครั้งหนึ่ง ในเวลา 24 ชั่วโมง (lethal concentration 50; LC ₅₀)	50
การศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนแปลงระยะของกิ้งกูดำวัยอ่อน	54
การศึกษาผลของ bronopol ต่อจุลพยาธิสภาพของกิ้งกูดำวัยอ่อน	56
การศึกษาผลของ bronopol ต่ออาหารของกิ้งกูดำวัยอ่อน ได้แก่ chaetoceros rotifer และ artemia	57
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	62
รายการอ้างอิง	67
ภาคผนวก	72
ภาคผนวก 1 ผลการวิเคราะห์ค่า MIC range ค่า MIC ₅₀ และ MIC ₉₀ ด้วย โปรแกรม WHONET	73
ภาคผนวก 2 การจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E	74
ภาคผนวก 3 แสดงการวิเคราะห์ค่า LC ₅₀ ในลูกกิ้งระยะ protozoell เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Probit analysis	75
ภาคผนวก 4 แสดงการวิเคราะห์ค่า LC ₅₀ ในลูกกิ้งระยะ postlarva 6 เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Probit analysis	79
ภาคผนวก 5 แสดงการวิเคราะห์ค่า LC ₅₀ ในลูกกิ้งระยะ postlarva 18 เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Probit analysis	83
ภาคผนวก 6 ผลการตรวจวัดค่า pH ในน้ำทะเลด้วย pH meter	86
ภาคผนวก 7 ผลการตรวจคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองด้วยชุดทดสอบ	87

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี	13
ตารางที่ 2	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายยา bronopol	29
ตารางที่ 3	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายยา oxytetracycline	30
ตารางที่ 4	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายยา enrofloxacin	31
ตารางที่ 5	แสดงค่า MIC ₅₀ MIC ₉₀ และ ช่วงค่า MIC ของยา bronopol oxytetracycline และ bronopol เมื่อละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)	40
ตารางที่ 6	แสดงค่า MIC ของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin เมื่อละลาย อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และ น้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)	41
ตารางที่ 7	แสดงปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในน้ำระบบปิดและการเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณเชื้อ แบคทีเรียหลังจากการใส่ bronopol 8 และ 16 µg/ml oxytetracycline 64 µg/ml และ enrofloxacin 16 µg/ml	46
ตารางที่ 8	ปริมาณ total vibrio count จากลูกกุ้ง postlarva 15 (x10 ² CFU/ตัว) และปริมาณ total bacteria count จากน้ำทะเล (x10 ² CFU/ml)	49
ตารางที่ 9	การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ protozoa II แสดงอัตราการตายของลูกกุ้ง เมื่อแช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	50
ตารางที่ 10	การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ PL6 แสดง อัตราการตายของลูกกุ้งเมื่อแช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	51
ตารางที่ 11	การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ PL18 แสดง อัตราการตายของลูกกุ้งเมื่อแช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	52
ตารางที่ 12	การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ protozoa แสดงจำนวนลูกกุ้งระยะ protozoa II ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ protozoa III เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง	54
ตารางที่ 13	การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ mysis แสดงจำนวนลูกกุ้งระยะ mysis I ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ mysis II เมื่อตรวจ ระยะที่ 24 ชั่วโมง	55

ตารางที่ 14	การทดสอบผลของ bronopol ต่อ แพลงก์ตอนที่ เป็นอาหารของ กุ้งกุลาดำ วัยอ่อน แสดงการเปลี่ยนแปลง ปริมาณของ chaetoceros ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol	57
ตารางที่ 15	การทดสอบผลของ bronopol ต่อ แพลงก์ตอนที่ เป็นอาหารของ กุ้งกุลาดำ วัยอ่อน แสดงการเปลี่ยนแปลง ปริมาณของ rotifer ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol	59
ตารางที่ 16	การทดสอบผลของ bronopol ต่อ แพลงก์ตอนที่ เป็นอาหารของ กุ้งกุลาดำ วัยอ่อน แสดงการเปลี่ยนแปลง ปริมาณของ artemia ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol	60



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ 1	แสดงวงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ	7
รูปที่ 2	แสดงลักษณะของ nauplius และ protozoa I – III	8
รูปที่ 3	แสดงลักษณะของ mysis I – III และ postlarva	9
รูปที่ 4	สูตรโครงสร้างของ bronopol	20
รูปที่ 5	แสดงการนับจำนวน chaetoceros ด้วย hemacytometer	37
รูปที่ 6	กราฟแสดงการกระจายของค่า MIC ของยา bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในน้ำจืด (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt).....	45
รูปที่ 7	กราฟแสดงปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย (10^3 CFU/ml) เมื่อใส่ bronopol 8 และ 16 μ g/ml oxytetracycline 64 μ g/ml และ enrofloxacin 16 μ g/ml	47
รูปที่ 8	การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้ง กราฟแสดงเส้นแนวโน้มอัตราการตายของลูกกุ้งระยะ protozoa II PL6 และ PL18 เมื่อแช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	53
รูปที่ 9	การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ protozoa กราฟ แสดงจำนวนลูกกุ้งระยะ protozoa II ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ protozoa III เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง	54
รูปที่ 10	การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ mysis กราฟแสดงจำนวนลูกกุ้งระยะ mysis I ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ mysis II เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง	55
รูปที่ 11	ภาพทางจุลพยาธิกายวิภาคของเนื้อเยื่อ hepatopancreas และ เหงือกของลูกกุ้ง กลุ่มควบคุมการทดลอง และลูกกุ้งที่สัมผัส bronopol ความเข้มข้น 8 μ g/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	56
รูปที่ 12	การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ chaetoceros ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol	58
รูปที่ 13	การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ rotifer ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol	59

รูปที่ 14 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน
กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ artemia ในระบบปิด หลังจากใส่
bronopol



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย และเป็นสินค้าส่งออกที่มีราคาสูง โดยประเทศไทยเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์ไปยังตลาดโลกนำรายได้เข้าสู่ประเทศประมาณปีละ 100,000 ล้านบาท (อัมรงค์, 2545) การสูญเสียผลผลิตของกุ้งกุลาดำในการเพาะเลี้ยงมีสาเหตุมากมาย สาเหตุหนึ่งที่มีความสำคัญและอาจก่อให้เกิดการตายของกุ้งในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมาก ได้แก่ การติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญและพบได้บ่อย คือ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio*

โรคติดเชื้อ *Vibrio* เป็นปัญหาที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แม้ว่าเชื้อ *Vibrio* จะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ปกติทั่วไปในน้ำ และเป็น opportunistic bacteria ในประเทศไทยพบว่าการเกิดโรคติดเชื้อ *Vibrio* (vibriosis) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตกุ้งอย่างมากในฟาร์ม โดยเชื้อ *Vibrio* นี้สามารถทำให้เกิดการตายในกุ้งเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งรุนแรงถึงขั้นมีอัตราการตาย 100% ในกุ้งที่มีภาวะเครียด (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994, Jiravanichpaisal *et al.*, 1995) เชื้อ *Vibrio* ชนิดที่ก่อโรคสามารถเข้าสู่ระบบเลือดของกุ้งโดยที่กุ้งไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียเหล่านี้ไม่ได้เป็นแบคทีเรียชนิดที่เป็นตัวก่อโรคอย่างแท้จริง แต่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ opportunistic pathogens และก่อให้เกิดโรคเมื่อกุ้งอยู่ในภาวะเครียดและอ่อนแอ (ลีลาและคณะ, 2540)

กุ้งป่วยที่มีการติดเชื้อ *Vibrio* พบว่า มีอาการร้ายขึ้นมามีบริเวณผิวหนังหรืออวัยวะอื่นบริเวณก้นบ่อ กุ้งป่วยส่วนใหญ่พบว่ามี zoothamnium สาหร่าย และเฟรียงมาเกาะบริเวณเหงือกและเปลือก ลำไส้ว่างเปล่า ตับและตับอ่อนหดตัวมีสีเข้ม ในกุ้งโตอาการที่พบจะรุนแรงน้อยกว่า โดยมักพบรอยถลอก ร่วมกับการเกิดสีน้ำตาลเข้มตามขอบของ uropods, pleopods, pereopods และแพนหาง ในบางครั้งอาจพบรอยโรคสีขาวหรือดำบริเวณใต้เปลือกและอาจพบ nodules สีดำขนาดเล็กในอวัยวะภายใน (Jiravanichpaisal *et al.*, 1995)

การควบคุมการติดเชื้อ *Vibrio* ในฟาร์มทำได้โดยการใช้อยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งการใช้อยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้องก่อให้เกิดปัญหาทั้งในด้านการเลี้ยงกุ้งและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เช่น เชื้อแบคทีเรียต้านทานต่อยา ทำให้การใช้อยาปฏิชีวนะไม่ได้ผลและอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นได้ และการตกค้างของยา

ปฏิชีวนะในเนื้อเยื่อ (Gräslund *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการจำกัดชนิดของยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับสัตว์ที่เป็นอาหาร (food producing animal) ทำให้เกษตรกรมีทางเลือกในการใช้ยาน้อยลง ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกุ่มกุลาดำที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพและความเป็นพิษของ bronopol ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพที่ได้รับการรับรองความปลอดภัยสำหรับการใช้ภายนอกในสัตว์น้ำที่เป็นอาหาร (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) และเป็นแนวทางการประเมินประสิทธิภาพและความเป็นพิษของยาใช้ภายนอกสำหรับสัตว์น้ำก่อนการนำมาใช้ในทางปฏิบัติ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งเชื้อไวรัส

1.1 หาความเข้มข้นของ bronopol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ bronopol กับยาปฏิชีวนะชนิด oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัส

1.2 ศึกษาผลของน้ำทะเลต่อประสิทธิภาพของ bronopol กับยา oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส

1.3 ศึกษาผลการใช้ bronopol ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสจากการทดลองในกุ่มกุลาดำวัยอ่อน

2. ศึกษาความเป็นพิษของ bronopol

2.1 หาความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้กุ่มกุลาดำวัยอ่อน ตาย 50% ในเวลา 24 ชั่วโมง

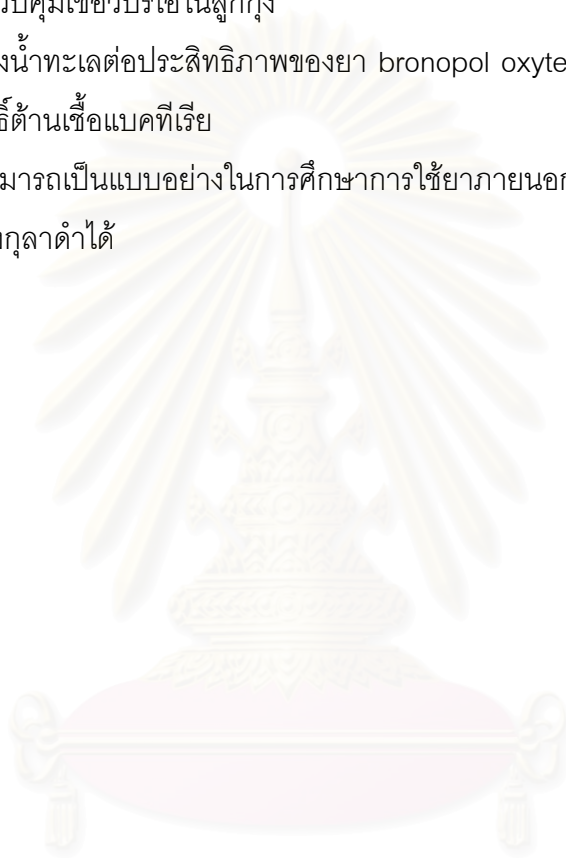
2.2 ศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนแปลงระยะของกุ่มกุลาดำวัยอ่อน

2.3 ศึกษาผลของ bronopol ต่อแผลงักต่อนที่เป็นอาหารของกุ่มกุลาดำวัยอ่อน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถประเมินความเหมาะสมในการนำ bronopol มาใช้เพื่อการควบคุมโรคติดเชื้อไวรัสในฟาร์มอนุบาลลูกกึ่ง จากการประมวลผลการศึกษาความเข้มข้นของ bronopol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส ความเข้มข้นของยาที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% ผลของยาต่อการเจริญเติบโตของลูกกึ่ง ผลของยาต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกึ่งกุลาดำวัยอ่อน และการทดลองใช้ยาควบคุมเชื้อไวรัสในลูกกึ่ง
2. ทราบถึงผลของน้ำทะเลต่อประสิทธิภาพของยา bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
3. การศึกษานี้สามารถเป็นแบบอย่างในการศึกษาการใช้ยาภายนอกชนิดอื่นๆเพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกึ่งกุลาดำได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กุ้งกุลาดำ

1.1 การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

1.1.1 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

ตามธรรมชาติกุ้งกุลาดำจะผสมพันธุ์และวางไข่ในทะเล ไข่กุ้งเป็นไข่จมและลูกกุ้งจะฟักออกจากไข่ภายใน 14 ชั่วโมง nauplius ที่ออกจากไข่ว่ายน้ำเข้าหาแสงขึ้นมายังบริเวณผิวน้ำ ลูกกุ้งระยะวัยอ่อนประกอบด้วย 3 ระยะ โดยแยกจากลักษณะที่แตกต่างกัน ได้แก่ nauplius protozoa (zoa) และระยะ mysis ก่อนจะเปลี่ยนระยะ (metamorphosis) เป็นระยะ postlarva (รูปที่ 1) อาหารของลูกกุ้งวัยอ่อนเปลี่ยนไปตามแต่ละระยะ โดยในระยะ nauplius ช่วงแรก ลูกกุ้งได้รับอาหารจากไข่แดงที่ติดมาตั้งแต่เกิด และเริ่มกิน phytoplankton และ zooplankton จนในระยะ mysis ลูกกุ้งสามารถกินอาหารได้หลากหลายชนิดมากขึ้นรวมทั้ง artemia (brine shrimp) จากนั้นลูกกุ้งเข้าสู่ชายฝั่งโดยอาศัยกระแสน้ำ เจริญเป็น postlarva และเข้าสู่ระยะ juvenile จากระยะนี้ลูกกุ้งออกทะเลอีกครั้งเข้าสู่ระยะโตเต็มที่พร้อมผสมพันธุ์และวางไข่ (Treece and Yates, 1990)

1.1.2 ระยะของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนและการจำแนก

1.1.2.1 ระยะ nauplius (รูปที่ 2)

ลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีขนาดเล็ก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น รูปร่างค่อนข้างกลม มีระยางค์สามคู่ ระยางค์คู่แรกเจริญเป็นหนวดคู่สั้น (first antenna) อยู่ด้านบนสุด ตอนปลายไม่แยกเป็นแฉก ระยางค์คู่ที่ 2 เจริญเป็นหนวดคู่ยาว (second antenna) และคู่ที่สามเจริญเป็น mandible อยู่ต่ำลงมาตามลำดับ ระยางค์ทั้งสองคู่นี้ส่วนปลายแยกเป็นแฉก ส่วนหางตรงปลายมี furcal spine ประมาณข้างละ 7 เส้น และทางด้านหน้ามีจุดสีดำซึ่งจะเจริญเป็นตาระยะหลัง (บรรจง, 2530) ระยะ nauplius ในกุ้งกุลาดำมีทั้งหมด 6 ระยะย่อย (ลอกคราบ 6 ครั้ง) หลังจากฟักออกจากไข่ nauplius เริ่มว่ายน้ำช้าๆ และเร็วขึ้นภายในครึ่งชั่วโมง การว่ายน้ำของ nauplius เกิดจากการเคลื่อนที่ของระยางค์ทั้งหมด 3 คู่ โดยมีการหยุดพักเป็นระยะ ลูกกุ้งระยะนี้ชอบว่ายน้ำเข้าหา

แสง (phototropic) ซึ่งการตอบสนองต่อแสงอย่างรวดเร็วของลูกกุ้งแสดงว่าลูกกุ้งมีสุขภาพดี อาหารของลูกกุ้งระยะนี้คือ ไข่แดง ลูกกุ้งอยู่ในระยะนี้ประมาณ 48 ชั่วโมง (36-51 ชั่วโมง) ที่ อุณหภูมิ 28 °C (Treece and Yates, 1990) ขนาดตัวยาวประมาณ 0.32 มิลลิเมตร (วีณะและ อหิงส์, 2531)

1.1.2.2 ระยะ protozoa หรือ zoea (รูปที่ 2)

ลูกกุ้งมีลำตัวยาวมากขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆลอยตัวขึ้นสู่น้ำ และเริ่มกิน อาหาร ระยะนี้ลูกกุ้งว่ายน้ำด้วย first และ second antennae เหมือนกับในช่วง nauplius แต่จะมี ส่วนของ first และ second maxiliped ซึ่งเจริญดีแล้วช่วยด้วย จังหวะในการว่ายน้ำช้าลงและ กระตุน้อยลง ลูกกุ้งระยะ protozoa กินอาหารตลอดเวลา โดยสังเกตได้ว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหาร เพียงพอทางเดินอาหารจะมีการบีบตัวและเห็นสายของสิ่งขับถ่ายเป็นเส้นยาว เมื่อลูกกุ้งอยู่ในช่วง ทำยของระยะนี้ส่วนของลำตัวจะมีลักษณะงอมากขึ้น ลูกกุ้งระยะ protozoa แบ่งเป็น 3 ระยะย่อย ใช้เวลา 4 วัน มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ได้แก่ protozoa I มีลักษณะลำตัวแบน เห็น carapace ชัด เจน เห็นส่วนตา first และ second maxiliped furcal process และ ทางเดินอาหาร ในระยะนี้ลูก กุ้งมีลำตัวยาว 0.85 มิลลิเมตร ระยะ protozoa II เริ่มเห็นก้านตา ส่วน rostrum ลักษณะเป็นกรี แผลมยื่นไปข้างหน้าและงุ้มลงด้านล่างเล็กน้อย และ supraorbital spines ส่วนของท้องเห็นการ แบ่งเป็นปล้อง ขนาดตัวยาวประมาณ 1.77 มิลลิเมตร และระยะ protozoa III เป็นปล้องท้องชัด เจนยิ่งขึ้น มี dorsal และ lateral spines เห็นส่วน uropods เป็น 2 แฉก ขนบริเวณหางข้างละ 6 เส้น ลำตัวยาว 1.8 มิลลิเมตร ลูกกุ้งระยะ protozoa กิน phytoplankton เป็นอาหาร โดย protozoa I และ II สามารถกิน phytoplankton ขนาด 3-5 และ 5-10 ไมครอนได้ตามลำดับ เมื่อ เข้าระยะ protozoa III สามารถกินได้หลายชนิดมากขึ้น (Treece and Yates, 1990; บรรจง, 2530) ลูกกุ้งในระยะนี้ไม่ชอบแสงเข้ม ดังนั้นควรมีฝาปิด เพราะเมื่อได้รับแสงเข้มเกินไปมักมีอาการ ตัวบิดงอ อ่อนแอ และจมสู่พื้นตายในที่สุด (วีณะและอหิงส์, 2531)

1.1.2.3 ระยะ mysis (รูปที่ 3)

ในระยะ mysis ส่วนของ antennae ลดขนาดลง ลูกกุ้งว่ายน้ำด้วย periopods และมี maxillipeds 3 คู่ ช่วยเหลือ ส่วนของลำตัวงอมากขึ้น ส่วนหัวจะอยู่ต่ำลง มีการเคลื่อนที่ถอยหลัง ไวต่อแสงลดลง ระยะ mysis I รูปร่างเหมือนกุ้งตัวเต็มวัยมากขึ้น ส่วน periopods เจริญดีขึ้น ส่วน first และ second antennae ลดขนาดลง uropods พัฒนาการขึ้น เห็นส่วน primordial pleopod buds ขนาดยาว 2.64 – 3.4 มิลลิเมตร ระยะ mysis II เห็นส่วน unsegmented pleopod buds ขนาดยาว 2.99-3.9 มิลลิเมตร และระยะ mysis III ส่วนของ pleopods พัฒนา

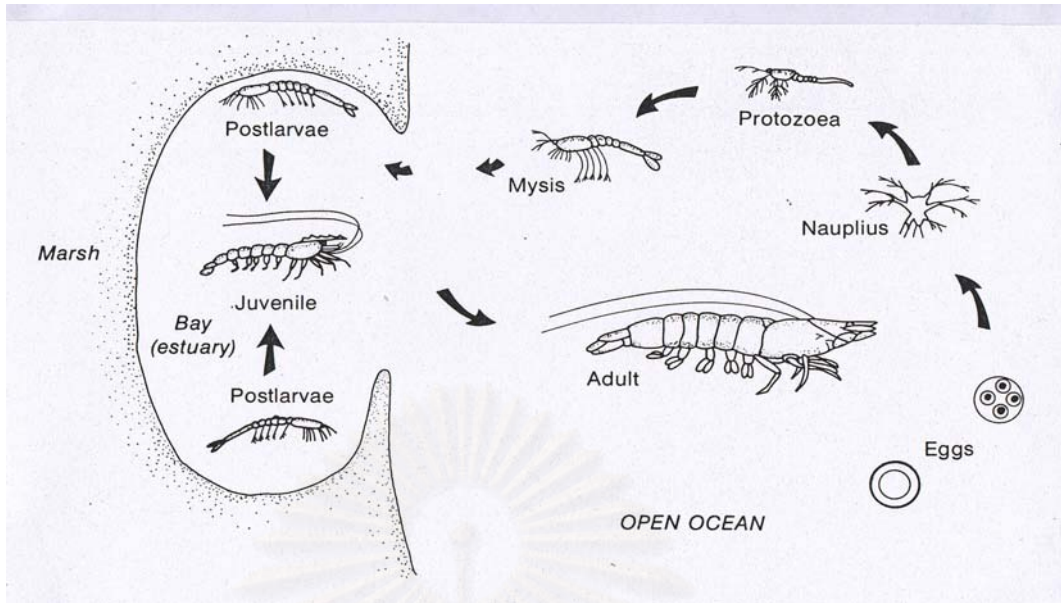
มากขึ้นและแบ่งเป็นข้อปล้อง ขนาดยาว 3.70-4.52 มิลลิเมตร ระยะ mysis แต่ละระยะย่อยลูกกุ้งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง (3-4 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง) อาหารของลูกกุ้งระยะนี้ คือ phytoplankton และกิน artemia ได้ (Treece and Yates, 1990)

1.1.2.4 ระยะ postlarva (รูปที่ 3)

ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีตัวยาวประมาณ 5.56 มิลลิเมตร ขาสำหรับเดินสามคู่แรกมีลักษณะเป็นก้ามมองเห็นชัด คู่แรกสั้นและคู่ที่สามยาวที่สุด หางจะแคบเข้าจนแหลม ลูกกุ้งในระยะนี้เริ่มมีระยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย กุ้งจะวิวัฒนาการไปเรื่อยๆจนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น กุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน มีความยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร หนักประมาณ 1.01-1.02 กรัม ในธรรมชาติลูกกุ้งระยะนี้อาศัยอยู่บริเวณป่าชายเลนหรือในแหล่งน้ำกร่อยประมาณ 3-4 เดือน จนเข้าสู่ระยะกุ้งวัยรุ่นเมื่ออายุได้ประมาณหกเดือนกุ้งจะเดินทางสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป



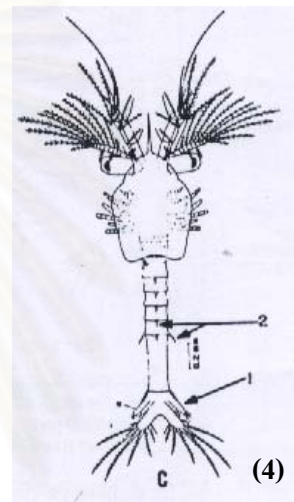
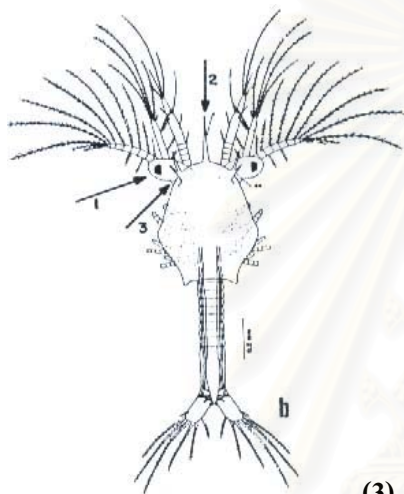
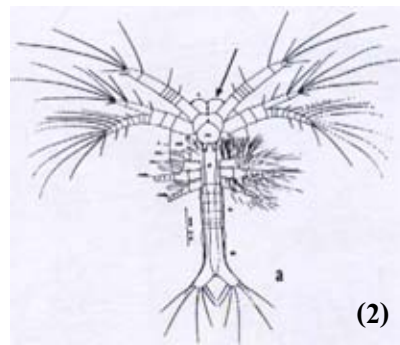
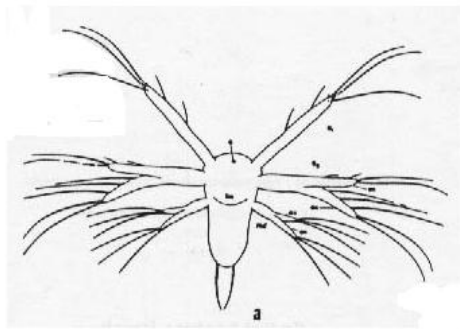
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ (Treece and Yates, 1990)

กุ้งกุลาดำวางไข่ในทะเล ลูกกุ้งฟักออกจากไข่ภายใน 14 ชั่วโมง เรียกลูกกุ้งวัยอ่อนระยะแรกนี้ว่า nauplius ลูกกุ้งอยู่ในระยะนี้ มีการลอกคราบ 6 ครั้ง ในเวลาประมาณ 36-51 ชั่วโมงแล้วเข้าสู่ระยะ protozoa โดยใช้เวลาในระยะ protozoa ประมาณ 4 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง ก่อนเข้าสู่ระยะ mysis โดยอยู่ในระยะ mysis 3-4 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง เข้าสู่ชายฝั่งเจริญเป็นลูกกุ้งระยะ postlarva ประมาณ 3-4 เดือน จนเข้าสู่ระยะ juvenile จากนั้นกุ้งจะออกจากชายฝั่งเจริญเข้าสู่ระยะโตเต็มวัยในทะเล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



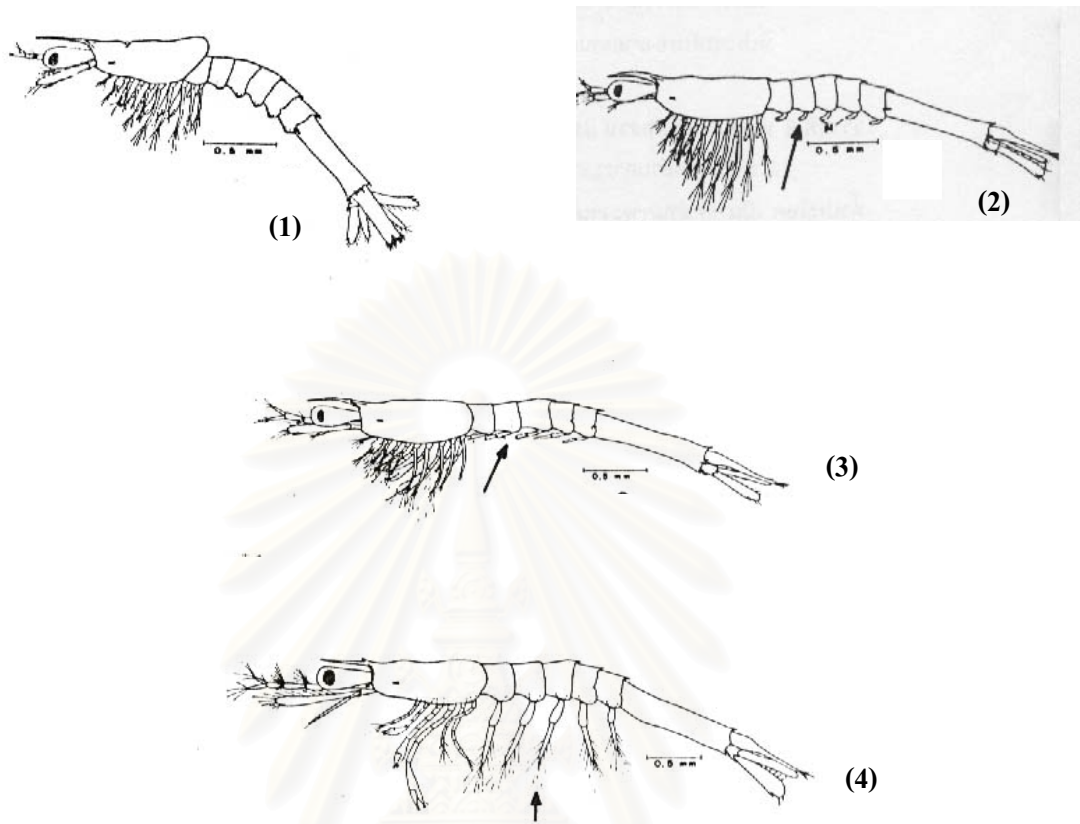
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ nauplius และ protozoa I – III (Treece and Yates, 1990)

(1) ระยะเวลา nauplius

(2) ระยะเวลา protozoa I : ลูกศรแสดงส่วนของตา

(3) ระยะเวลา protozoa II : eye stalk (ลูกศร 1) ; rostrum (ลูกศร 2) ; supraorbital forked spines (ลูกศร 3)

(4) ระยะเวลา protozoa III : biramous uropods (ลูกศร 1) ; dorsal และ lateral spines บริเวณ abdominal somite (ลูกศร 2)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ mysid I – III และ postlarva (Treece and Yates, 1990)

- (1) ระยะเวลา mysid I : รูปร่างมีลักษณะเหมือนกุ้งมากขึ้น ตัวงอ
- (2) ระยะเวลา mysid II : มีการพัฒนาของ pleopod buds แต่ยังไม่มีการแบ่งเป็นปล้อง (ลูกศร)
- (3) ระยะเวลา mysid III : ส่วน pleopods ยาวมากขึ้น และแบ่งเป็นปล้อง (ลูกศร)
- (4) ระยะเวลา postlarva I (PL₁) : ส่วน swimming setae บน pleopods (ลูกศร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 แพลงก์ตอนที่ใช้เป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อน

แพลงก์ตอนพืชที่ใช้ในการเลี้ยงลูกกุ้งมีหลายชนิด เช่น *Skeletonema costatum* เป็นไดอะตอมที่มีผู้นิยมเลี้ยงมากชนิดหนึ่งเนื่องจากเลี้ยงง่ายและลูกกุ้งกินได้ง่าย เพราะเป็นไดอะตอมที่มีเซลล์เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ ขนาดของเซลล์ตั้งแต่ 4 ไมครอน *skeletonema* เป็นไดอะตอมทะเลที่อยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง เติบโตได้ในอุณหภูมิ 3-34 °C ช่วงความเค็ม 15-34 ส่วนในพัน แต่ความเค็มที่เหมาะสมคือ 25-29 ส่วนในพัน ความเข้มแสงเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโต

การนำ *skeletonema* มาให้กุ้งกิน ควรกรองเอาเศษผงหรือสิ่งสกปรกที่เจือปนออกก่อน ใช้ผ้ากรองแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมครอน มาทำเป็นถุงกรอง เมื่อปล่อยน้ำทิ้งแล้วให้นำ *skeletonema* ในถุงกรองผสมกับน้ำทะเลที่สะอาด แล้วจึงตักให้ลูกกุ้งกิน *skeletonema* ที่ผ่านถุงกรองนี้สามารถเก็บไว้ได้นาน 12 ชั่วโมงเท่านั้น ฉะนั้นต้องให้อากาศด้วย ข้อระวังคือ *skeletonema* ที่กรองได้มีความเข้มข้นมากดังนั้นเวลาตักให้ลูกกุ้งกินควรให้ทีละน้อย โดยตรวจดูจากสีน้ำในถังเลี้ยงลูกกุ้งหรือส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กรณีต้องการนำ *skeletonema* เลี้ยงลูกกุ้งระยะ nauplius สุดท้ายที่กำลังเข้าระยะ zoea ลูกกุ้งต้องการไดอะตอมประมาณไม่น้อยกว่า 6000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากลูกกุ้งต้องการอาหารจากไดอะตอมไปสร้างเปลือก ดังนั้นถ้าปริมาณไดอะตอมไม่พอ กุ้งจะมีลักษณะผิดปกติ เช่น กริโค้งงอ เป็นต้น ดังนั้นปริมาณไดอะตอมจึงควรอยู่ระหว่าง 80000-100000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือสีของน้ำจะมีสีน้ำตาลอ่อนๆ และควรรักษาระดับปริมาณให้อยู่ในช่วงดังกล่าวจนลูกกุ้งเข้าระยะ postlarva 15 (ลัดดา, 2540)

chaetoceros เป็นไดอะตอมที่นิยมเลี้ยงอย่างแพร่หลายเนื่องจากหาหัวเชื้อได้สะดวกและเมื่อเจริญเต็มที่แล้วยังคงอยู่ได้ระยะหนึ่งโดยที่ไม่ตายและตกตะกอนทันทีเหมือนกับสาหร่ายชนิดอื่น *chaetoceros* มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีปริมาตรเซลล์ประมาณ 30-50 ลูกบาศก์ไมครอน โดยขนาดจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อม *chaetoceros* มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงๆได้ดี โดยอุณหภูมิสูงสุดไม่ควรเกิน 37°C แต่อัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดอยู่ในช่วง 20-30 °C ความเค็มต่ำสุดคือ 6 ส่วนในพัน ความเค็มแม้จะสูงถึง 50 ส่วนในพันก็ยังคงเติบโตได้ดี ช่วงความเค็มที่เหมาะสม คือ 17-25 ส่วนในพัน การเก็บเกี่ยว *chaetoceros* เพื่อนำไปเลี้ยงลูกกุ้ง ควรกรองเอาเศษผงและสิ่งสกปรกออกเสียก่อนแล้วจึงนำน้ำส่วนที่กรองได้ไปให้ลูกกุ้งกิน (ลัดดา, 2540)

นอกจากนี้ยังมี *Chlorella* sp. และ *Tetraselmis chuii* ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนพืชที่สามารถใช้เป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อนได้

แพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหารมีชีวิตที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนขนาดที่ต่อจากการอนุบาลด้วยแพลงก์ตอนพืช rotifer เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับลูกกุ้งระยะ mysis ข้อดีของ rotifer เพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำ คือ มีขนาดเล็กโดยขึ้นกับสายพันธุ์และระยะของการเจริญ

เติบโต มีคุณค่าอาหารสูง เคลื่อนไหวช้า สามารถเลี้ยงได้ปริมาณมาก แพร่พันธุ์ได้รวดเร็ว และเป็นตัวนำที่ดีของอาหารเสริมและยา (ลัดดา, 2540)

artemia (brine shrimp) หรือไรสีน้ำตาล หรือไรน้ำเค็ม เป็นสัตว์พวก crustacean มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเป็นแพลงก์ตอนน้ำเค็มที่สามารถปรับตัวมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงความเค็มกว้างมาก คือ ระหว่าง 3-240 ส่วนในพัน artemia ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัวทำให้ตัวอ่อนนุ่ม จึงไม่มีระบบป้องกันตัวเองจากสัตว์น้ำที่เป็นศัตรู โดยเหตุที่พบ artemia ตามธรรมชาติที่ความเค็มสูง ทำให้สัตว์น้ำที่เป็นศัตรูของ artemia ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ โดย artemia มีคุณสมบัติเหมาะสมหลายประการต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ คือ เป็นอาหารธรรมชาติที่สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำได้โดยตรง และยังสามารถแปรรูปได้ดี เช่น frozen artemia spray-dried artemia artemia flake หรือใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสำเร็จรูปโปรตีนสูงสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ตัวอ่อนของ artemia ถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกสีน้ำตาลซึ่งรู้จักกันทั่วไปว่า “ไข่ artemia” (artemia cysts) สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นเวลาหลายปี เมื่อต้องการใช้ นำไปเพาะฟักในระยะเวลาสั้นๆ ก็จะได้ตัวอ่อนของ artemia สำหรับเป็นอาหารสัตว์น้ำ artemia มีขนาดเหมาะสมต่อการอนุบาลลูกสัตว์น้ำและมีคุณค่าทางอาหารสูง (ลัดดา, 2540)

2. Vibriosis ในกุ้งกุลาดำ

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ vibrio

เชื้อแบคทีเรียสกุล vibrio เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ผลทดสอบ oxidase เป็นบวก (ยกเว้น 2 ชนิด) ลักษณะเป็นรูปแท่งหรือเป็นแท่งโค้ง สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (Elliot *et al.*, 1992) ใช้เอนไซม์ catalase และ oxidase ใช้น้ำตาลได้โดยผ่านกระบวนการหมักและกระบวนการหายใจ เป็นแบคทีเรียชนิดไซโครโทรปส์ คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถเจริญได้ (สุมณฑา, 2545) เชื้อ vibrio เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar และใน selective media Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ vibrio อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ประกอบด้วย sucrose oxgall sodium cholate bromthymol blue และ thymol blue indicators มีคุณสมบัติเป็นด่าง pH เท่ากับ 8.6 ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตของ vibrio ค่า pH ที่สูง oxgall และ cholate ช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อ bacilli lactose-fermenting แกรมลบ การ fermentation ของ sucrose ใช้ในการแยกเชื้อ vibrio เช่น *V. cholerae* มีคุณสมบัติ sucrose fermentative เป็นบวก และ *V. parahaemolyticus* เป็นลบ (Delost, 1997)

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อไวรัสโอแสดงดังตารางที่ 1 เชื้อไวรัสโอหลายชนิดทำให้เกิดโรคในมนุษย์และเป็นสาเหตุของ food borne disease เชื้อไวรัสโอ (ยกเว้น *V. cholerae* และ *V. mimicus*) ต้องการ sodium chloride ในการเจริญเติบโต จึงเรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า “halophilic” (Elliot et al., 1992)

แบคทีเรียจำพวกไวรัสโอมีอย่างน้อย 28 species โดยมี 5 species ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยแบคทีเรียในกลุ่มอาศัยอยู่ในน้ำทะเลและปนเปื้อนกับอาหารทะเล ได้แก่ *V. parahaemolyticus* *V. cholera* *V. vulnificus* *V. alginolyticus* โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลเปิด การตรวจพบเชื้อชนิดนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำทะเล คือ ถ้าอุณหภูมิของน้ำทะเลต่ำกว่า 15 °C มักตรวจไม่พบเชื้อนี้ แม้ว่าแบคทีเรียจะมีชีวิตอยู่ในดินตะกอนก้นทะเลที่ไม่ลึกมากนักก็ตาม เพราะแบคทีเรียไม่ทนต่อสภาวะที่มีความกดของอากาศต่ำ ซึ่งเป็นสภาวะของก้นทะเล ณ ระดับที่มีความลึกมากในน้ำทะเล พบว่าแบคทีเรียชอบที่จะอาศัยอยู่กับสัตว์น้ำจำพวก crustacean เช่น กุ้ง กั้ง ปู มากกว่าสัตว์ทะเลชนิดอื่นๆ *V. cholera* เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรค โดยแบคทีเรียนี้อาศัยอยู่ในน้ำสกปรกและปนเปื้อนในอาหาร *V. vulnificus* อาศัยอยู่ในน้ำทะเลและอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยที่เลี้ยงในบริเวณที่มีอินทรีย์วัตถุปนเปื้อนอยู่สูง หรือใกล้น้ำทะเลที่มีน้ำเสียซึ่งไม่ผ่านการบำบัด หรือบำบัดไม่ถูกต้อง ส่วนมากแยกได้จากหอยชนิดต่างๆ มากกว่าจากกุ้ง กั้ง และปู เชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. hollisae* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล ทำลายเนื้อเยื่อและทำให้หูดักเสป พบ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและในตะกอนดินมากกว่าในน้ำทะเล นอกจากนี้ยังพบในหอย อัตราการพบขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำทะเล ถ้าน้ำทะเลอุ่นจะพบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สูง (สุมณฑา, 2545)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี*

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. Harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Colony on TCBS	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green / Yellow	Green	Green / Yellow
Growth at 42°C	+	+	-	v	v	+	+
Gram stain	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Cell morphology	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of							
- arginine	-	-	+	+	-	-	-
- lysine	+	+	d ¹ / v ²	-	+	+	+
- ornithine	d ¹ / + ²	d ¹ / + ²	-	-	+	d ¹ / + ²	v ¹ / + ²
Citrate utilization	d	d	-	-	nd	d	d
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+ ¹ / v ²	+	-	-	-	-
Growth in NaCl							
- 0%	-	+	-	-	-	-	-
- 3%	+	+	+	+	+	+	+
- 6%	+	d ¹ / - ²	d ¹ / v ²	d ¹ / + ²	+	d ¹ / + ²	+
- 8%	+	-	-	v	v	+	-
- 10%	+	-	-	-	v	-	-
Acid production from							
- salicin	d	-	-	d	nd	-	+
- lactose	-	-	-	-	V	-	+
- arabinose	-	-	-1 / +2	+	-	d1 / +2	-
- sucrose	d1 / +2	+	-	+	v	-	-
- sorbitol	-	-	-	-	nd	-	-
- mannitol	+	+	-1 / +2	+	+	+	d1 / v2
- mannose	+	+	+	+	+	+	+
- D-Cellobiose	-	-	+	+	nd	v	+
Synthesis indole	+	+	-	d	nd	+	+
Synthesis urease	-	-	+	-	v	-1 / v2	-
Synthesis gelatinas	+	+	-	+	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	V	-	+
Susceptible to							
- 10 µg/kg O/ 129	R	S	S	R	R	R	S
- 150 µg/kg O/ 129	S	S	S	S	S	S	S

ตารางที่ 1 (ต่อ) การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี*

* รวบรวมโดย เจนนุช (2546)

+ = 85-100% ที่ให้ผลบวก

d = 16-80% ที่ให้ผลบวก

- = 0-15% ที่ให้ผลบวก

v = ผลแปรผัน

● = โคโลนีของเชื้อส่วนใหญ่มีสีเขียว

1 = อ้างจาก Forbes *et al.* (1998) และ Barrow and Feltham (1993) และ Wachsmuth *et al.* (1980)

2 = อ้างจาก Elliot *et al.* (1992)

S = มีความไวรับ

R = มีความต้านทาน

nd = no data

ONPG = O-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactosidase

O/129 = Vibrio static agent : 2,4-diamino-6,7-di-isopropyl pteridine



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การก่อโรคของเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ

เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมีหลายกลุ่ม แต่มี 2 กลุ่มที่มีผลทำให้เกิดความเสียหายสูง คือ กลุ่ม filamentous bacteria และ ไวรัส โดยเชื้อไวรัสทำให้เกิดโรครุนแรงกว่า และมีอัตราการตายสูง เนื่องจาก filamentous bacteria ก่อโรคโดยไปเกาะบริเวณเปลือกนอกของกุ้ง (fouling) ทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าและลอกคราบไม่ได้ ขณะที่เชื้อไวรัสก่อโรคได้ทั้งแบบ external หรือ internal infection (Lavilla-Pigoto, 1995) เชื้อไวรัสเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดที่พบได้ในกุ้งกุลาดำ เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแตกต่างกันไป ตั้งแต่เล็กน้อยจนถึง 100% ในกุ้งที่อยู่ในสภาวะเครียด (Jiravanichpaisal et al., 1994) โดยอุณหภูมิมีผลต่ออุบัติการณ์และชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบ มีการศึกษาในกุ้งที่โตช้าพบว่าปริมาณของเชื้อแอโรโมนาสและไวรัสสูง เชื้อไวรัสที่พบว่าทำให้เกิด septicemia ในสัตว์จำพวก crustacean ได้แก่ *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* และ *V. anguillarum* (Eduardo et al., 1998) เชื้อไวรัสที่พบว่าทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในเอเชีย ได้แก่ *V. alginolyticus* *V. anguillarum* *V. cholera (non-01)* *V. damsela* *V. fluvialis* *V. harveyi* *V. neresis* *V. parahaemolyticus* *V. splendidus* *V. tubiashii* *V. vulnificus* *Vibrio spp.* (Lavilla-Pigoto, 1995) และการศึกษาของณิธาวันและคณะ (2546) ซึ่งแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งกุลาดำป่วยในเขตการเลี้ยงแถบต่างๆของประเทศไทย ได้แก่ *V. alginolyticus* *V. cholera* *V. damsela* *V. fluvialis* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* *V. vulnificus*

การศึกษาชนิดของเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำโดยเก็บตัวอย่างกุ้งป่วยมาเพาะเชื้อจาก hepatopancreas และ hemolymph พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ส่วนใหญ่ประกอบด้วย *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* *V. vulnificus* *V. damsela* *V. anguillarum* *V. fluvialis* และ *V. harveyi* (Jiravanichpaisal et al., 1995) โดยพบการติดเชื้อทั้งแบบชนิดเดียวหรือแบบ mixed infection จากเชื้อไวรัส 2 ชนิด อาการของกุ้งป่วยที่พบได้แก่ ไม่มีแรงว่ายน้ำ โดยเกาะบริเวณผิวน้ำ หรือจมลงก้นบ่อ ไม่มีการติดตัวหนีเมื่อมีสิ่งรบกวน กุ้งส่วนใหญ่มี zoothamnium สาหร่าย หรือเพรียงเกาะบริเวณเหงือกและเปลือก ทางเดินอาหารว่างเปล่า hepatopancreas มีขนาดเล็กลง ความรุนแรงของโรคในกุ้งโตพบอาการน้อยกว่าแต่มักพบว่ามี การกร่อนของขอบ uropods pleopods periopods และ telson เป็นสีน้ำตาล มักพบรอยโรคสีขาวหรือดำบริเวณเปลือก อวัยวะภายในเกิด nodule สีดำ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าการติดเชื้อแบบ mild infection ใน hepatopancreas tubule มีเชื้อแบคทีเรียและมีการหลุดของ necrotic hepatopancreatic cells ใน lumen ร่วมกับ haemolytic infiltration ใน interstitial haemal sinuses สำหรับกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงพบเชื้อแบคทีเรียปริมาณมากภายใน tubular lumen

ร่วมกับการเกิด hepatopancreatic tubular necrosis basal lamina ของ tubule ที่มีเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะหนาตัวขึ้นเนื่องจากการสร้าง collagenous fibers และพบเซลล์ที่มี nucleus ลักษณะ spindle-shaped อยู่ใน collagenous fiber และมี hemocyte มาล้อมรอบบริเวณ tubule ทำให้เกิดเป็นรอยโรคแบบ granulomatous ซึ่งบริเวณ interstitial tissue เกิด edema enlarged sinuses มีการสะสมของ eosinophilic granules และ amorphous matter มี infiltrated hemocyte ร่วมกับ semi granular และ granular cells hemocyte ซึ่งส่วนใหญ่เป็น semigranular จะมารวมตัวกันเป็นผนังล้อมรอบ tubules ที่มี bacteria เข้ามา กรณีที่เป็น old granulomatous พบว่ามี melanization และไม่พบเชื้อแบคทีเรีย interstitial tissue รอบก้อน granulomatous ขยายออกมากขึ้น มีการสร้าง granulation tissue ซึ่งประกอบด้วย collagenous fiber และการ adhering ของ cell ที่มี nucleus ลักษณะ spindle-shapes haemal sinuses และ infiltrated hemocyte นอกจากนี้ใน hepatopancreas แล้วยังพบการ infiltrated ของ hemocyte ที่เก็บกินเชื้อแบคทีเรีย ในกล้ามเนื้อหัวใจ (Jiravanichpaisal *et al.* , 1995)

ปัญหาที่พบได้บ่อยในฟาร์มเพาะฟักและอนุบาลวัยอ่อน คือ โรคติดเชื้อไวรัสเรืองแสง (luminescent vibriosis) ซึ่งทำให้เห็นลูกกุ้งเป็นสีเขียวเรืองแสง (Lavilla-Pigoto, 1995) มีสาเหตุจาก *V. harveyi* แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในทะเล มักพบเชื้อชนิดนี้บริเวณผิวนอกและจากในลำไส้ของสัตว์ทะเล รวมถึงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน โดยพบเชื้อปริมาณมากใน maternal content ซึ่งทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อระหว่างการวางไข่ อาการที่พบได้แก่ เปลือกเปราะแตกง่าย มีจุดสีน้ำตาลหรือดำบริเวณเปลือก ตัวมีสีเข้มขึ้นหรือมีสีแดง เหงือกเป็นสีชมพูหรือน้ำตาล กล้ามเนื้อสีขาวขุ่น ไม่มีอาหารในลำไส้ หางกร่อน hepatopancreas มีสีเข้ม ฝ่อและแน่น หรือบวมชืดและนิ่ม (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) แหล่งของเชื้อ *V. harveyi* ที่สำคัญในฟาร์มเพาะฟัก นอกเหนือจากน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ได้แก่ สิ่งขับถ่าย เปลือกนอกของแม่กุ้ง และน้ำที่ใช้เลี้ยง artemia โดยในลำไส้ของแม่กุ้งมีเชื้อแบคทีเรียปริมาณมากถึง 2×10^9 cells/g โดย 63-77% เป็นเชื้อไวรัส และเป็นเชื้อ *V.harveyi* ปริมาณมากที่สุด (16-18%) โรคไวรัสเรืองแสงทำให้เกิดความเสียหายต่อ hepatopancreas เช่น ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณ intertubular sinuses ทำให้เกิดความเสียหายสมดุลทาง สรีรวิทยาและทำให้ลูกกุ้งเครียด โตช้า และตายในที่สุด (Eduardo *et al.*, 1998)

V. parahaemolyticus ทำให้เกิดโรค red leg disease ในกุ้ง โดยพบว่าทำให้กุ้งมีอัตราการตายถึง >90% ลักษณะของโรค คือ พบการกระจายของ chromatophores บริเวณ periopods และ pleopods ทำให้เห็นระยางค์เป็นสีแดง พบการเกิด pigmentation บริเวณ brachial region ของ cephalothorax การศึกษาของ Sudheesh and Huai-Shu (2001) โดยการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อบริเวณปล้องลำตัวที่ 3 และ 4 เท่ากับปริมาณเชื้อ 1×10^8 1×10^6 1×10^4 และ 1×10^2 CFU ต่อตัว ภายใน 6 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อ พบว่ากุ้งมีอาการ

เคลื่อนที่ช้าลง เสียการทรงตัว ว่ายน้ำวน และไม่มีแรง hemolymph ไม่แข็งตัว ระยะเวลาที่มีสีแดงเมื่อครบ 7 วัน กุ้งในกลุ่มควบคุม (ฉีดน้ำกลั่น) ไม่ตาย ขณะที่กลุ่ม 1×10^8 CFU ตาย 100% และกลุ่ม 1×10^6 1×10^4 และ 1×10^2 CFU ตาย 80 20 และ 10% ตามลำดับ ค่า LD_{50} เท่ากับ 1×10^5 CFU

V. vulnificus ทำให้เกิดโรค black splint syndrome ในกุ้งระยะ juvenile พบรอยโรคลักษณะเป็นจุดดำ filament หรือ splints ในกล้ามเนื้อ ซึ่งรอยโรคนี้อยู่แม้จะผ่านกระบวนการปรุงอาหาร ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Lavilla-Pigoto, 1995)

การรักษาโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำให้ได้ผลดีควรเริ่มรักษาเมื่อติดเชื้อในระยะแรก ซึ่งในทางปฏิบัติสามารถตรวจสอบได้ยาก ซึ่ง Nash และคณะ (1992) ได้ให้ข้อเสนอว่าควรมีการป้องกันโรคซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดโดยควรมีการจัดการที่ดี เช่น ไม่เลี้ยงกุ้งหนาแน่นเกินไป รักษาคุณภาพน้ำให้มีปริมาณ phytoplankton ที่เหมาะสม การให้อาหารเหมาะสม ร่วมกับมีการเฝ้าระวังโรคอย่างสม่ำเสมอเพื่อให้วินิจฉัยโรคได้รวดเร็ว

2.3 การจัดการปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ

หลังจากที่ประเทศไทยประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทำให้มีการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น พบว่าฟาร์มเลี้ยงกุ้งมีปัญหาด้านการเกิดโรคติดเชื้อมากขึ้น ส่งผลให้มีการใช้ยาเพื่อป้องกันและรักษาโรคในฟาร์มกุ้งอย่างแพร่หลาย รวมทั้งการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้อง

ยาต้านจุลชีพที่มีการใช้มากในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีหลายชนิด เช่น oxytetracycline ซึ่งเป็นยาที่ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยและหลายประเทศอนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำ โดยแนะนำให้ใช้ผสมในอาหารขนาด 25-50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ให้กินติดต่อกัน 7-10 วัน oxytetracycline เป็นยาที่ให้ผลดีในการควบคุมโรคติดเชื้อไวรัสในประเทศไทย แม้ว่าผลทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีความต้านทานต่อยา (Tonguthai and Chanratchakool, 1992; ณิชารักษ์และคณะ, 2546) ยาในกลุ่ม nitrofurans ได้แก่ furazolidone furacin nitrofurazone nitrofurantoin เป็นยาที่มีการใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งวัยอ่อน โดยใช้ขนาด 1-2 ppm แต่เป็นเวลานาน พบว่ายากลุ่มนี้ได้ผลดีในการต่อต้านเชื้อไวรัสในหอยทดลองแต่พบว่าการใช้อาจไม่ได้ผลในการใช้ในบ่อดิน แต่ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้ไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ (Tonguthai and Chanratchakool, 1992) เช่นเดียวกับยา chloramphenicol ซึ่งมีการใช้ในประเทศไทยมานาน เนื่องจากยา chloramphenicol ที่ตกค้างในอาหารทำให้เกิด aplastic anemia ในมนุษย์ โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยา (Spoo and Riviere, 1995) oxolinic acid เป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ โดยอยู่ใน

รูปของ premix ขนาดยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดกุ้ง โดยให้ขนาด 2 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ต่อวันในกุ้งที่ น้ำหนักตัวน้อยกว่า 2 กรัม และให้ขนาด 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ในกุ้งที่น้ำหนักตัวมากกว่า 2 กรัม ระยะหยุดยาควรมากกว่า 25-30 วันหลังจากให้ยาครั้งสุดท้าย นอกจากนี้ยาด้านจุลชีพอื่นที่มีการ ใช้ในสัตว์น้ำ เช่น ยาในกลุ่ม sulfa-trimetroprim กลุ่ม fluoroquinolone เป็นต้น (Tonguthai and Chanratchakool, 1992)

การศึกษาความไวรับของเชื้อไวรัสโดยฉินวันและคณะ (2546) พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำป่วยมากกว่า 70% ของ isolates มีความไวรับต่อยาด้านจุลชีพ กลุ่ม fluoroquinolone และเชื้อไวรัสส่วนใหญ่ (มากกว่า 90% ของ isolates) ให้ผลไวรับต่อยา chloramphenicol เช่นกัน ในขณะที่ประมาณ 50% ของเชื้อไวรัสที่นำมาทดสอบไม่แสดงความ ไวรับต่อยา nalidixic acid

อย่างไรก็ตามการใช้ยาด้านจุลชีพในฟาร์มกุ้งทั้งเพื่อการป้องกันและการรักษาโรค ถ้าใช้ใน ขนาดต่ำหรือใช้อย่างต่อเนื่องอาจมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อยาและเกิด multiple antibiotic resistance ซึ่งการต้านทานต่อยาของเชื้อจะทำให้การใช้ยาในการรักษามนุษย์ และสัตว์มีประสิทธิภาพลดลง นอกจากนี้อาจทำให้เกิด cross – resistance กับยาชนิดอื่น การใช้ oxytetracycline หรือ oxolinic acid ทำให้เชื้อเกิดความต้านทานต่อ flumequine และ oxytetracycline การศึกษาของ Tendencia และ de la Peña (2001) ในประเทศฟิลิปปินส์ พบ การดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียในบ่อกุ้ง โดยพบว่าเชื้อไวรัส 24% ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงที่ใช้ oxolinic acid เกิด multiple antibiotic resistance กับยาด้านจุลชีพอย่างน้อย 2 ชนิด และจากการศึกษา พบว่า oxytetracycline เป็นยาที่เชื้อแบคทีเรียเกิดความต้านทานมากที่สุด (4.3%) ตามด้วย furazolidone (1.6%) oxolinic acid (1%) และ chloramphenicol (0.66%)

นอกจากยาด้านจุลชีพยังมีการใช้สารฆ่าเชื้อในกลุ่ม quaternary ammonium compounds ได้แก่ benzalkonium chloride (BKC) ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราใน ฟาร์มอนุบาลลูกกุ้ง โดยขนาดที่ใช้ 1.0-1.25 ppm ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งโต และ ขนาด 0.1 ppm เป็นเวลา 16 ชั่วโมงในลูกกุ้งระยะ protozoa II และ mysis II และใช้ขนาด 0.2 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในลูกกุ้งระยะ postlarva5 และขนาด 0.94 ppm ในลูกกุ้งระยะ postlarva 18

Sung และคณะ (2003) ศึกษาถึง Timsen™ (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride-4C-active) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม quaternary compound ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลชีพได้ และมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ จากการศึกษพบว่า Timsen™ สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำได้ โดยใช้ขนาด 0.1 และ 0.5 mg/l เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย

เชื้อแบคทีเรียจะลดลง 70% และ 97% ตามลำดับ และในน้ำเค็มเชื้อแบคทีเรียลดลง 38% และ 72% ตามลำดับ

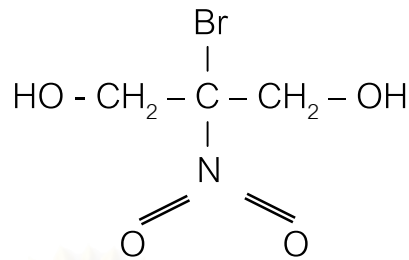
การใช้ probiotic เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยง โดยการใช้ probiotic เป็นการใช้เชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรค มีการใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพื่อทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ และมีการนำมาใช้เพื่อเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเมื่อเติมเชื้อแบคทีเรียในน้ำที่มีสัตว์อาศัยอยู่ จะทำให้ส่วนประกอบของชนิดแบคทีเรียในน้ำและตะกอนดินเปลี่ยนแปลงไป การศึกษาของ Moriarty (1998) พบว่า การใช้เชื้อ bacillus ปริมาณ 1×10^4 ถึง 1×10^5 CFU/ml ช่วยลดจำนวนเชื้อไวรัสในน้ำและในตะกอนดินได้

3. Bronopol

3.1 ลักษณะทั่วไปและการออกฤทธิ์ (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2001)

bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3 diol) เป็นสารต้านจุลชีพซึ่งใช้เป็นสารกันเสีย (preservative) ในผลิตภัณฑ์สำหรับคน เช่น แชมพู เครื่องสำอาง food – contact material และเป็นส่วนผสมในยาใช้ภายนอก และมีการนำ bronopol มาใช้เพื่อควบคุมการติดเชื้อราในไขปลาแซลมอน โดยการแช่ (bath treatment) ด้วย bronopol ขนาด 50 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ทั้งหมด 8 ครั้ง

bronopol เป็นยาที่ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้กว้างและสามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและยีสต์ กลไกการออกฤทธิ์ของ bronopol โดยละเอียดนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด เชื่อว่า bronopol มีผลทำให้เกิดการยับยั้งของ thiol – containing dehydrogenase enzymes ซึ่งเป็น membrane bound ทำให้เกิด cell leakage และ เกิด cell collapse ตามมา (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; EMEA, 2001)



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ bronopol (National Chemicals Inspectorate, 2003)

การศึกษาความคงตัวของ bronopol พบว่าที่ pH 7 และ 9 bronopol มีอัตราการ hydrolysis สูง โดยขึ้นกับความเข้มข้น เมื่ออัตราการ hydrolysis สูงขึ้นความเข้มข้นของ bronopol จะลดลง โดย bronopol ความเข้มข้น 0.01 – 0.1% มีค่าครึ่งชีวิตน้อยกว่า 1 วัน ที่ อุณหภูมิ 25 °C ในขณะที่ pH 4 bronopol จะมีความคงตัวมากกว่า แต่ก็พบว่าเกิดการ hydrolysis อย่างต่อเนื่องตามเวลาที่ผ่านไป แม้ว่าจะมีผลต่อความเข้มข้นเพียงเล็กน้อย การเสื่อมสลายของ bronopol แบ่งได้เป็น 4 ทาง โดย 3 ทางเกิดจาก 2-bromo-2-nitroethanol ซึ่งเกิดจากการสูญเสีย (reversible loss) ของ formaldehyde และทางที่ 4 เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนจาก bronopol เป็น tris (hydroxymethyl) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบไม่ผันกลับ

3.2 ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2001)

การศึกษาโดยให้หนูและสุนัขพันธุ์ beagle กิน ¹⁴C-bronopol ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ความเข้มข้นของ bronopol ในพลาสมาอยู่ในช่วง 0.5-0.61 และ 0.92-1.4 ไมโครกรัม-equivalent/ มิลลิลิตร หลังจากให้ยา 0.5-2 ชั่วโมงในหนูและสุนัขตามลำดับ ค่า bioavailability ในหนูหลังจากกินยาขนาด 10 หรือ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ครั้งเดียว เท่ากับ 75% หลังจากให้ยาหนูทดลองครั้งเดียวหรือให้ยาซ้ำ พบว่า bronopol – related residues กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย ไม่พบการสะสมและยาถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว หลังจากให้หนูกิน ¹⁴C-bronopol 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว พบว่ามากกว่า 60% ของยาที่ให้ตรวจพบได้ในปัสสาวะหลังได้รับยา 12 ชั่วโมง และพบ 1.3 ถึง 7.4% ในอุจจาระ ปริมาณยาทั้งหมดที่ขับออกทางอุจจาระใน 168 ชั่วโมงแรกหลังได้รับยาโดยประมาณเท่ากับ 10% ของปริมาณยาที่ให้ และ

พบปริมาณยาจากการหายใจเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก 4.1 และ 1.8% ใน 48 ชั่วโมงแรก ในเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ

การศึกษา metabolite ของ bronopol โดยให้หนูกิน ^{14}C -bronopol 10 หรือ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่พบ unmetabolised bronopol ในพลาสมาหรือปัสสาวะในหนูที่ได้รับยา จากการตรวจปัสสาวะ metabolite ของยาที่พบเป็นส่วนใหญ่คือ 2-nitropropane-1,3 diol ซึ่งเป็นปริมาณ 50% ของ radioactivity ส่วน metabolite ชนิดอื่นยังไม่สามารถระบุชนิดได้ การศึกษาในหลอดทดลองเมื่อเติม ^{14}C -bronopol ในตัวอย่างพลาสมาของหนู สุนัข และกระต่ายพบว่า bronopol สลายตัวภายใน 5 นาที ได้เป็น 2-nitropropane-1,3 diol การศึกษาพิเศษเพื่อหา fate of the bromine moiety โดยให้หนูกินขนาด 1 หรือ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวเพียงครั้งเดียว และนำปัสสาวะมาตรวจหา bromide ion พบว่าที่ขนาดยา 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ระดับความเข้มข้นของ bromide ion ไม่มากกว่าระดับปกติ และพบ 17% ของขนาดยา 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ถูกขับออกในรูปของ bromide ในช่วง 0-120 ชั่วโมง

bronopol เป็นยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอกของมนุษย์ การดูดซึมของยาเข้าสู่ร่างกายมีความแตกต่างกันไปแล้วแต่ความเข้มข้นของยาที่ใช้ จากการทดลองเมื่อใช้ ^{14}C -bronopol ความเข้มข้น 5% ทาผิวหนัง พบว่ายามีการขับออกทางปัสสาวะภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับยา และไม่พบยาในอุจจาระ

ยังไม่มีข้อมูลด้าน metabolism pharmacokinetic หรือ residues depletion ของ bronopol ในชนิดสัตว์เป้าหมาย แต่จากการศึกษาโดยให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมกินพบว่า bronopol จะถูก metabolized อย่างรวดเร็วและถูกขับออกจากร่างกาย ไม่พบ unmetabolised bronopol ในพลาสมาหรือปัสสาวะในทุกจุดเวลา นอกจากนี้ bronopol ยังถูก hydrolysed ได้อย่างรวดเร็วในตัวทำละลายที่เป็นของเหลว ดังนั้นในการใช้ในไขปลาแซลมอน ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนถึงระยะที่ส่งขายเป็นเวลาถึง 12 เดือนหลังจากฟัก จึงสรุปได้ว่าสารตกค้างจาก bronopol สลายไปหมดแล้ว

3.3 ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษ (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2001)

bronopol จัดเป็นสารที่มีพิษเฉียบพลันระดับปานกลาง โดยค่า LD_{50} แบบเฉียบพลันเมื่อให้ยาโดยการกินเท่ากับ 180-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวในหนู rat และ 250-500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในหนู mice อาการที่พบภายใน 30 นาทีหลังจากที่หนู rat ได้รับยา ได้แก่ ซึม น้ำลายไหล หายใจเสียงดัง หอบและอ้าปากหายใจ หายใจลำบาก มีของเหลวไหลออกทางจมูก

ผิวหนังเป็นสีม่วง (cyanosis) และกล้ามเนื้อทำงานไม่ประสานกัน การตรวจทางพยาธิวิทยาในหนูที่ตายพบ การระคายเคืองของทางเดินอาหาร ม้ามมีขนาดเล็ก ต่อมหมวกไตขยายใหญ่และมีสีเข้ม ค่า LD₅₀ เมื่อให้หนูได้รับยาทางผิวหนัง มากกว่า 1600 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และค่า LC₅₀ เมื่อหนูได้รับยาโดยการสูดดมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 5 มิลลิกรัม/ลิตรอากาศ

หนูพันธุ์ Charles River CD เพศละ 20 ตัว ต่อกลุ่ม ได้รับยา bronopol โดยการสอดท่อเข้ากระเพาะอาหารวันละ 1 ครั้ง ขนาด 0 (น้ำกลั่น) 20 80 หรือ 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 13 สัปดาห์ หนูทุกตัวที่ได้รับยาขนาด 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตายหรือถูกทำให้ตาย ภายในวันที่ 9 ของการศึกษา หนูเพศผู้ 7 ตัวและเพศเมีย 9 ตัวของกลุ่มที่ได้รับยา 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวตาย ความเป็นพิษของยาเห็นได้ชัดเจนในหนูกลุ่มที่ได้รับยา 80 และ 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และในหนู 1 ตัวที่ได้รับยา 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยมีอาการหายใจลำบากและช่องท้องขยายใหญ่ น้ำหนักตัวและการกินอาหารลดลงในกลุ่ม 80 และ 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในหนูที่เสียชีวิต ได้แก่ ทางเดินอาหารขยายใหญ่เนื่องจากแก๊สหรือของเหลว ปอดขยายใหญ่ และต่อมไทรอยด์มีขนาดเล็ก การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในหนูที่ได้รับยาขนาด 20 และ 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว อย่างละ 2 ตัว พบท่อไตมีขนาดขยายใหญ่ ภายในพบ eosinophilic material

สุนัขพันธุ์ beagle เพศละ 2 ตัว ต่อกลุ่ม ได้รับยา bronopol โดยการสอดท่อเข้ากระเพาะอาหาร วันละครั้ง ขนาด 0 (น้ำกลั่น) 4 8 หรือ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 13 สัปดาห์ ใน 6 สัปดาห์แรก สุนัขที่ได้รับยาขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีอาการอาเจียนหลังจากได้รับยา 30 นาที หลังจากนั้นจึงปรับให้อาหารสุนัขก่อนให้ยา 2 ชั่วโมง และพบว่า มีสุนัขเพียง 1 ตัวที่มีอาการอาเจียน หลังจาก 12 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับยาขนาด 8 และ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับยาขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักของม้ามและตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ค่า NOEL (no observed effect level) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของยาที่ไม่พบความผิดปกติที่สังเกตได้ จากการศึกษานี้คิดจากการลดลงของเม็ดเลือดขาว เท่ากับ 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน

การศึกษา pre-GLP ใน 1 รุ่น (single-generation) ในหนูพันธุ์ Charles River CD rat เพศผู้ 11 ตัว และเพศเมีย 28 ตัว โดยให้กิน bronopol ละลายในน้ำกลั่น ขนาด 20 หรือ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน โดยเพศผู้ได้รับยาเป็นเวลา 63 วัน และเพศเมีย 14 วันก่อนผสมพันธุ์ และให้หนูเพศผู้อีก 11 ตัว และเพศเมียอีก 22 ตัว เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับยา เมื่อแม่หนูตั้งท้องได้ 13 วัน ผ่าซากหนูกลุ่มละ 10 ตัว และเลี้ยงหนูที่เหลือต่อจนออกลูกเองตามธรรมชาติและให้

เลี้ยงลูกจนหย่านม พบว่ายาไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์หรือการผสมพันธุ์ อัตราการตั้งท้อง ระยะเวลาการตั้งท้อง corpora lutea จำนวนตัวอ่อนฝังตัวและไม่ผลต่อตัวอ่อน

การศึกษา GLP – compliant โดยให้หนูเพศเมียพันธุ์ Sprague-Dawley ซึ่งผสมพันธุ์แล้ว จำนวน 24 ตัว กินยา bronopol ขนาด 0 10 28 หรือ 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในช่วง วันที่ 6-15 ของการตั้งท้อง โดยใช้ น้ำบริสุทธิ์ที่ทำให้เป็นกรด pH 4 ด้วย 1.0M hydrochloric acid เป็นตัวทำละลายยา พบว่ายาไม่มีพิษต่อแม่ (น้ำหนักตัวลดลงในวันที่ 6-7 ของการตั้งท้อง) ที่ขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ไม่พบว่ายามีผลต่อจำนวนตัวอ่อน เพศของตัวอ่อน หรือน้ำหนักตัวอ่อน ไม่พบการผิดปกติของตัวอ่อนในทุกกลุ่มที่ได้รับยา กลุ่มที่ได้รับยา 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวพบการสร้างกระดูก (ossification) ไม่สมบูรณ์บริเวณ sacral neural arcs เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามอาจเป็นความบังเอิญที่ไม่เกี่ยวข้องกับยา ค่า NOEL ของการศึกษานี้เท่ากับ 28 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว สำหรับความเป็นพิษในแม่ และ > 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว สำหรับการเกิดการผิดปกติของลูกและความเป็นพิษต่อตัวอ่อน

การศึกษา GLP – compliant ให้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพศเมียที่ผสมพันธุ์ แล้วกลุ่มละ 18-20 ตัว ได้รับ bronopol ขนาด 0 5 20 40 หรือ 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ต่อวัน ในช่วงวันที่ 7-19 ของการตั้งท้อง โดยใช้ น้ำที่ปรับให้ pH เท่ากับ 4 เป็นตัวทำละลาย ที่ขนาด ยา 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวพบความเป็นพิษต่อแม่กระต่าย โดยมีอาการกินอาหารลดลง น้ำหนักตัวลดลงในวันที่ 11 และพบว่าปริมาณอุจจาระและขนาดอุจจาระเล็กลง มีผลต่อตัวอ่อน คือ น้ำหนักของตัวอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ลูกตัวเล็กกว่าปกติ พบการผิดปกติของตัวอ่อนสูงกว่า กลุ่มควบคุมแต่ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ พบการสร้างกระดูกผิดปกติในส่วน pubic bones และกระดูกส่วนกะโหลก สันหลัง ออกและขา ค่า NOEL จากการศึกษาพิษต่อแม่และตัวอ่อน เท่ากับ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน

การศึกษาผลของ bronopol ในลูกหนูก่อนและหลังคลอด โดยการให้ยาขนาด 0 (น้ำกลั่น) ในแม่หนูที่ได้รับการผสมแล้ว กลุ่มละ 20 ตัว ทางการสอดท่อเข้ากระเพาะอาหาร ให้ยาดังแต่วันที่ 15 ของการตั้งท้อง จนถึง 21 วันหลังคลอด พบว่าแม่หนูกลุ่มที่ได้รับยา 20 และ 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวันเสียชีวิตกลุ่มละ 1 ตัว เมื่อผ่าซากพบเลือดออกในทางเดินอาหาร ซึ่งคาดว่าเกิดจากวิธีการให้ยา วันที่ 4 หลังออกลูกอัตราการตายของลูกหนูกลุ่มที่ได้รับยาสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และน้ำหนักลูกหนูน้อยกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีนัยสำคัญ

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแบบ *in vitro* assay ใน *Salmonella typhimurium* G46 TA1535 TA1536 TA1537 TA1538 TA98 และ TA100 ใน *E.coli* WP2 UvrA CM561 และ CM611 ใน Chinese Hamster v79 cells ได้ผลลบ การศึกษา host-mediated assay โดยให้หนู เพศเมียกินยารวันละครั้ง ขนาด 0 12.5 25 หรือ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อวันเป็นเวลา

6 วัน ให้ยาครั้งสุดท้ายร่วมกับ *Salmonella typhimurium* TA1530 ให้ผลลบ การศึกษา *in vitro* cytogenetics ใน lymphocyte มนุษย์ พบเซลล์ที่มีความผิดปกติเมื่อได้รับยาขนาดสูงสุด คือ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่พบ metabolic activation เนื่องจาก bronopol สลายตัวไปเป็น clastogen formaldehyde เมื่ออยู่ในสภาวะ culture ดังนั้นผลการศึกษา *in vitro* cytogenetics assay อาจเกิดเนื่องจาก formaldehyde การศึกษา *in vivo* micronucleus ในหนูที่ให้กินยาขนาด 80 หรือ 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และเก็บไขกระดูกมาตรวจทุก 24 48 หรือ 72 ชั่วโมงได้ผลลบ การศึกษา dominant lethal assay ในหนูเพศผู้โดยให้กินยาขนาด 20 หรือ 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลา 6 วัน หรือฉีด bronopol เข้าช่องท้องขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวครั้งเดียวก่อนการผสมพันธุ์กับหนูเพศเมียที่ไม่ได้รับยา ได้ผลเป็นลบ จากการศึกษารูปได้ว่า bronopol ไม่มีความเป็นพิษต่อยีน

การศึกษาก่อนมะเร็งของ bronopol โดยให้หนู Carworth CFLP เพศละ 52 ตัวต่อกลุ่ม ได้รับ bronopol ความเข้มข้น 0 0.2% หรือ 0.5% (ใน 90% acetone/น้ำ) โดยการทาบริเวณผิวหนังซึ่งโกนขนแล้ว โดยใช้ปริมาณที่ทา 0.3 มิลลิลิตร 3 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 80 สัปดาห์ ซึ่งเท่ากับขนาดยา 0 4.9/6.5 และ 12.7/16.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในหนูเพศผู้/เพศเมีย ตามลำดับ ในช่วง 3 สัปดาห์แรกพบอาการขนร่วงรอบๆบริเวณที่ทา bronopol น้ำหนักตัวในหนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาดสูงสุดคือ 0.5% ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณการกินอาหารไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม การศึกษานี้เริ่มในช่วงต้นปี 1970 และนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้น 10 ปี นำเนื้อเยื่อที่เหลือมาตรวจ พบการเกิด papillomas ในหนูเพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 3 ตัวที่ได้รับยา 0.5% แต่ไม่พบในกลุ่มอื่น ในหนูเพศเมียอุบัติการณ์การเกิด papillomas มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.033$) พบอุบัติการณ์การเกิด nodular hyperplasia ของตับ ในหนูเพศผู้ที่ได้รับยา 0.5% แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การเกิด papillomas ในหนูที่ได้รับยา 0.5% (เท่ากับ 12.7/16.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ในหนูเพศผู้/เพศเมีย) เป็นผลจากการระคายเคืองของ bronopol ต่อเนื้อเยื่อซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับผลต่อยีน

การศึกษาพิษเรื้อรังและการศึกษาก่อนมะเร็ง ในหนูพันธุ์ Sprague-Dawley เพศละ 45 ตัวต่อกลุ่ม กินยาซึ่งผสมในน้ำที่รับความเข้มข้นให้หนูได้รับยาขนาด 0 10 40 หรือ 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลา 104 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเลือดจากหนูเพศละ 15 ตัวต่อกลุ่ม อัตราการตายของหนูในกลุ่มที่ได้รับยา 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เท่ากับ 20% ในเพศผู้และ 38% ในเพศเมีย พบอาการน้ำหนักตัวลดลงและการกินอาหารลดลงในหนูกลุ่ม 40 และ 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ปริมาณของยามีผลต่อการกินน้ำลดลง แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของปริมาณยาต่อค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีของเลือด การวิเคราะห์ปัสสาวะในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าหนูที่ได้รับยา 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

น้ำหนักตัวขั้วถ่ายปัสสาวะในปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุม การศึกษาเริ่มในปี 1970 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อตรวจ ณ เวลานั้น และหลังจาก 10 ปี เนื้อเยื่อที่เหลือนำมาตรวจพบ papilloma บริเวณกระเพาะอาหารส่วนต้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับยาแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และพบรอยโรคที่ไม่ใช่เนื้องอก ได้แก่ การเกิดแผลหลุมและ hyperkeratosis ของกระเพาะอาหารส่วนต้น ในหนูที่ได้รับยา 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งเกิดจากการระคายเคืองของยา พบการเกิด glandular dilatation ของกระเพาะอาหารส่วนที่หลังน้อยกว่าในหนูที่ได้รับยา 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบการเกิด hyperkeratosis และ/หรือแผลหลุมของเยื่อบุหลอดอาหาร พบรอยโรคของต่อมน้ำลาย (squamous metaplasia, fibrosis, ductal dilatation/cysts) การเกิด glandular dilatation ของหลอดลม และแผลหลุมที่ลิ้น ในกลุ่ม 40 และ 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จากการศึกษาความคงตัวของยาคาดว่าขนาดยาแท้จริงที่หนูได้รับในการศึกษานี้เท่ากับ 7 32 และ 142 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในหนูที่ได้รับยา 10 40 และ 160 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

การศึกษากการเกิด sensitisation ในหนูตะเภา โดยใช้วิธี Magnussen & Kligman test พบว่า bronopol มีผลให้เกิด sensitisation ต่ำ โดยการศึกษาให้ผลลบเมื่อทดสอบร่วมกับ formalin และเมื่อทดสอบกับอาสาสมัครพบว่า การศึกษาในอาสาสมัคร 120 คน ไม่พบการเกิด sensitisation และในอีกการศึกษาพบว่าอาสาสมัคร 127 คน มี 7 รายเกิดอาการแพ้ที่ผิวหนัง

การศึกษาค่า MIC ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 6 strains (3 generas) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 15 strains (7 generas) ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียปกติในทางเดินอาหารมนุษย์ ค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียปกติในลำไส้ไม่มีความไวรับต่อยา bronopol

การศึกษาคความทนทานต่อยาในชนิดสัตว์เป้าหมาย (target species) คือ ไข่ปลา rainbow trout พบว่าอัตราการตายมีความแตกต่างกันระหว่างแหล่งของไข่ปลา และระหว่างชุดของไข่ปลาเมื่อมาจากแหล่งเดียวกัน อย่างไรก็ตามจากอัตราการตายทั้งหมดเมื่อดูจากการฟักเป็นตัว กลุ่มที่ได้รับ bronopol มีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ malachite green และกลุ่มที่ไม่ได้รับยา

คณะกรรมการได้สรุปไว้ใน Annex II of Council Regulation (EEC) No. 2377/90 ว่า

- bronopol ถูก metabolized และขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม
- สามารถใช้ bronopol ในไข่ปลาแชลมอนที่ผสมแล้ว
- การใช้ bronopol ในไข่ปลาแชลมอน ไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในปลาที่โตเต็มที่

คณะกรรมการพิจารณาเห็นว่าไม่มีความจำเป็นต้องตั้งค่า MRL ของ bronopol

3.4 การใช้ bronopol ในการรักษาโรคในสัตว์น้ำ

การใช้ bronopol เพื่อรักษาโรคปลาที่เป็นอาหาร ได้รับการรับรองทางกฎหมายในยุโรปเป็นครั้งแรกในปี 2001 เพื่อทดแทนการใช้ malachite green ซึ่งมีอันตรายต่อผู้บริโภค (Department for Environment, Food and Rural Affairs, 2002)

การศึกษาประสิทธิภาพผลของ bronopol ในการรักษาเชื้อรา Saprolegnia ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ของ Branson (2002) โดยให้ปลากลุ่มละ 20 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมอย่างละ 2 กลุ่ม กลุ่มทดลองให้แค่ bronopol ขนาด 20 มิลลิกรัม/ลิตร 30 นาที เป็นระยะเวลา 15 วันติดต่อกัน และกลุ่มควบคุมให้ placebo ผลการทดลองพบว่าปลา rainbow trout ในกลุ่มทดลองซึ่งมีการติดเชื้อราเมื่อเริ่มต้นการทดลองคิดเป็น 70 และ 40% มีการติดเชื้อราลดลงเป็น 0% ในขณะที่ปลากลุ่มควบคุมมีการติดเชื้อราเพิ่มขึ้นจาก 45% เป็น 74% และจาก 35% เป็น 55% นอกจากนี้พบว่าความรุนแรงของการติดเชื้อราในปลากลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้น

Roth และคณะ (2002) ศึกษาการใช้ bronopol ขนาด 50 มิลลิกรัม/ลิตร แช่เป็นเวลา 30 นาทีต่อวันทุกวัน ในไข่ปลา rainbow trout และปลา atlantic salmon จำนวน 1.4 ล้านฟอง และการใช้ bronopol ขนาด 20 มิลลิกรัม/ลิตร 30 นาทีต่อวัน เป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน ในปลา rainbow trout brown trout และ atlantic salmon จำนวน 26000 ตัว พบว่าการใช้ bronopol สามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อราในไข่ปลาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และสามารถลดการติดเชื้อราในไข่ปลาได้ 95% การศึกษาในปลาพบว่า bronopol สามารถใช้ในการรักษาเชื้อราและป้องกันการติดเชื้อราได้ โดยจากการทดลองปลากลุ่มที่ได้รับยามีจำนวนปลาที่ติดเชื้อราลดลงมากกว่าปลากลุ่มควบคุม 73% ($p < 0.001$) และมีอัตราการตายลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุม 65% ($p < 0.001$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งเชื้อไวรัส

1.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัส โดยวิธี antimicrobial agar dilution susceptibility tests (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

1.1.1 การเตรียมตัวอย่างยาที่ใช้ในการทดสอบ

Bronopol (Pyceze[®]; Novartis)

ละลาย Pyceze[®] (Bronopol 50% W/V) ปริมาตร 2.56 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ 10 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของ bronopol เท่ากับ 128,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten – fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 1,280 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางครั้งละ 2 เท่า (two – fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้นของยา 640 320 160 80 40 20 10 5 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยใส่ยาแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton 18 มิลลิลิตร และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 128 64 32 16 8 4 2 1 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 2)

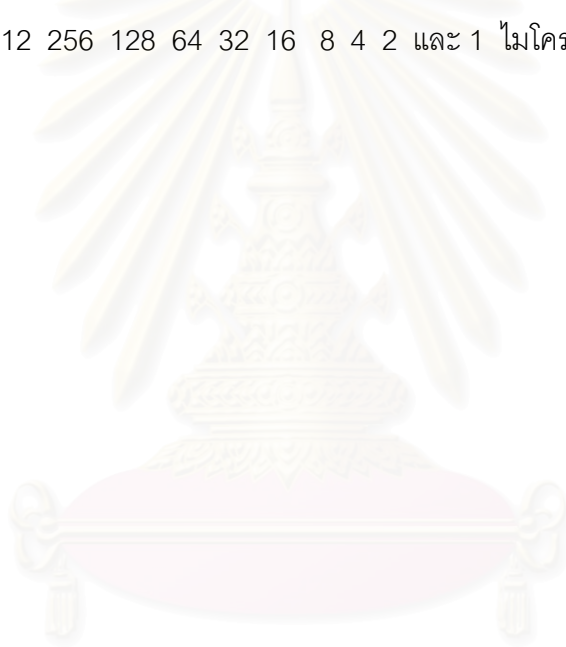
Oxytetracycline (Sigma Lot. 112H0123)

ละลายยา oxytetracycline dihydrate 51.2 มิลลิกรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1N (NCCLS, 1999) เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของยา 5120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางครั้งละ 2 เท่า (two – fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้นของยา 5120 2560 1280 640 320 160 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยผสมยาแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 2 มิลลิลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton 18 มิลลิลิตร และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นของยาใน

อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 512 256 128 64 32 16 8 4 2 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

Enrofloxacin (ICN Biomedical Inc. Lot. 7072C)

ละลายยา enrofloxacin 51.2 มิลลิกรัม ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1N (NCCLS, 1999) เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นของยา 5120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางครั้งละ 2 เท่า (two – fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้นของยา 5120 2560 1280 640 320 160 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมยาที่ความเข้มข้นต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 โดยผสมยาแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 2 มิลลิลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton 18 มิลลิลิตร และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 512 256 128 64 32 16 8 4 2 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 4)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายยา bronopol

ขั้นตอนที่	ความเข้มข้นของ bronopol ($\mu\text{g/ml}$)	นำมาจากขั้นตอน ที่	อัตราส่วน ปริมาณยา (ml)	อัตราส่วน ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของยาก่อนผสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ เจือจาง 1:10 เท่าใน MHA
1	1280	-	-	-	1280	128
2	1280	1	1	1	640	64
3	1280	1	1	3	320	32
4	1280	1	1	7	160	16
5	160	4	1	1	80	8
6	160	4	1	3	40	4
7	160	4	1	7	20	2
8	20	7	1	1	10	1
9	20	7	1	3	5	0.5
10	20	7	1	7	2.5	0.25

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายยา oxytetracycline

ขั้นตอนที่	ความเข้มข้นของ oxytetracycline ($\mu\text{g/ml}$)	นำมาจาก ขั้นตอนที่	อัตราส่วน ปริมาตรยา (ml)	อัตราส่วน ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของยาก่อนผสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ เจือจาง 1:10 เท่าใน MHA
1	5120	-	-	-	5120	512
2	5120	1	1	1	2560	256
3	5120	1	1	3	1280	128
4	5120	1	1	7	640	64
5	640	4	1	1	320	32
6	640	4	1	3	160	16
7	640	4	1	7	80	8
8	80	7	1	1	40	4
9	80	7	1	3	20	2
10	80	7	1	7	10	1

ตารางที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายยา enrofloxacin

ขั้นตอนที่	ความเข้มข้นของ enrofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)	นำมาจาก ขั้นตอนที่	อัตราส่วน ปริมาตรยา (ml)	อัตราส่วน ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของยาก่อนผสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA	ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ เจือจาง 1:10 เท่าใน MHA
1	5120	-	-	-	5120	512
2	5120	1	1	1	2560	256
3	5120	1	1	3	1280	128
4	5120	1	1	7	640	64
5	640	4	1	1	320	32
6	640	4	1	3	160	16
7	640	4	1	7	80	8
8	80	7	1	1	40	4
9	80	7	1	3	20	2
10	80	7	1	7	10	1

1.1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ เชื้อไวรัสโอที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำป่วย รวม 109 เชื้อ ประกอบด้วย เชื้อ *V.alginolyticus* *V. cholerae* *V.damsela* *V. fluvialis* *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานสำหรับควบคุมคุณภาพการทดลอง ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802

เพาะเชื้อไวรัสโอลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ bacto tryptic soy agar (TSA) ซึ่งเพิ่มเกล็ดไอโซเดียมคลอไรด์เป็น 1 % และเพาะเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ bacto tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือฆ่าเชื้อ 0.9% ให้ได้ความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร) เจือจางอีก 10 เท่าให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร

ดูดน้ำเกลือที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU/มิลลิลิตร มา 1 มิลลิลิตรลงในหลอดของชุด multipoint inoculator ซึ่งสามารถทดสอบได้ครั้งละ 25 เชื้อ โดยใช้เป็นเชื้อทดสอบ 22 เชื้อ และเชื้อมาตรฐาน 3 เชื้อ นำ multipoint inoculator จุ่มในเชื้อที่เตรียมไว้ แต่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton ที่มียาปริมาณต่างๆ ได้เชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^4 CFU/spot บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 – 20 ชั่วโมง อ่านผล

1.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ในน้ำทะเล

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโอ เช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton ซึ่งเตรียมโดยการละลายกับน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในการทดสอบ

1.3 การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ซึ่งผสม NaCl 1% ปริมาณ 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง centrifuge เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก โดยใช้ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย sterile normal saline 2 ครั้ง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้เจือจางใน sterile normal saline ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

1. เตรียมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในโหลทดลอง รวมทั้งหมด 4 โหล ปริมาตรน้ำทะเลโหลละ 4 ลิตร เติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมได้ลงในโหลทดลอง โหลละ 5 มิลลิลิตร
2. ทำ Total bacteria count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 1% NaCl เพื่อหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น
3. ปรับความเข้มข้นของยาในขวดโหลทดลองให้ได้ bronopol 8 และ 16 µg/ml oxytetracycline (ละลายด้วย 0.1N HCl) 64 µg/ml และ enrofloxacin (ละลายด้วย 0.1N NaOH) 16 µg/ml
4. ทำ total bacteria count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 1% NaCl เป็นระยะจนครบ 24 ชั่วโมง

1.4 การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง (in vivo)

ฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Lab no.282) ใน normal saline ปริมาตร 0.05 ml เข้าบริเวณ ventral sinus ของกุ้งแชบ๊วย ได้ปริมาณของเชื้อประมาณ 19.5×10^6 CFU หลังจาก 10 ชั่วโมง เจาะ hemolymph มาเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นำไปแยกชนิดของเชื้อด้วยชุดตรวจ API เพาะเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากกุ้งแชบ๊วยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 1% NaCl ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง centrifuge เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก โดยใช้ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วย sterile normal saline 2 ครั้ง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้เจือจางใน sterile normal saline

เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะ PL15 ในโหลทดลอง จำนวน 8 โหล ใช้น้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 4 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทรายและคลุมโหลทดลองด้วยถุงดำ นับลูกกุ้งใส่โหลทดลอง โหลละ 50 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น

กลุ่มควบคุม เลี้ยงกุ้งระยะ PL15 ในน้ำทะเลปกติ

กลุ่มทดลองที่ 1 ใส่ bronopol 8 µg/ml

กลุ่มทดลองที่ 2 ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นประมาณ 5.12×10^7 CFU/ml

กลุ่มทดลองที่ 3 ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้นประมาณ 5.12×10^7 CFU/ml และหลังจากนั้น 1 ชั่วโมง ใส่ bronopol 8 µg/ml

เก็บตัวอย่างน้ำทะเลจากการทดลองเพื่อหาปริมาณ total bacteria count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 1% NaCl เมื่อครบ 2 6 10 16 20 และ 24 ชั่วโมง นับจำนวนลูกกุ้งตายและเอาออกจากโหลทดลองทุก 3 5 8 12 16 20 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างลูกกุ้งกลุ่มการทดลองละ 10 ตัวมาหาปริมาณ total vibrio count

การหาปริมาณ total vibrio count จากลูกกุ้งกุลาดำ

สุ่มลูกกุ้งจากโหลทดลอง โหลละ 5 ตัว ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ โดยการปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge ความเร็ว 1000 รอบ/นาที ประมาณ 3-4 วินาที บดลูกกุ้งทั้ง 5 ตัวกับ normal saline 1 ml ด้วย tissue grinder และเจือจางด้วย normal saline ให้ได้ปริมาตร 5 ml หาปริมาณ total vibrio count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

2. การศึกษาความเป็นพิษของ bronopol

2.1 การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol โดยหาค่าความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนตายครึ่งหนึ่ง ในเวลา 24 ชั่วโมง (lethal concentration 50; LC₅₀)

การศึกษาในกุ้งกุลาดำระยะ protozoa

เลี้ยงลูกกุ้งระยะ protozoa ในโหลทดลองซึ่งมีน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทราย และคลุมโหลทดลองด้วยถุงดำเพื่อป้องกันแสง ให้ chetoceros และอาหารเสริมสำเร็จรูป (flake) 5 ครั้ง ใน 24 ชั่วโมง

1. เตรียมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในขวดโหลทดลองให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร
2. จากการศึกษเบื้องต้นพบว่าความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้ลูกกุ้งระยะ protozoa มีอัตราการตาย 0% และ 100% อยู่ในช่วง < 5 และ 8 µg/ml จึงปรับความเข้มข้นของ bronopol ในโหลทดลองให้ได้เท่ากับ 0 2 4 6 และ 8 µg/ml ความเข้มข้นละ 2 โหลการทดลอง

3. นับจำนวน protozoa ใส่ในโหลทดลอง โหลละ 100 ตัว
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นับจำนวนลูกกุ้งที่รอดชีวิต เพื่อหาอัตราการตายและนำมาวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม Probit analysis

การศึกษาในกึ่งกุลาดำระยะ postlarva

เลี้ยงกึ่งกุลาดำระยะ PL6/PL18 ในโหลทดลองซึ่งมีน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทรายและคลุมโหลทดลองด้วยถุงดำเพื่อป้องกันแสง

1. เตรียมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในขวดโหลทดลองให้ได้ปริมาตร 4 ลิตร
2. ปรับความเข้มข้นของ bronopol ในขวดโหลทดลองให้ได้เท่ากับ 0 2 4 8 16 32 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ ในลูกกุ้งระยะ PL6 และ 0 5 15 30 40 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ในลูกกุ้งระยะ PL 18
3. นับจำนวน postlarva ใส่ในโหลทดลอง โหลละ 50 ตัว
4. นับจำนวนลูกกุ้งตายเป็นระยะ จนครบ 24 ชั่วโมง โดยลูกกุ้งที่ตายดูจากการไม่เคลื่อนไหวเมื่อใช้แท่งแก้วเขี่ย และนอนจมอยู่ก้นโหลทดลอง
5. วิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม Probit analysis

2.2 การศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนระยะของกึ่งกุลาดำวัยอ่อน

เลี้ยงลูกกุ้งระยะ protozoa และ mysis ในโหลทดลองซึ่งมีน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทราย และคลุมโหลทดลองด้วยถุงดำ ให้ chaetoceros และอาหารเสริมสำเร็จรูป (flake) 5 ครั้ง ใน 24 ชั่วโมง

1. เตรียมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในขวดโหลทดลองให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร
2. ปรับความเข้มข้นของ bronopol ในขวดโหลทดลองให้ได้เท่ากับ 0 2 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ ความเข้มข้นละ 2 โหลการทดลอง ในลูกกุ้งระยะ protozoa และ 0 2 3 4 5 และ 6 $\mu\text{g/ml}$ ความเข้มข้นละ 2 โหลการทดลอง ในลูกกุ้งระยะ mysis
3. นำลูกกุ้งมาดูระยะ (substage) ก่อนเริ่มการทดลอง นับจำนวน protozoa และ mysis ใส่ในโหลทดลอง โหลละ 100 ตัว
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง สุ่มลูกกุ้งที่รอดชีวิตมาดูระยะด้วยกล้องจุลทรรศน์ โหลละ 10 ตัว

2.3 การศึกษาผลของ bronopol ต่อจุลพยาธิสภาพของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะ postlarva 15 ในโหลทดลอง ใช้น้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 4 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทรายและคลุมโหลทดลองด้วยถุงดำ นับลูกกุ้งใส่โหลทดลอง โหลละ 50 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองซึ่งใส่ bronopol ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ เลี้ยงลูกกุ้งในโหลทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างลูกกุ้งกลุ่มละ 10 ตัว รักษาสภาพในน้ำยา Davidson's fixative ส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

2.4 การศึกษาผลของ bronopol ต่ออาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

2.4.1 การศึกษาใน chaetoceros (*Chaetoceros calcitrans*)

1. นำ chaetoceros จากบ่อเพาะ ใส่ในโหลทดลอง โหลละ 2 ลิตร และเติมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 2 ลิตร ได้ปริมาตรรวม 6 ลิตร จำนวน 6 โหล ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทราย
2. นับจำนวน chaetoceros เริ่มต้น ด้วย hemocytometer โดยนับโหลละ 2 ครั้ง
3. ปรับความเข้มข้นของ bronopol ในโหลทดลอง ให้ได้ 0 8 และ 16 $\mu\text{g/ml}$ อย่างละ 2 โหล
4. นับจำนวน chaetoceros เป็นระยะ จนครบ 24 ชั่วโมง

วิธีการนับ chaetoceros ด้วย hemocytometer และการคำนวณ

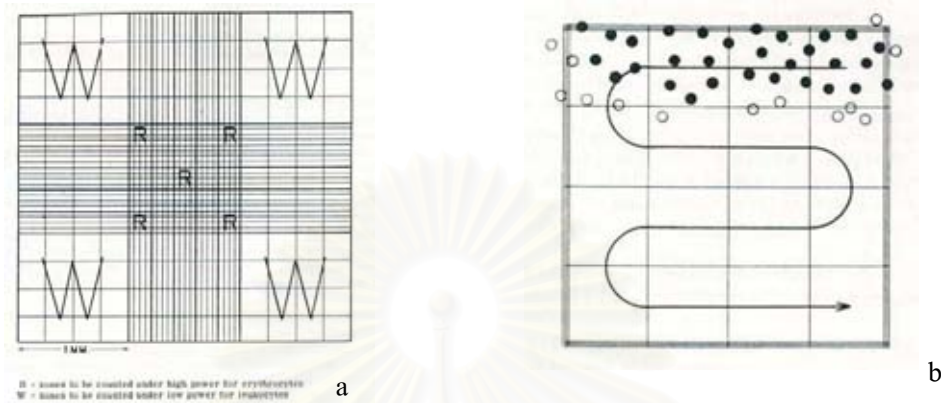
นับจำนวน chaetoceros โดยนับในช่องสำหรับการนับเม็ดเลือดขาว (W) (รูปที่ 5 ; a) โดยกล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า นับ chaetoceros ตามแนว (รูปที่ 5 ; b) เพื่อป้องกันการนับซ้ำในกรณีที่เซลล์ของ chaetoceros ทับเส้นพอดี เช่น นับเฉพาะเซลล์ที่อยู่บนเส้นด้านบนและด้านซ้ายของช่องสี่เหลี่ยมเท่านั้น หรือเส้นด้านล่างและด้านขวาของสี่เหลี่ยมเท่านั้น โดยใช้สูตรในการคำนวณ คือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน chaetoceros (cells / ml) = จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 4 ช่อง (W) ⁽¹⁾ x 1/4 x 10³ ⁽²⁾

(1) ดังรูปที่ 5 ; a

(2) เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างที่นำมานับเท่ากับ 1 μ l



รูปที่ 5 แสดงการนับจำนวน chaetoceros ด้วย Neubauer hemocytometer

2.4.2 การศึกษาใน rotifer (*Brachionus plicatilis*)

1. เลี้ยง rotifer ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในโหลทดลอง โหลละ 4 ลิตร จำนวน 6 โหลการทดลอง ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทราย
2. นับจำนวน rotifer เมื่อเริ่มต้นการทดลอง
3. ปรับความเข้มข้นของ bronopol ในโหลทดลอง ให้ได้ความเข้มข้น 0 8 และ 16 μ g/ml
4. นับจำนวน rotifer เป็นระยะจนครบ 24 ชั่วโมง

การนับจำนวน rotifer

ใช้ pipet ดูดตัวอย่างน้ำทะเลจากโหลทดลอง โหลละ 100 μ l หยดลงบน slide แก้ว ได้ประมาณ 10 หยด นับจำนวน rotifer ที่มีชีวิต (มีการเคลื่อนไหว) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่าได้เป็นความหนาแน่นของ rotifer ในน้ำทะเล 100 μ l นับครั้งละ 4 ซ้ำ

2.4.3 การศึกษาใน artemia (*Artemia salina*)

1. เลี้ยง artemia ในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ในโหลทดลอง โหลละ 4 ลิตร จำนวน 6 โหลการทดลอง ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทราย
2. นับจำนวน artemia เมื่อเริ่มต้นการทดลอง
3. ปรับความเข้มข้นของ bronopol ในโหลทดลอง ให้ได้ความเข้มข้น 0 8 และ 16 $\mu\text{g/ml}$
4. นับจำนวน artemia เป็นระยะจนครบ 24 ชั่วโมง

การนับจำนวน artemia

ใช้ pipet ดูตัวอย่างน้ำทะเลจากโหลทดลอง โหลละ 10 ml นับจำนวน artemia ที่มีชีวิต (มีการเคลื่อนที่) ด้วยตาเปล่า ได้เป็นความหนาแน่นของ artemia/ น้ำทะเล 10 ml



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งเชื้อไวรัส

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ในน้ำจืด (ความเค็ม 0 ppt) และในน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

ศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส รวม 109 isolates โดยเป็นเชื้อที่แยกจาก hemolymph และ hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำป่วย จากส่วนต่างๆของประเทศไทยที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำรวม 11 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดระยอง ปราจีนบุรี จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี กระบี่ ตรัง สงขลา ปัตตานี และเป็นเชื้อจากประเทศเวียดนาม 11 isolates ชนิดของเชื้อไวรัสที่ศึกษาได้แก่ *V. fluvialis* จำนวน 25 isolates *V. damsela* จำนวน 14 isolates *V. parahaemolyticus* จำนวน 28 isolates *V. alginolyticus* จำนวน 9 isolates *V. vulnificus* จำนวน 16 isolates และ *V. cholerae* จำนวน 16 isolates

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม WHONET 5.1 (ภาคผนวก1) พบว่าเมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin มีค่า MIC₅₀ เท่ากับ 8 2 และ 0.5 µg/ml ตามลำดับ ค่า MIC₉₀ เท่ากับ 16 64 และ 4 µg/ml ตามลำดับ ช่วงค่า MIC อยู่ระหว่าง 2-32 0.5-512 และ 0.5-16 µg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ซึ่งละลายด้วยน้ำทะเล ความเค็ม 30 ppt พบว่า bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin มีค่า MIC₅₀ เท่ากับ 8 64 และ 16 µg/ml ค่า MIC₉₀ เท่ากับ 16 1024 และ 256 µg/ml และช่วงค่า MIC อยู่ระหว่าง 4-16 8-1024 และ 0.5-512 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ค่า MIC ของเชื้อไวรัสแต่ละ isolate แสดงดังตารางที่ 6 กราฟแท่งแสดงการกระจายของค่า MIC แสดงดังรูปที่ 6

ตารางที่ 5 แสดงค่า MIC₅₀ MIC₉₀ และ ช่วงค่า MIC ของยา bronopol oxytetracycline และ bronopol เมื่อละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

ชนิดยา	MIC ₅₀ (µg/ml)		MIC ₉₀ (µg/ml)		MIC range (µg/ml)	
	0 ppt	30 ppt	0 ppt	30 ppt	0 ppt	30 ppt
Bronopol	8	8	16	16	2 - 32	4 - 16
Oxytetracycline	2	64	64	1024	0.5 - 512	8 - 1024
Enrofloxacin	0.5	16	4	256	0.5 - 16	0.5 - 512



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงค่า MIC ของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin เมื่อละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

No.	isolate	regional	Bronopol		Oxytetracycline		Enrofloxacin	
			0ppt	30ppt	0ppt	30ppt	0ppt	30ppt
1	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	16	16	512	>512	4	128
2	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	16	8	≤1	64	≤1	16
3	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	8	16	32	>512	16	512
4	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	16	16	256	>512	4	128
5	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	16	16	32	512	4	128
6	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	8	16	32	>512	8	512
7	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	8	8	4	512	≤1	16
8	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	16	16	≤1	32	≤1	16
9	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	16	16	128	>512	8	256
10	<i>V.fluvialis</i>	กระบี่	8	8	4	16	≤1	8
11	<i>V.fluvialis</i>	จันทบุรี	8	8	≤1	32	4	128
12	<i>V.fluvialis</i>	ระยอง	8	8	32	>512	2	64
13	<i>V.fluvialis</i>	ระยอง	16	8	NA	NA	≤1	32
14	<i>V.fluvialis</i>	ระยอง	16	16	NA	NA	≤1	32
15	<i>V.fluvialis</i>	ระยอง	16	8	≤1	32	4	128
16	<i>V.fluvialis</i>	ระยอง	8	8	≤1	128	NA	NA
17	<i>V.fluvialis</i>	สงขลา	8	8	≤1	32	4	256
18	<i>V.fluvialis</i>	นครศรี	16	8	≤1	8	≤1	16
19	<i>V.fluvialis</i>	ประจวบ	4	8	128	>512	≤1	16
20	<i>V.fluvialis</i>	ประจวบ	16	8	2	64	≤1	16
21	<i>V.fluvialis</i>	ปัตตานี	8	4	4	256	≤1	16
22	<i>V.fluvialis</i>	เวียตนาม	16	16	≤1	64	≤1	8
23	<i>V.fluvialis</i>	เวียตนาม	16	8	2	128	≤1	8
24	<i>V.fluvialis</i>	เวียตนาม	8	8	2	64	≤1	8
25	<i>V.fluvialis</i>	เวียตนาม	8	16	≤1	32	≤1	16
26	<i>V.damsela</i>	กระบี่	16	8	4	16	NA	NA
27	<i>V.damsela</i>	ตรัง	NA	NA	32	64	NA	NA
28	<i>V.damsela</i>	ตรัง	16	8	2	8	NA	NA
29	<i>V.damsela</i>	ตรัง	16	8	64	>512	≤1	8
30	<i>V.damsela</i>	จันทบุรี	NA	NA	512	>512	NA	NA

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงค่า MIC ของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin เมื่อละลาย
อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

No	isolate	regional	Bronopol		Oxytetracycline		Enrofloxacin	
			0ppt	30ppt	0ppt	30ppt	0ppt	30ppt
31	<i>V.damsela</i>	จันทบุรี	8	4	4	32	≤1	32
32	<i>V.damsela</i>	ชุมพร	16	16	32	512	≤1	8
33	<i>V.damsela</i>	ชุมพร	16	8	≤1	32	≤1	8
34	<i>V.damsela</i>	นครศรี	16	16	NA	NA	2	64
35	<i>V.damsela</i>	ปัตตานี	8	4	2	256	≤1	16
36	<i>V.damsela</i>	เวียดนาม	16	8	16	512	≤1	8
37	<i>V.damsela</i>	เวียดนาม	4	8	2	64	NA	NA
38	<i>V.damsela</i>	เวียดนาม	4	4	≤1	64	≤1	8
39	<i>V.damsela</i>	เวียดนาม	4	8	≤1	64	≤1	8
40	<i>V.parahaemolyticus</i>	กระบี่	16	16	≤1	32	≤1	16
41	<i>V.parahaemolyticus</i>	กระบี่	16	16	32	512	≤1	16
42	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	4	8	≤1	16	≤1	16
43	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	4	4	128	>512	2	64
44	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	16	16	NA	NA	≤1	8
45	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	32	16	NA	NA	2	128
46	<i>V.parahaemolyticus</i>	จันทบุรี	8	4	4	32	≤1	32
47	<i>V.parahaemolyticus</i>	ชุมพร	16	8	≤1	64	≤1	8
48	<i>V.parahaemolyticus</i>	ชุมพร	2	8	≤1	32	2	16
49	<i>V.parahaemolyticus</i>	ชุมพร	16	16	≤1	64	4	256
50	<i>V.parahaemolyticus</i>	สุราษฎร์	4	8	≤1	64	1	32
51	<i>V.parahaemolyticus</i>	สุราษฎร์	8	4	4	64	2	64
52	<i>V.parahaemolyticus</i>	ประจวบ	4	8	128	>512	1	64
53	<i>V.parahaemolyticus</i>	ประจวบ	4	8	≤1	32	≤1	16
54	<i>V.parahaemolyticus</i>	กระบี่	8	8	≤1	16	≤1	2
55	<i>V.parahaemolyticus</i>	สงขลา	4	4	2	128	≤1	8
56	<i>V.parahaemolyticus</i>	นครศรี	4	4	2	128	≤1	16
57	<i>V.parahaemolyticus</i>	นครศรี	16	8	≤1	32	8	256
58	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	16	16	64	>512	≤1	16
59	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	4	4	2	64	4	256
60	<i>V.parahaemolyticus</i>	ระยอง	4	8	2	64	4	256

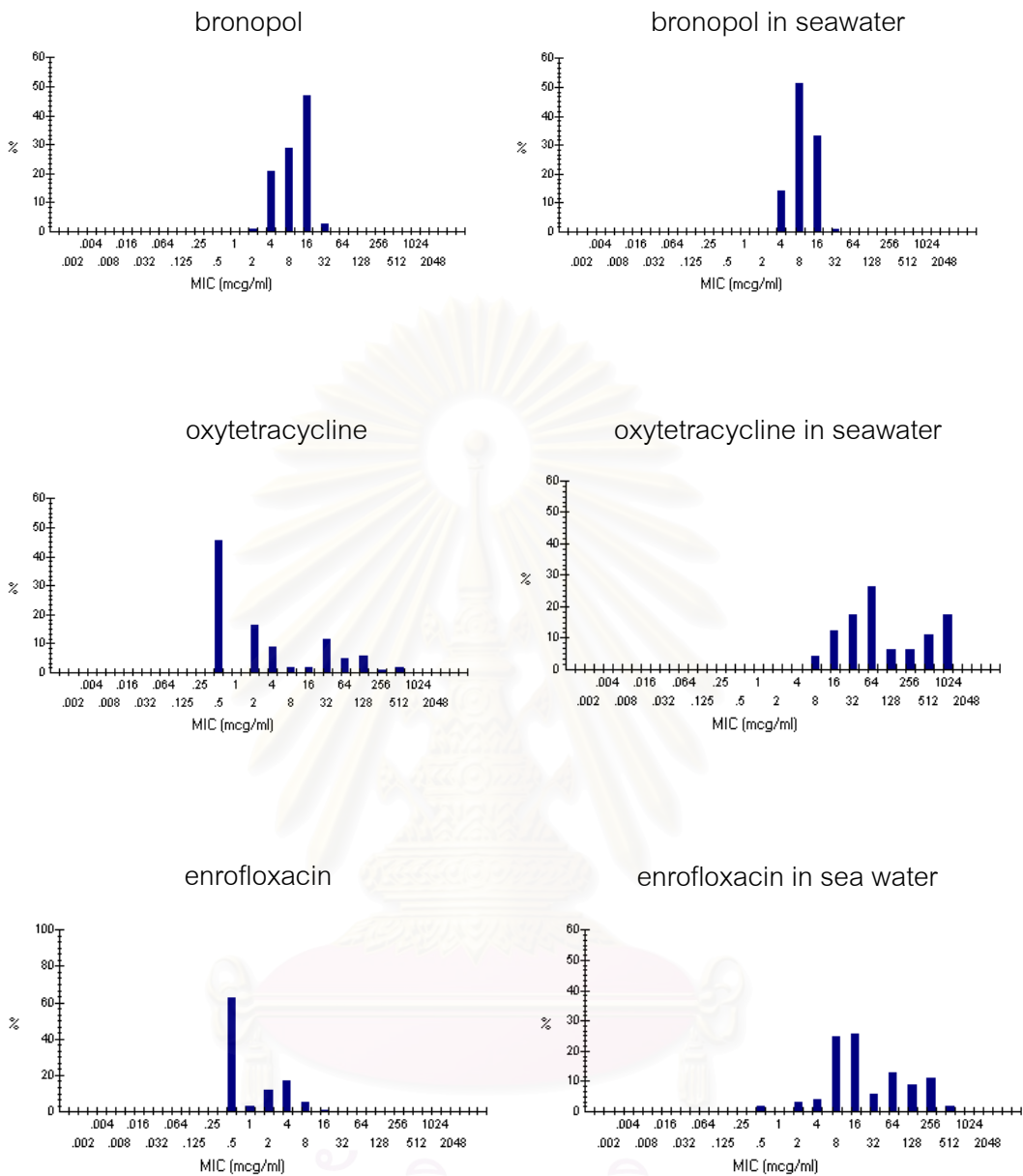
ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงค่า MIC ของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin เมื่อละลาย
อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

No	isolate	regional	Bronopol		Oxytetracycline		Enrofloxacin	
			0ppt	30ppt	0ppt	30ppt	0ppt	30ppt
61	<i>V.parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	8	16	≤1	32	≤1	8
62	<i>V.parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	16	16	≤1	32	≤1	8
63	<i>V.parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	4	8	≤1	64	2	64
64	<i>V.parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	16	16	≤1	64	2	64
65	<i>V.parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	4	8	2	128	8	256
66	<i>V.parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	16	8	≤1	16	≤1	8
67	<i>V.parahaemolyticus</i>	เวียงดนาม	4	8	≤1	64	≤1	2
68	<i>V.alginolyticus</i>	กระบี่	4	8	NA	NA	≤1	16
69	<i>V.alginolyticus</i>	กระบี่	32	32	NA	NA	≤1	8
70	<i>V.alginolyticus</i>	กระบี่	8	8	8	64	≤1	16
71	<i>V.alginolyticus</i>	ระยอง	16	16	≤1	128	≤1	16
72	<i>V.alginolyticus</i>	ระยอง	NA	NA	16	>512	NA	NA
73	<i>V.alginolyticus</i>	นครศรี	16	8	≤1	8	≤1	8
74	<i>V.alginolyticus</i>	นครศรี	8	16	≤1	32	≤1	16
75	<i>V.alginolyticus</i>	สงขลา	>16	16	≤1	16	≤1	8
76	<i>V.alginolyticus</i>	เวียงดนาม	16	16	2	64	2	128
77	<i>V.vulnificus</i>	กระบี่	4	4	4	16	≤1	8
78	<i>V.vulnificus</i>	กระบี่	8	8	NA	NA	2	64
79	<i>V.vulnificus</i>	กระบี่	16	16	≤1	>512	4	256
80	<i>V.vulnificus</i>	ตรัง	8	8	≤1	64	≤1	4
81	<i>V.vulnificus</i>	ตรัง	8	16	32	256	8	256
82	<i>V.vulnificus</i>	ตรัง	NA	NA	≤1	16	NA	NA
83	<i>V.vulnificus</i>	ตรัง	16	16	32	512	4	128
84	<i>V.vulnificus</i>	ตรัง	8	8	128	>512	≤1	8
85	<i>V.vulnificus</i>	ระยอง	4	8	32	>512	4	64
86	<i>V.vulnificus</i>	ชุมพร	16	16	NA	NA	≤1	8
87	<i>V.vulnificus</i>	สงขลา	4	4	32	512	4	128
88	<i>V.vulnificus</i>	กระบี่	16	8	2	256	≤1	8
89	<i>V.vulnificus</i>	กระบี่	8	8	4	256	≤1	16
90	<i>V.vulnificus</i>	ปัตตานี	8	4	2	256	≤1	8

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงค่า MIC ของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin เมื่อละลาย
อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

No.	isolate	regional	Bronopol		Oxytetracycline		Enrofloxacin	
			0ppt	30ppt	0ppt	30ppt	0ppt	30ppt
91	<i>V.vulnificus</i>	ปัตตานี	16	16	≤1	8	≤1	4
92	<i>V.vulnificus</i>	เวียดนาม	16	16	2	64	≤1	16
93	<i>V.cholerae</i>	กระบี่	16	8	≤1	64	≤1	64
94	<i>V.cholerae</i>	ตรัง	8	8	≤1	64	≤1	4
95	<i>V.cholerae</i>	ตรัง	8	8	≤1	64	≤1	≤1
96	<i>V.cholerae</i>	ตรัง	16	16	64	512	2	64
97	<i>V.cholerae</i>	จันทบุรี	16	8	64	512	4	256
98	<i>V.cholerae</i>	จันทบุรี	4	4	2	64	≤1	16
99	<i>V.cholerae</i>	จันทบุรี	8	8	128	>512	4	64
100	<i>V.cholerae</i>	นครศรี	16	16	≤1	16	≤1	16
101	<i>V.cholerae</i>	นครศรี	16	8	≤1	32	4	256
102	<i>V.cholerae</i>	นครศรี	16	16	NA	NA	2	32
103	<i>V.cholerae</i>	นครศรี	16	8	64	512	4	64
104	<i>V.cholerae</i>	นครศรี	16	8	32	512	≤1	8
105	<i>V.cholerae</i>	ปราจีน	16	8	≤1	16	≤1	2
106	<i>V.cholerae</i>	ปราจีน	8	8	≤1	16	≤1	2
107	<i>V.cholerae</i>	ประจวบ	4	8	≤1	32	≤1	16
108	<i>V.cholerae</i>	ประจวบ	8	4	≤1	16	1	16
109	<i>V.cholerae</i>	เวียดนาม	16	16	2	64	≤1	8

NA : not applicable



รูปที่ 6 กราฟแสดงการกระจายของค่า MIC ของยา bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในน้ำจืด (ความเค็ม 0 ppt) และน้ำทะเล (ความเค็ม 30 ppt)

จากกราฟแสดงการกระจายของค่า MIC พบว่า bronopol และ enrofloxacin มีการกระจายของค่า MIC น้อยกว่า oxytetracycline เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบในน้ำจืดและในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt พบว่า ค่า MIC ของ oxytetracycline และ enrofloxacin มีค่าสูงขึ้นเมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt

การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt

การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin ในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt พบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม bronopol 8 µg/ml เริ่มลดลงเมื่อใส่ยาได้ 20 นาที (1.61%) และลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยลดลง 56.18% ใน 70 นาที และ 96.95% ใน 120 นาที ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม bronopol 16 µg/ml ลดลงอย่างรวดเร็ว (56.71%) ภายใน 20 นาทีแรก และปริมาณลดลงถึง 87.36 และ 96.72% ที่ 70 และ 90 นาทีตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม oxytetracycline 64 µg/ml ลดลงเมื่อนับปริมาณที่ 50 นาที (41.88%) และลดลง 80.94% ที่เวลา 120 นาที และลดลงมากที่สุด (97.54%) ที่เวลา 210 นาที กลุ่ม enrofloxacin 16 µg/ml ปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลง 34.48% ใน 20 นาที ลดลง 80.91% ที่ 120 นาที และลดลงสูงสุดที่ 210 นาที (85.32%)

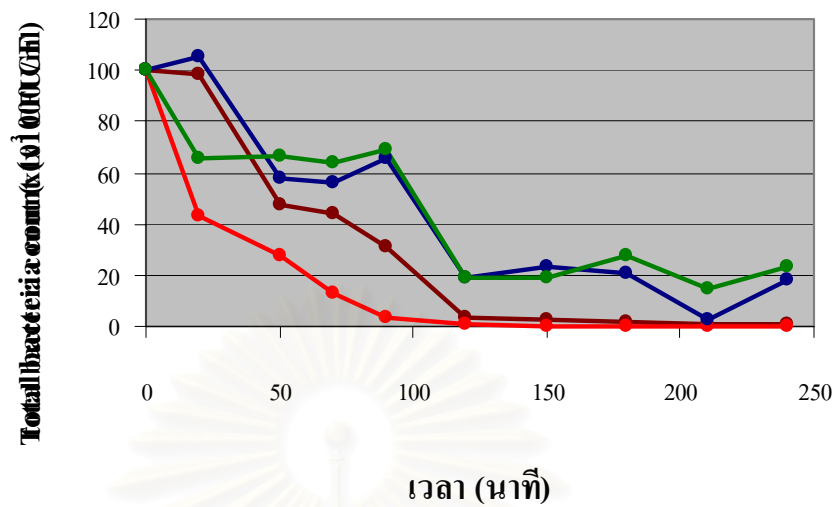
ตารางที่ 7 แสดงปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในน้ำระบบปิด และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังจากการใส่ bronopol 8 µg/ml และ 16 µg/ml oxytetracycline 64 µg/ml และ enrofloxacin 16 µg/ml

เวลา (นาที)	ยาที่ใช้ทดสอบ							
	bronopol 8 µg/ml ¹		bronopol 16 µg/ml ²		Oxytetracycline 64 µg/ml ¹		Enrofloxacin 16 µg/ml ¹	
	CFU/ml	%	CFU/ml	%	CFU/ml	%	CFU/ml	%
0	1367	100*	2310	100*	1280	100*	1305	100*
20	1345	98.39	1000	43.29	1345	105.08	855	65.52
50	646	47.26	639	27.66	744	58.12	886	66.36
70	599	43.82	292	12.64	722	56.41	838	64.21
90	424	31.02	75.7	3.28	837	65.39	896	68.66
120	41.7	3.05	16.1	0.70	244	19.06	249.2	19.09
150	33.8	2.47	4.74	0.20	296	23.12	248.4	19.03
180	23.05	1.69	2	0.09	265.6	20.75	366	28.04
210	9.5	0.69	1.15	0.05	31.56	2.46	191.6	14.68
240	6.02	0.44	1.42	0.06	232.8	18.19	304.4	23.32

¹ MIC₅₀

² MIC₉₀

* % เชื้อแบคทีเรียเมื่อเริ่มต้นการทดลองคิดเป็น 100%



รูปที่ 7 กราฟแสดงการลดลงของปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/ml) ในการทดลองระบบปิดเมื่อใส่ ● bronopol 8 µg/ml และ ● bronopol 16 µg/ml ● oxytetracycline 64 µg/ml และ ● enrofloxacin 16 µg/ml

จากกราฟปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลทุกกลุ่มการทดลองลดลงเมื่อใส่ยาได้ 20 นาที แต่ในกลุ่ม oxytetracycline 64 µg/ml เริ่มพบการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ 50 นาที ปริมาณเชื้อแบคทีเรียของกลุ่ม bronopol 16 µg/ml ลดลงมากกว่าทุกกลุ่มการทดลองทุกจุดเวลาที่เก็บตัวอย่างนำมาตรวจ

การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

แยกเชื้อจากกุ้งแช่บ๊วย จำแนกชนิดของเชื้อด้วยชุดตรวจ API ได้ผลเป็นเชื้อ

V. parahaemolyticus (ภาคผนวก 2) จึงนำเชื้อที่ได้มาศึกษาต่อในลูกกุ้งระยะ PL15

ปริมาณ total vibrio count ของลูกกุ้งแต่ละกลุ่มเมื่อครบ 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 8 จากผลการทดลองตรวจพบเชื้อไวรัสในลูกกุ้งกลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงด้วยน้ำทะเลปกติ และกลุ่มที่ใส่ bronopol ซึ่งอาจแสดงถึงปริมาณเชื้อ opportunistic vibrio ที่มีอยู่แล้วในตัวลูกกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อไวรัสในลูกกุ้งที่ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเล (43×10^4 CFU/ตัว) กับ ลูกกุ้งกลุ่มควบคุม (62.5×10^2 CFU/ตัว) พบว่าลูกกุ้งกลุ่มที่ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีปริมาณเชื้อไวรัสเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้ง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อไวรัส ในลูกกุ้งกลุ่มที่ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* (43×10^4 CFU/ตัว) และกลุ่มที่ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* และหลังจากครบ 1 ชั่วโมง ใส่ bronopol 8 $\mu\text{g/ml}$ (23.1×10^3 CFU/ตัว) พบว่าลูกกุ้งกลุ่มที่ใส่ bronopol มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่ยา ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลของแต่ละกลุ่ม พบว่าในน้ำทะเลของกลุ่มที่ใส่ bronopol มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่ แสดงว่าการที่ bronopol มีผลลดปริมาณเชื้อไวรัสของลูกกุ้งในกลุ่มที่ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* และหลังจากครบ 1 ชั่วโมง ใส่ bronopol 8 $\mu\text{g/ml}$ เกิดจากลูกกุ้งติดเชื้อไวรัสจากน้ำทะเลลดลง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลในโหลทดลองเพื่อหาปริมาณ total bacteria count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA 1% NaCl เมื่อครบ 2 6 10 16 20 และ 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียของแต่ละกลุ่มการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลในกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่าง 23.55×10^4 CFU/ml ถึง 58.70×10^4 CFU/ml กลุ่มที่ใส่ bronopol มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 6×10^2 ถึง 21×10^3 CFU/ml กลุ่มที่ใส่เชื้อไวรัสพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 13.65×10^5 ถึง 51.2×10^6 CFU/ml กลุ่มที่ใส่เชื้อไวรัส และ bronopol มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 10×10^3 ถึง 51.2×10^6 CFU/ml โดยพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลง > 99% เมื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ 6 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

ตารางที่ 8 ปริมาณ total vibrio count จากลูกกุ้ง postlarva 15×10^2 CFU/ตัว) และปริมาณ total bacteria count จากน้ำทะเล ($\times 10^2$ CFU/ml) จากการทดสอบประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อไวรัสในลูกกุ้ง postlarva ในระบบปิด

เวลา (ชม.)	กลุ่มควบคุม ¹	bronopol ²	Vibrio ³	Vibrio+ bronopol ⁴
total vibrio count ใน postlarva ($\times 10^2$ /ตัว)				
24	62.5	121	4300	231
total bacterial count in sea water ($\times 10^2$ CFU/ml)				
0	NA	NA	512000	512000
2	3235	210	420000	123500
6	5870	6	307500	350
10	3305	9.5	226000	700
16	2355	83	239000	121
20	NA	31.9	259000	100
24	5620	165	136500	110

¹ น้ำทะเลความเค็ม 30 ppt

² ใส่ bronopol 8 μ g/ml

³ ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ประมาณ 5.12×10^7 CFU/ml

⁴ ใส่ *V. parahaemolyticus* ประมาณ 5.12×10^7 CFU/ml และหลังจากนั้น 1 ชั่วโมง ใส่ bronopol 8 μ g/ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาความเป็นพิษของ bronopol

การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol โดยหาค่าความเข้มข้นของ bronopol ที่ทำให้กิ้งกูดำวายอ่อนตายครั้งหนึ่ง ในเวลา 24 ชั่วโมง (lethal concentration 50; LC₅₀)

การทดลอง LC₅₀ ในลูกกิ้งกูดำระยะ protozoa II

เลี้ยงลูกกิ้งกูดำระยะ protozoa II ในโหลทดลองซึ่งมี bronopol ความเข้มข้น 0 2 4 6 และ 8 µg/ml จากการสังเกตอาการของลูกกิ้งกูดำ 1 2 3 4 5 6 8 10 12 17 21 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ลูกกิ้งกูดำในทุกกลุ่มการทดลองยังเคลื่อนไหวได้ดี และว่ายน้ำเข้าหาแสง ในชั่วโมงที่ 3 พบว่าลูกกิ้งกูดำกลุ่ม 8 µg/ml เริ่มมีการเคลื่อนไหวที่เข้าหาแสงช้าลง ขณะที่ลูกกิ้งกูดำกลุ่ม 4 และ 6 µg/ml เริ่มมีการว่ายน้ำช้าลงในชั่วโมงที่ 8 และลูกกิ้งกูดำกลุ่ม 2 µg/ml ไม่แสดงอาการต่างจากกลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง

ลูกกิ้งกูดำระยะ protozoa ตาย 100% ที่ความเข้มข้นของ bronopol มากกว่า 6 µg/ml และเริ่มมีการตายมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 4 µg/ml จำนวนลูกกิ้งกูดำเมื่อแช่ bronopol ความเข้มข้น 0 2 4 6 และ 8 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 44 33 124 200 และ 200 ตัว ตามลำดับ โดยจำนวนลูกกิ้งกูดำที่นำมาทดสอบกลุ่มละ 200 ตัว อัตราการตายของลูกกิ้งกูดำแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกิ้งกูดำระยะ protozoa II แสดงอัตราการตายของลูกกิ้งกูดำระยะ เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ Bronopol (µg/ml)	จำนวนลูกกิ้งกูดำตาย		% ลูกกิ้งกูดำตาย
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	
0	25	19	22
2	7	26	16.5
4	62	62	62
6	100	100	100
8	100	100	100

* จำนวนลูกกิ้งกูดำตายคิดจากจำนวนลูกกิ้งกูดำที่ใช้ทดสอบ 100 ตัวลบด้วยจำนวนลูกกิ้งกูดำที่รอดชีวิตเมื่อครบ 24 ชั่วโมง

การทดลอง LC₅₀ ในลูกกุ้งกุลาดำระยะ postlarva 6 (PL6)

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ PL6 ในโหลทดลองซึ่งมี bronopol ความเข้มข้น 0 2 4 8 16 32 และ 40 µg/ml ความเข้มข้นละ 100 ตัว นับจำนวนลูกกุ้งตายและเอาออกจากโหลทดลองเป็นระยะทุก 1 3 6 14 18 21 และ 24 ชั่วโมง พบว่าลูกกุ้ง PL6 กลุ่ม 16 32 และ 40 µg/ml เริ่มมีการตายเมื่อสังเกตที่ 1 ชั่วโมงหลังแช่ bronopol โดยจำนวนลูกกุ้งตายเท่ากับ 1 2 และ 3 ตัว ตามลำดับ ลูกกุ้งกลุ่มควบคุมเริ่มมีการตายเมื่อสังเกตที่ชั่วโมงที่ 14 จำนวน 1 ตัว กลุ่ม 2 µg/ml เริ่มตายที่ชั่วโมงที่ 21 จำนวน 1 ตัว กลุ่ม 4 µg/ml เริ่มตายที่ชั่วโมงที่ 14 จำนวน 2 ตัว และกลุ่ม 8 µg/ml เริ่มตายที่ชั่วโมงที่ 14 จำนวน 3 ตัว จำนวนลูกกุ้งตายและอัตราการตายของลูกกุ้งแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ PL6 แสดงอัตราการตายของลูกกุ้งเมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ bronopol (µg/ml)	จำนวนลูกกุ้งตาย/จำนวนลูกกุ้งที่ทดสอบ*		% ลูกกุ้งตาย
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	
0	5/45	4/39	10.68
2	2/41	3/39	4.28
4	3/44	2/45	5.63
8	4/46	6/46	10.865
16	33/50	26/48	60.085
32	39/43	48/50	93.35
40	48/50	50/50	98

* จำนวนลูกกุ้งที่ใช้ทดสอบ เท่ากับจำนวนลูกกุ้งที่รอดชีวิตเมื่อครบ 24 ชั่วโมง รวมกับจำนวนลูกกุ้งตายสะสมที่ 24 ชั่วโมง

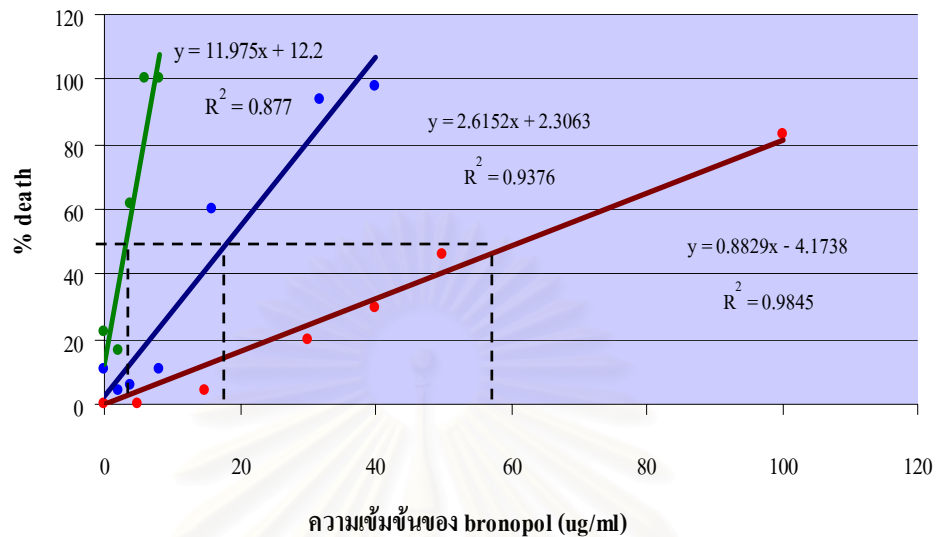
การทดลอง LC₅₀ ในลูกกุ้งกุลาดำระยะ postlarva 18 (PL18)

เมื่อแช่ลูกกุ้งระยะ PL18 ใน bronopol ความเข้มข้น 0 5 15 30 40 50 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตอาการและนับจำนวนลูกกุ้งตายเป็นระยะทุก 1 2 4 8 12 15 18 22 และ 24 ชั่วโมง ไม่พบลูกกุ้งตายในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 5 µg/ml ตลอดการทดลอง ลูกกุ้งกลุ่ม 15 µg/ml เริ่มมีการตายที่ 8 ชั่วโมง กลุ่ม 30 และ 40 µg/ml เริ่มตายที่ 8 ชั่วโมง กลุ่ม 30 และ 40 µg/ml เริ่มตายที่ 4 ชั่วโมง กลุ่ม 50 และ 100 µg/ml เริ่มมีลูกกุ้งตายตั้งแต่ชั่วโมงแรก อัตราการตายของลูกกุ้งแสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ PL18 แสดงอัตราการตายของลูกกุ้ง เมื่อแช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ bronopol (µg/ml)	จำนวนลูกกุ้งตาย/ จำนวนกุ้งที่ทดสอบ *			%ลูกกุ้งตาย
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2	การทดลองที่ 3	
0	0/48	0/41	0/43	0
5	0/50	0/43	0/48	0
15	1/41	2/39	2/49	3.87
30	6/41	14/49	6/41	19.85
40	10/46	13/48	19/46	30.00
50	12/36	25/46	22/47	45.74
100	41/47	43/50	35/46	83.22

* จำนวนลูกกุ้งที่ใช้ทดสอบ เท่ากับจำนวนลูกกุ้งที่รอดชีวิตเมื่อครบ 24 ชั่วโมง รวมกับจำนวนลูกกุ้งตายสะสมที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 8 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้ง กราฟแสดงเส้นแนวโน้ม อัตราการตายของลูกกุ้งระยะ ● protozoa II ● PL6 และ ● PL18 เมื่อแช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เส้นประแสดงค่า LC₅₀

กราฟเส้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ bronopol มากขึ้น อัตราการตายของลูกกุ้ง จะสูงขึ้นโดยลูกกุ้งระยะ protozoa มีความทนทานต่อ bronopol น้อยกว่าลูกกุ้งระยะ postlarva จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Probit analysis ได้ค่า LC₅₀ ของ bronopol เมื่อแช่ในลูกกุ้งกุลาดำ ระยะ protozoa II เท่ากับ 2.9 µg/ml (ภาคผนวก 3) ระยะ PL6 เท่ากับ 16.44 µg/ml (ภาคผนวก 4) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 61.34 µg/ml (ภาคผนวก 5)

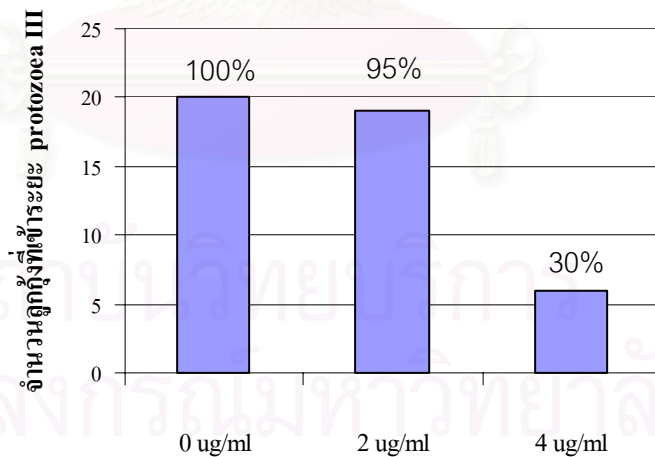
การศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนระยะของกิ้งกูดาวัยอ่อน

การศึกษาในลูกกิ้งระยะ protozoa

เมื่อเริ่มต้นการศึกษาลูกกิ้งอยู่ในระยะ protozoa II เมื่อเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง นำลูกกิ้งที่รอดชีวิตมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความเข้มข้นละ 20 ตัว พบว่าลูกกิ้งกลุ่มควบคุมสามารถเข้าสู่ระยะ protozoa III ได้ตามปกติ ทั้ง 20 ตัว ขณะที่กลุ่มแช่ bronopol 2 $\mu\text{g/ml}$ และ 4 $\mu\text{g/ml}$ เข้าสู่ระยะ protozoa III ได้ 19 ตัว (95%) และ 6 ตัว (30%) ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกิ้งระยะ protozoa แสดงจำนวนลูกกิ้งระยะ protozoa II ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ protozoa III เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง

bronopol ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนลูกกิ้งที่เข้าระยะ protozoa III / จำนวนที่สุ่มตรวจ
0	20/20
2	19/20
4	6/20



ความเข้มข้นของ bronopol

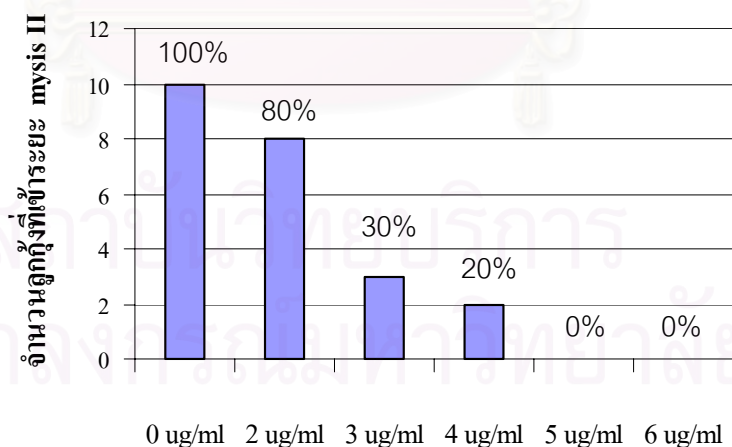
รูปที่ 9 การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกิ้งระยะ protozoa กราฟแสดงจำนวนลูกกิ้งระยะ protozoa II ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ protozoa III เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง

การศึกษาในลูกกุ้งระยะ mysis

เมื่อเริ่มต้นการศึกษาลูกกุ้งอยู่ในระยะ mysis I เมื่อเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง นำลูกกุ้งที่รอดชีวิตมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความเข้มข้นละ 10 ตัว พบว่าลูกกุ้งกลุ่มควบคุมสามารถเข้าสู่ระยะ mysis II ได้ทั้งหมด 10 ตัว ขณะที่ลูกกุ้งกลุ่มแช่ bronopol ความเข้มข้น 0 2 3 4 5 และ 6 $\mu\text{g/ml}$ เข้าสู่ระยะ mysis II ได้ 8 3 2 0 และ 0 ตัว ตามลำดับ ผลดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ mysis แสดงจำนวนลูกกุ้งระยะ mysis I ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ mysis II เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง

bronopol ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนลูกกุ้งที่เข้าระยะ mysis II / จำนวนที่สุ่มตรวจ
0	10/10
2	8/10
3	3/10
4	2/10
5	0/10
6	0/10

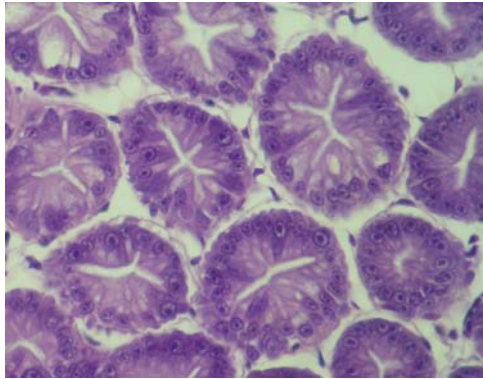


ความเข้มข้นของ bronopol

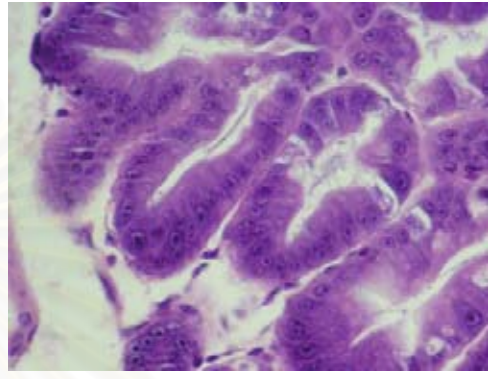
รูปที่ 10 การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ mysis กราฟแสดงจำนวนลูกกุ้งระยะ mysis I ที่สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ mysis II เมื่อตรวจระยะที่ 24 ชั่วโมง

การศึกษาผลของ bronopol ต่อจุลพยาธิสภาพของกุ้งกุลาดำระยะ postlarva

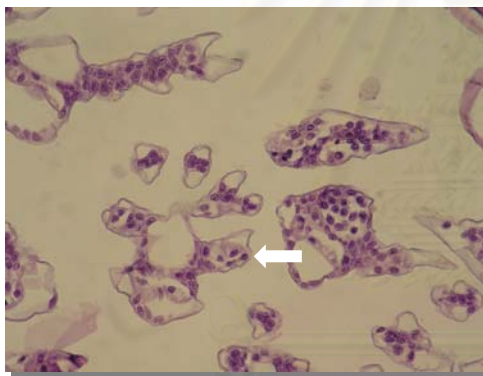
เมื่อลูกกุ้งสัมผัสกับ bronopol ครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างลูกกุ้งจากกลุ่ม control และกลุ่ม
แช่ bronopol 8 $\mu\text{g/ml}$ ตรวจทางจุลพยาธิวิทยา กลุ่มละ 10 ตัว ไม่พบความแตกต่างทาง
จุลพยาธิวิทยา (รูปที่ 11)



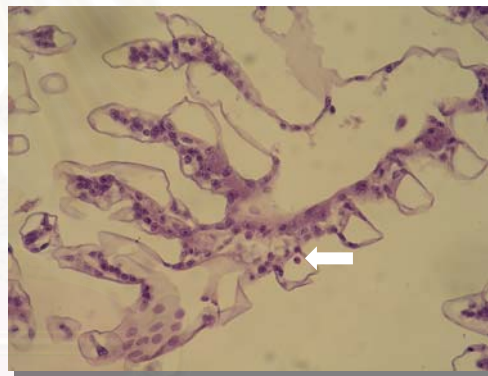
(1)



(2)



(3)



(4)

รูปที่ 11 ภาพทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ hepatopancreas และ เหงือกของลูกกุ้งกลุ่ม
ควบคุมการทดลอง และลูกกุ้งที่สัมผัสกับ bronopol ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (H&E
stain, Davidson's fixative, 400x)

(1) (2) hepatopancreas ของลูกกุ้งระยะ postlarva 15 แสดงการเรียงตัวของ tubular cells และ
fat goblets ใน hepatopancreatic cells ไม่พบพยาธิสภาพในกลุ่มควบคุมการทดลอง (1) และ
กลุ่มที่แช่ใน bronopol ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (2)

(3) (4) gill filament ของลูกกุ้งระยะ postlarva 15 ลูกศรแสดง circulating hemocyte ไม่พบ
พยาธิสภาพในกลุ่ม กลุ่มควบคุมการทดลอง (3, longitudinal section) และกลุ่มที่แช่ใน bronopol
ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (4, cross section)

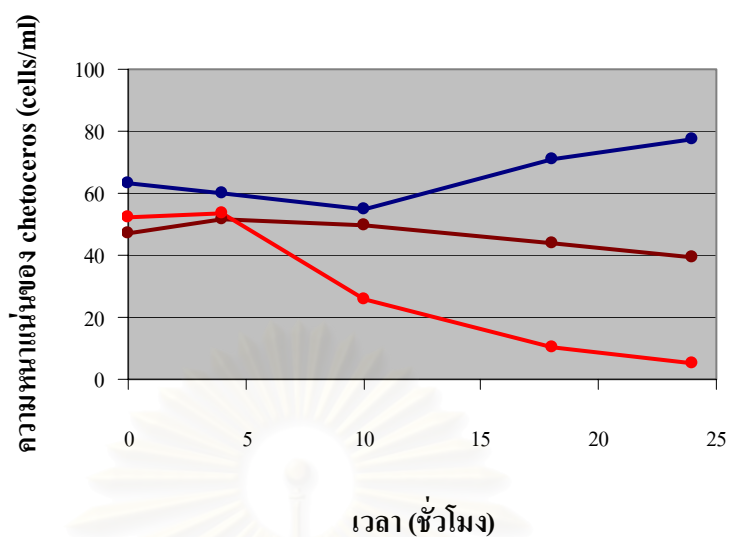
การศึกษาผลของ bronopol ต่ออาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน ได้แก่ chaetoceros rotifer และ artemia

การศึกษาใน chaetoceros

การศึกษาของ bronopol ต่อ chaetoceros เลือกใช้ bronopol ที่ความเข้มข้น 8 และ 16 µg/ml เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50 และ 90% ตามลำดับ นับจำนวน chaetoceros ในโหลทดลองด้วย hemocytometer ทุก 0 4 10 18 และ 24 ชั่วโมง ได้จำนวน chaetoceros (cells/ml) ดังตารางที่ 14 จำนวน chaetoceros ในกลุ่มควบคุมลดลงเมื่อนับจำนวนที่ชั่วโมงที่ 4 และ 10 และเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 18 และ 24 ขณะที่กลุ่ม 8 µg/ml และ 16 µg/ml จำนวน chaetoceros ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 จนถึง 24 ชั่วโมง โดยกลุ่ม 8 µg/ml จำนวน chaetoceros ลดลง 17.31% เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จำนวน chaetoceros ของกลุ่ม 16 µg/ml ที่ 10 18 และ 24 ชั่วโมง ลดลง 51.37% 80.36% และ 89.67% ตามลำดับ จากการสังเกตสีของน้ำทะเลที่ทำการทดลองเมื่อครบ 24 ชั่วโมงพบว่า น้ำทะเลของกลุ่ม 16 µg/ml จะใสกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจาก chaetoceros ที่ตายจะตกตะกอนลงก้นโหลทดลอง ขณะที่น้ำทะเลในกลุ่มควบคุมเป็นสีน้ำตาลเข้ม และน้ำทะเลในกลุ่ม 8 µg/ml มีสีน้ำตาลอ่อนกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 14 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ chaetoceros ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol 0 µg/ml 8 µg/ml และ 16 µg/ml

ความเข้มข้นของ bronopol (µg/ml)	จำนวน chaetoceros (cells/ml)				
	0 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	10 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0	63.5	57.62	58.00	74.87	82.12
0	63.5	61.87	51.62	67.00	72.50
ค่าเฉลี่ย	63.5	56.74	54.81	70.93	77.31
8	44.87	59.37	51.00	40.50	34.75
8	49.75	43.87	48.12	46.75	43.50
ค่าเฉลี่ย	47.31	51.62	49.56	43.62	39.12
16	55.75	56.25	26.50	7.00	3.87
16	49.37	51.00	24.62	13.12	7.00
ค่าเฉลี่ย	52.56	53.62	25.56	10.06	5.43



รูปที่ 12 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ chaetoceros ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol ความเข้มข้น • 0 µg/ml • 8 µg/ml และ • 16 µg/ml

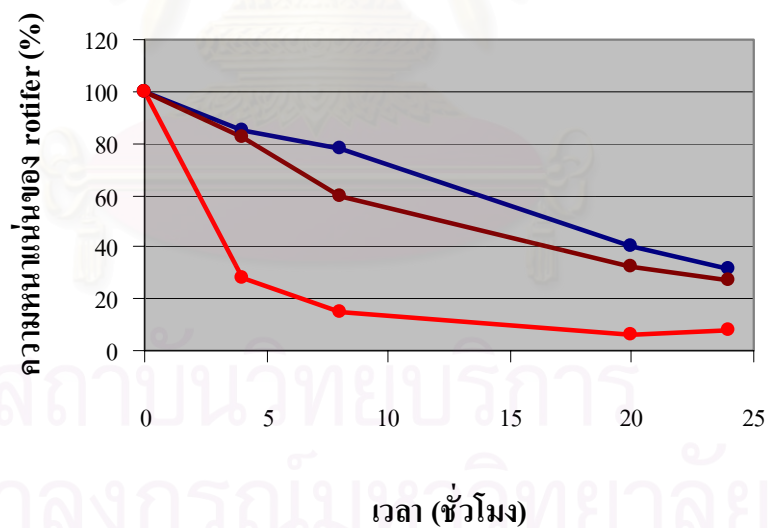
จากกราฟจำนวน chaetoceros ในกลุ่ม 8 และ 16 µg/ml มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 จนถึง 24 ชั่วโมง โดยกลุ่ม 16 µg/ml ลดลงมากที่สุด

การศึกษาใน rotifer

การศึกษาของ bronopol ต่อ rotifer เลือกใช้ bronopol ที่ความเข้มข้น 8 และ 16 µg/ml เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50 และ 90% ตามลำดับ เก็บตัวอย่างน้ำทะเลในโหลทดลองมานับปริมาณ rotifer เป็นระยะ เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าจำนวน rotifer ในทุกกลุ่มการทดลองลดลงตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมลดลง 14.92 22.01 59.33 และ 68.66% กลุ่ม 8 µg/ml ลดลง 17.95 40.65 67.83 และ 72.57% และกลุ่ม 16 µg/ml ลดลง 71.81 85.02 93.61 และ 92.29% ที่ 0 4 8 20 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ผลการทดลองแสดงถึงการลดลงของจำนวน rotifer ในกลุ่ม 8 และ 16 µg/ml มากกว่ากลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลา โดยจำนวน rotifer ในกลุ่ม 16 µg/ml ลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่ 4 ชั่วโมงแรก

ตารางที่ 15 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ rotifer ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol 0 µg/ml 8 µg/ml และ 16 µg/ml

ความเข้มข้นของ bronopol (µg/ml)	จำนวน rotifer (cells/ml)				
	0 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	20 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0	550	475	550	355	285
0	790	665	495	190	135
ค่าเฉลี่ย	670	570	522.5	272.5	210
8	925	605	460	180	120
8	1080	1040	730	465	430
ค่าเฉลี่ย	1002.5	822.5	595	322.5	275
16	1110	260	195	95	130
16	1160	380	145	50	45
ค่าเฉลี่ย	1135	320	170	72.5	87.5



รูปที่ 13 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ rotifer ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol ความเข้มข้น

- 0 µg/ml • 8 µg/ml และ • 16 µg/ml

จากกราฟ จำนวน rotifer ในทุกกลุ่มการทดลองลดจำนวนลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยจำนวน rotifer กลุ่ม 8 และ 16 µg/ml ลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุม

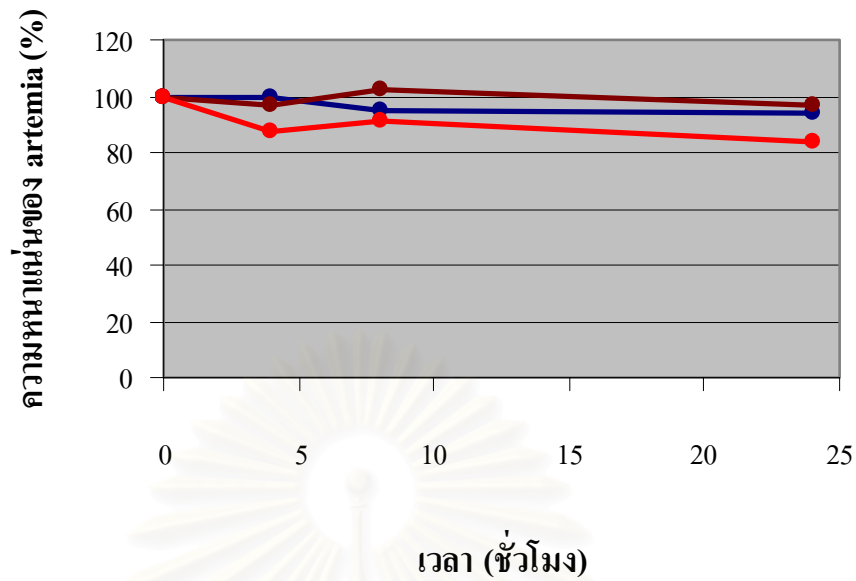
การศึกษาใน artemia

การศึกษาของ bronopol ต่อ artemia เลือกใช้ bronopol ที่ความเข้มข้น 8 และ 16 µg/ml เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50 และ 90% ตามลำดับ เก็บน้ำทะเลในโหลทดลองมานับปริมาณ artemia ทุก 0 4 8 และ 24 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 16

เมื่อเวลาผ่านไป จำนวน artemia ในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจน โดยเมื่อครบ 24 ชั่วโมง จำนวน artemia ในกลุ่มควบคุม กลุ่ม 8 และ 16 µg/ml ลดลง 6% 3.19% และ 16.32% ตามลำดับ

ตารางที่ 16 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ artemia ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol 0 µg/ml 8 µg/ml และ 16 µg/ml

ความเข้มข้นของ bronopol (µg/ml)	จำนวน artemia (cells/ 10ml)			
	0 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง	8 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0	23.5	22	24	23.5
0	26.5	28	23.5	23.5
ค่าเฉลี่ย	25	25	23.75	23.5
8	23.5	23	25.5	23.5
8	23.5	22.5	22.5	22
ค่าเฉลี่ย	23.5	22.75	24	22.75
16	22	22	21	19.5
16	27	21	23.5	21.5
ค่าเฉลี่ย	24.5	21.5	22.25	20.5



รูปที่ 14 การทดสอบผลของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ artemia ในระบบปิด หลังจากใส่ bronopol ความเข้มข้น

• 0 µg/ml • 8 µg/ml และ • 16 µg/ml

จากกราฟ จำนวน artemia ของทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันมาก โดยกลุ่ม 16 µg/ml มีจำนวน artemia ลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 8 µg/ml

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในกิ้งกูดำในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการหาค่า MIC พบว่าความเข้มข้นของ bronopol ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้อยู่ในช่วง 2-32 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ bronopol กับ oxytetracycline และ enrofloxacin พบว่า oxytetracycline มีค่า MIC อยู่ในช่วงกว้างกว่า bronopol และ enrofloxacin เนื่องจาก oxytetracycline เป็นยาที่มีการใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นเวลานาน นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงกิ้งกูดำอย่างแพร่หลายโดยมีการใช้ทั้งในพ่อแม่พันธุ์ไข่ กุ้งวัยอ่อน และกุ้งโตเต็มวัย ทำให้เชื้อแบคทีเรียบางส่วนเกิดความต้านทานต่อยาขึ้น (Angka, 1997) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ English et al. (1997) ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัสจากกิ้งกูดำที่แยกได้จากประเทศไทย มีความต้านทานต่อยา oxytetracycline สูง เช่นเดียวกับประเทศมาเลเซีย การศึกษาของ Ruangsri และคณะ (2004) ซึ่งทดสอบถึงความไวของเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* 10 isolates ที่แยกได้จากกิ้งกูดำที่ป่วยเป็นโรคที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา สตูล และปัตตานี พบว่า 60% ของเชื้อมีความต้านทานต่อยา

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาระดับค่า MIC ของ oxytetracycline และ enrofloxacin ของการศึกษานี้กับการศึกษาของ Mohney และคณะ (1992) พบว่าใกล้เคียงกันโดยการศึกษาของ Mohney และคณะ (1992) ในเชื้อไวรัสจำนวน 13 isolates ที่แยกได้จากกิ้งกูดำป่วยจากฮาวาย เทกซัส อริโซนา เอกวาดอร์ ญี่ปุ่น และไทย ได้ค่า MIC ของ oxytetracycline และ enrofloxacin อยู่ในช่วง 0.25-120.0 µg/ml และ 0.1-10.0 µg/ml ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ruangpan และ Kitao (1992) ในเชื้อไวรัสที่แยกได้จากกิ้งกูดำป่วยจำนวน 205 isolates ซึ่งได้ค่า MIC ของ oxytetracycline อยู่ในช่วง 0.2-100 µg/ml ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากับ 4.8 และ 37.5 µg/ml และการศึกษาของ Ruangpan และคณะ (1995) ในเชื้อไวรัสที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกิ้งกูดำจำนวน 135 isolates ได้ค่า MIC ของ oxytetracycline เท่ากับ 0.025- >100 µg/ml ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ เท่ากับ 12.5 และ > 100 µg/ml ตามลำดับ

การศึกษาค้นคว้าของน้ำทะเลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสของ bronopol oxytetracycline และ enrofloxacin พบว่า ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของ oxytetracycline และ enrofloxacin เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า น้ำทะเลความเค็ม 30ppt มีผลทำให้ประสิทธิภาพของ

ยาทั้ง 2 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อไวรัสโกลดลง แต่ไม่มีผลต่อ bronopol ซึ่งค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ไม่เปลี่ยนแปลง

Torkildsen และคณะ (2000) และ Lunestad และ Samuelsen (2001) อธิบายว่า น้ำทะเลมีผลทำให้การออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของยาบางชนิดลดลงเนื่องจากน้ำทะเลมีแร่ธาตุต่างๆเป็นส่วนประกอบมากมาย เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งมีประจุบวกเป็นหลัก มีผลต่อสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย หรือส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือยามีผลต่อยาหรือสารเคมีโดยตรง ซึ่งทำให้ความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพและค่า MIC เปลี่ยนแปลงไป

การออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพมีความเกี่ยวข้องกับ permeability ของ cell envelope โดยการลด permeability ของเซลล์ ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อยา และการเพิ่ม permeability ของเซลล์ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดความไวรับต่อยา ส่วนประกอบในน้ำทะเลมีอิทธิพลต่อสรีรวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย โดยปกติน้ำทะเลที่มีความเค็ม 35 ppt ประกอบด้วย 54 mM Mg²⁺ และ 10 mM Ca²⁺ ซึ่ง divalent cation นี้มีส่วนอย่างมากต่อการลดประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ โดยโมเลกุลซึ่งมีประจุลบของ lipopolysaccharide layer (LPS) ซึ่งเป็นส่วน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ จะถูก neutralised โดยประจุบวกจากน้ำทะเล ทำให้เซลล์ลด permeability ต่อยาต้านจุลชีพซึ่งเป็นโมเลกุลประจุบวก (Lunestad and Samuelsen, 2001)

การศึกษาผลของน้ำทะเลต่อประสิทธิภาพของ oxytetracycline สอดคล้องกับรายงานของ Lunestad and Samuelsen (2001) ที่กล่าวถึงการศึกษาค่า MIC โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำทะเล พบว่าค่า MIC ของยา oxytetracycline เพิ่มขึ้นจากการทดสอบที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มี Mg²⁺ หรือ Ca²⁺ ถึง 10 เท่า และรายงานของ Torkildsen และคณะ (2000) ซึ่งอธิบายว่า โมเลกุลของยาในกลุ่ม tetracycline มีส่วน binding sites จำนวนมาก ที่มีความสามารถในการจับกับประจุบวก divalent และ trivalent เป็น stable complex ซึ่งมีผลให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของยาลดลง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในหลอดทดลอง พบว่า bronopol สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสโอได้ และน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ซึ่งเป็นความเค็มที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำวัยอ่อนไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสโอของ bronopol จึงทำการศึกษาขั้นต่อไป ได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน จากค่า Lethal Concentration 50 ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าไม่สามารถใช้ bronopol ขนาด 8 µg/ml (ค่า MIC₅₀) ในลูกกุ้งระยะ protozoa II เนื่องจากลูกกุ้งมีอัตราการตาย 100% เมื่อแช่ยาภายใน 24 ชั่วโมง แต่สามารถใช้ในลูกกุ้งระยะ PL6 และ PL18 ได้ โดยเมื่อลูกกุ้งเจริญเติบโตขึ้นจะมีความทนทานต่อ bronopol มากขึ้น

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อลูกกุ้งระยะ protozoa II และ mysis I พบว่า bronopol ความเข้มข้น $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ มีผลต่อการเปลี่ยนระยะของลูกกุ้ง โดยพบว่าลูกกุ้งที่แช่ด้วย bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีการเปลี่ยนระยะช้ากว่าปกติ และการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาใน ลูกกุ้งระยะ PL15 พบว่า bronopol ความเข้มข้น $8 \mu\text{g/ml}$ (MIC_{50}) ไม่มีผลต่อ hepatopancreas และ เหงือกของลูกกุ้ง

การใช้อาหารในกุ้งวัยอ่อนนอกจากจะต้องศึกษาผลความเป็นพิษของยาต่อตัวกุ้งแล้ว ผลต่อ อาหารลูกกุ้งมีความสำคัญมีความสำคัญเช่นกัน เนื่องจากลูกกุ้งวัยอ่อนกินอาหารตลอดเวลา และ กินอาหารที่มีชีวิต การศึกษาผลของ bronopol ต่อ chaetoceros (อาหารลูกกุ้งระยะ protozoa) rotifer (อาหารลูกกุ้งระยะ mysis) และ artemia (อาหารลูกกุ้งระยะ postlarva) พบว่า bronopol ความเข้มข้น 8 และ $16 \mu\text{g/ml}$ (MIC_{50} และ MIC_{90}) มีผลทำให้จำนวน chaetoceros และ rotifer ลดลง ขณะที่ไม่มีผลต่อ artemia

จากผลการศึกษาพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของ bronopol ต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อน และ การศึกษาพิษของ bronopol ต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารลูกกุ้ง พบว่าไม่ควรใช้ bronopol ในลูกกุ้ง ระยะ protozoa และ mysis เนื่องจากลูกกุ้งไม่สามารถทนต่อ bronopol ที่ความเข้มข้น $8 \mu\text{g/ml}$ (MIC_{50}) นอกจากนี้ bronopol ยังมีผลต่อการเปลี่ยนระยะของลูกกุ้ง และมีผลต่อแพลงก์ตอนที่เป็นอาหารลูกกุ้ง

เนื่องจาก bronopol ความเข้มข้น $8 \mu\text{g/ml}$ ไม่ทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งระยะ PL6 และ PL18 และไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้มาศึกษา ต่อถึงการนำ bronopol มาใช้ควบคุมเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำระยะ postlarva ซึ่งผลการทดลองพบว่า การให้ลูกกุ้งระยะ PL แช่ bronopol ความเข้มข้น $8 \mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถป้องกันการ ติดเชื้อไวรัสของลูกกุ้งจากน้ำที่ใช้เลี้ยง โดยการลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในน้ำ แต่การใช้ bronopol ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสที่มีอยู่แล้วในตัวกุ้งได้ ดังนั้นการใช้ bronopol จึงควรใช้ เพื่อเป็นการป้องกันโรคมากกว่าการใช้เพื่อรักษา

การศึกษสาเหตุของการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนของ Eduardo และคณะ (1998) พบว่า เชื้อไวรัสเข้าสู่ตัวกุ้งได้โดยการกิน และจากการที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำสูงเกินไป ดังนั้นเมื่อกุ้งมีการกินเชื้อไวรัสอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดการ colonization ของเชื้อในทางเดินอาหารขึ้น การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียระหว่างกุ้งกลุ่มที่เป็นโรค และไม่เป็นโรค พบว่ากุ้งกลุ่มที่แสดงอาการของโรคมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมากกว่ากุ้งกลุ่มปกติ แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคในกุ้ง โดยการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียใน hepatopancreas จะไปแทนที่ normal flora ในทางเดินอาหาร ทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยอาหาร การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียพบว่ากุ้งที่มีเชื้อไวรัส $10^2 \text{ CFU/hepatopancreas}$

ไม่แสดงอาการเกิดโรค อย่างไรก็ตามการเกิดโรคขึ้นกับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในน้ำด้วย เนื่องจากเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียที่จะเข้าสู่ตัวกุ้งได้ โดยควรรักษาระดับของเชื้อไวรัสในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ไม่ให้เกิน 10^2 CFU/ml ดังนั้นการใช้ยาต้านจุลชีพจึงไม่มีความจำเป็นถ้าสามารถควบคุมปริมาณเชื้อในน้ำและในตัวกุ้งได้ การป้องกัน เช่น การรักษาสภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งให้เหมาะสม และมีการจัดการการให้อาหารที่ดีจึงเป็นทางที่ได้ผลดีกว่า ดังนั้นจึงอาจใช้ bronopol เมื่อพบว่าในบ่อเลี้ยงมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าปกติเพื่อเป็นการลดการติดเชื้อในกุ้งวัยอ่อนได้

นอกจากการใช้ bronopol เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจากน้ำที่ใช้เลี้ยงแล้วยังอาจใช้ในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน artemia ก่อนให้ลูกกุ้งกิน โดยมีการศึกษาชนิดของเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนของ Thanasomwang และคณะ (1995) พบว่าระยะของลูกกุ้งที่พบว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสรวมสูงสุดคือ ระยะ mysis II โดยมีปริมาณเชื้อไวรัสภายนอกตัวและภายในตัวเท่ากับ 1.6×10^3 และ 7.0×10^2 CFU ต่อตัว และลูกกุ้งมีอัตราการตายสูง ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียใน artemia แซ่แข็งซึ่งเริ่มให้ลูกกุ้งในระยะนี้กิน จากการนับเชื้อแบคทีเรียในอาหารลูกกุ้งพบว่า artemia แซ่แข็งมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียสูงสุด (10^6 CFU/กรัม) โดยเป็นเชื้อไวรัสถึง 83.5% และการศึกษาของ Lavilla-Pigoto และคณะ (1992) ถึงแหล่งที่มาของเชื้อ *V. harveyi* ในฟาร์มอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ พบ *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เลี้ยง artemia ขณะที่พบปริมาณเชื้อน้อยใน diatom Lavilla-Pigoto และคณะ (1992) แนะนำวิธีการลดอุบัติการณ์การเกิดโรคในฟาร์มอนุบาล โดยวิธีการป้องกันเนื่องจากการใช้ยาต้านจุลชีพไม่ได้ผล เช่นการแยกแม่กุ้งและสิ่งขับถ่ายออกจากไข่ให้เร็วที่สุด หลังจากแม่กุ้งวางไข่ ทำความสะอาด artemia โดยการล้างก่อนให้ลูกกุ้งกิน การใช้ chlorine หรือการฆ่าเชื้อในน้ำด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การใช้ ultraviolet และการกรอง เป็นการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำได้ ดังนั้นจึงอาจใช้ bronopol เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน artemia ก่อนให้ลูกกุ้งกิน

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถใช้ bronopol เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสของลูกกุ้งจากแหล่งน้ำ โดยใช้ได้ในลูกกุ้งระยะตั้งแต่ postlarva 6 ขึ้นไป โดยใช้ขนาด 8 $\mu\text{g/ml}$ แซ่เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง โดยอาจใช้ bronopol เมื่อตรวจสอบพบว่าน้ำที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัส $> 10^2$ CFU/ml

2. ไม่ควรใช้ bronopol ในลูกกุ้งระยะ protozoa และ mysis เนื่องจากลูกกุ้งมีความทนทานต่อยาต้านจุลชีพมากกว่า และเมื่อผลต่อ chetoceros และ rotifer ซึ่งเป็นอาหารที่สำคัญของลูกกุ้งระยะนี้

3. สามารถใช้ bronopol เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียใน artemia ก่อนให้ลูกกุ้งกิน โดยใช้ในขนาด 8 µg/ml แซ่เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง

4. การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงประสิทธิผลและความเป็นพิษของ bronopol ในการป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งวัยอ่อน อย่างไรก็ตามการนำ bronopol ไปใช้ในโรงเพาะฟักอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการตกค้างของ bronopol ในเนื้อเยื่อกุ้ง

5. การศึกษานี้เป็นแบบอย่างในการประเมินประสิทธิผลและความเป็นพิษของการใช้ยาภายนอกเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2546. รายงานการวิจัย “การประเมินการให้ยา Florfenicol ในการรักษาโรคในกุ้ง *Penaeus spp.*” สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ โครงการพัฒนาและปรับปรุงด้านสุขลักษณะอาหาร ปีงบประมาณ 2546. หน้า 6-7.
- ณิธาวัน เจริญพร, ชลธิดา บรรเทากุล, นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์, มณฑล เลิศวรปรีชา และเจนนุช ว่องธวัชชัย. 2546. การสำรวจความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ vibrio ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ. เวชสารสัตวแพทย์ 33 (2): 71-78
- อำมรงค์ ประกอบบุญ. 2545. เอกสารประกอบการสัมมนา “ผลการให้ยาปฏิชีวนะในการส่งออกกุ้งกุลาดำ.” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- บรรจง เทียนสงฆ์ศรี. 2530. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์อักษรเจริญทัศน์, 3-5.
- ลิลลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และ กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2540. แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ทบวงมหาวิทยาลัย, 3-10.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2540. คู่มือการเลี้ยงแพลงก์ตอน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 31-37.
- วีณะ อริศราธรรม และ อหิงส์ ปุริทัศน์. 2531. เทคนิคการเพาะพันธุ์กุ้งทะเลในได้หวน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มิตรสยาม, 46-48.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 178-184.

ภาษาอังกฤษ

- Angka, S.L. 1997. Antibiotic sensitivity and pathogenicity of aeromonas and vibrio Isolates in Indonesia. In : Diseases in Asian Aquaculture III. Flegel, T.W. and Macrae, I.H. (eds.), Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila. 339-347.

- Barrow, G.I. and Feltham. R.K.A. 1993. Cowan and Sreel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press. 754-759.
- Branson, E. 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Veterinary Record* 151 (18):539-541. [Online]. Available from : <http://www.infopet.co.uk>
- Delost, M.D. 1997. Introduction to Diagnosis Microbiology: A Text and Workbook. Mosby, 240-241.
- Department for Environment, Food and Rural Affairs. 2002. Use of malachite green to end. [Online]. Available from : <http://www.defra.gov.uk>
- Eduardo, M.L., Celia, R.L., and Milagros, G.P. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* 164: 367-374.
- Elliot, E.L., Kaysner, A., and Tamplin, M.L. 1992. FDA Bacteriological Analytical Manual. 7th ed. 111-120.
- Forbes, B.A., Sahm, D.H., and Weissfeld, A.S. 1998. *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides*, and *Chromobacterium violaceum*. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed. St.Louis : Mosby, 488-500.
- Gräslund, S., Karisson, K., and Wongtavatchai, J. 2002. Responsible use of antibiotics in shrimp farming. *Aquaculture Asia Magazine* 7:3. [Online]. Available from : <http://www.enaca.org>
- Inglis, V., Abdullah, S.L., Angka, S., Chinabut, Md.B.R., Chowdhury, E.M., Leano, I.H., Macrae, A., Sasongko, T., Somsiri, T., and Yambot, A.V. 1997. Survey of resistance to Antimicrobial Agents Used in Aquaculture in Five South East Asian Countries. In : Diseases in Asian Aquaculture III, T.W., Flegel, and I.H., Macrae,(eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society, .331-337.
- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., and Limsuwan, C. 1994. Histopathology, Biochemistry, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Infecting Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. Journal of Aquatic Animal Health 6: 27-35.

- Jiravanichpaisal, P. , Miyazaki, T., Limsuwan, C. and Somjetlerdchalern, A. 1995. Comparative Histology of Vibriosis in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* . In :Diseases in Asian Aquaculture II, M.Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 131-140.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Albright, L.J., Paner, M.G., and Sunaz, N.A. 1992. Study on the sources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries. In: Diseases in Asian Aquaculture I. M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 157-164.
- Lavilla-Pitogo, C.R. 1995. Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. In :Diseases in Asian Aquaculture II, M.Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society.107-121.
- Lunestad, B.T., and Samuelson, O.B. 2001. Effect of sea water on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture ; implications for MIC testing. Aquaculture 196 : 319-323.
- Mohney, L.L., Bell, T.A. and Lightner, D.V. 1992. Shrimp antimicrobial testing I, In vitro susceptibility of thirteen gram negative bacteria to twelve antimicrobials. J. of Aquatic animal health 4 : 257-261.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio species* in penaeid aquaculture pond. Aquaculture 164: 351-358.
- Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P., and Ruamthaveesub, P. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture I. M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- National Chemicals Inspectorate. 2003. "Information on substances." [Online]. Available from :<http://www.kemi.se>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. Vol. 19 No.1. 94-100.

- Roth, M., Hunter, R. and Marshall, J. 2002. Clinical safety and efficacy of Pyceze[®] (bronopol) for the treatment of saprolegniasis in salmonid eggs and fish. Aquaculture Canada 2002 Abstracts. [Online]. Available from : <http://www.Aquacultureassociation.ca>
- Ruangpan, L. and Kitao, T. 1992. Minimal inhibitory concentration of 19 chemotherapeutants against vibrio bacteria of shrimp, *Penaeus monodon*. In : Diseases in Asian Aquaculture I. M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 135-142.
- Ruangpan, L., Tabkaew,R., and Sangrungruang, K. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In : Diseases in Asian Aquaculture II. M.Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 141-149.
- Ruangsi, J., Wannades, M., Wanlem, S., Songnui, A., Arunrat, S., Tanmark, N., Pecharat, J. and Supamattaya, K. 2004. Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Songklanakarin J. Sci. Technol 26(1) : 43-54.
- Spoo, J.W., and Riviere, J.E. 1995. Chloramphenicol, Macrolides, Lincosamides, Fluoroquinolones, and Miscellaneous Antibiotics. In : Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Adams, H.R. (ed.) 7th ed. Iowa State University Press, Ames,Iowa. 820-821.
- Sudheesh, S.H., and Huai-Shu, X. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. Aquaculture 196: 37-46.
- Sung, H., Lin, S., Chen, W., Ting, Y., and Chao, W. 2003. Influence of Timsen[™] on *Vibrio* populations of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 219: 123-133.
- Tanasomwang, V. , and Ruangpan, L. 1995. Bacterial flora of larvae of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: Diseases in Asian Aquaculture II. M.Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 151-162.

- Tendencia, E.A., and de la Peña, L.D. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture 195: 193-204.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). 2001. Committee for Veterinary Medicinal Products “Bronopol” summary report. [Online]. Available from :[http:// www. eudra.org/emea.html](http://www.eudra.org/emea.html)
- Tonguthai, K., and Chanratchakool, P. 1992. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture I. M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 555-565.
- Torkildsen, L., Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T. and Bergh, Ø. 2000. Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in sea water of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae. Aquaculture 185 : 1-12
- Treece, G.D., and Yates, M.E. 1990. Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae. Marine Advisory Service, Sea Grant College Program, Texas A&M University. 10-18.
- Wachsmuth, L.K., Morris, G.K., and Feeley, J.C. 1980. *Vibrio*. In : Manual of Clinical Microbiology. Lennette, E.H., Balows. A., Hausler, W.J., and Truant, J.P. (ed) 3rded. American Society for Microbiology. Washiton D.C. 226-234.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 1 ผลการวิเคราะห์ค่า MIC range ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ด้วยโปรแกรม WHONET

JMN
Organism = All organisms

Page 1
05-;.Ā.-2547 23:26

Data files = w1103tha.pyz

Code	Antibiotic name	Breakpoints	Num.	%R	%I	%S	%?	MIC50	MIC90	Geom.Mean
X_1_NM	bronopol		105	0	0	0	100	8	16	9.817
X_2_NM	bronopol in sea water		105	0	0	0	100	8	16	9.25
OXY_NM	Oxytetracycline		103	0	0	0	100	2	64	2.935
X_3_NM	oxytetracycline in sea water		99	0	0	0	100	64	1024	101.594
ENR_NM	Enrofloxacin		101	0	0	0	100	.5	4	1.014
X_4_NM	enrofloxacin in sea water		101	0	0	0	100	16	256	24.318

Number of isolates = 109

Code	MIC Range
X_1_NM	2 - 32
X_2_NM	4 - 32
OXY_NM	.5 - 512
X_3_NM	8 - 1024
ENR_NM	.5 - 16
X_4_NM	.5 - 512

Number of isolates = 109

Code	Num.	<.002	.002	.003	.004	.006	.008	.012	.016	.023	.032	.047	.064	.094	.125	.19	.25	.38	.5	.75	1	1.5	
X_1_NM	105																						
X_2_NM	105																						
OXY_NM	103																						46
X_3_NM	99																						
ENR_NM	101																						62
X_4_NM	101																						2

Number of isolates = 109

Code	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	120	192	256	384	512	768	1024	1536	2048	>2048	
X_1_NM	1		21		29		47		3														
X_2_NM			14		51		33		1														
OXY_NM	16		9		2		2		12		5		6		1		2						
X_3_NM					4		12		17		26		6		6		11		17				
ENR_NM	12		17		5		1																
X_4_NM	3		4		25		26		6		13		9		11		2						

Number of isolates = 109

ภาคผนวก 2 การจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

Reference : No1

Date : 07/09/2004

VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip : API 20 E

V4.0

Read on: 07/09/2004

Profile : 4 3 4 7 1 0 7

ONPG- ADH - LDC + ODC + CIT + H2S - URE - TDA ▼ IND + VP + GEL +
 GLU + MAN + INO - SOR - RHA - SAC - MEL - AMY + ARA + OX +

----- Significant taxa -----	% Id.	--- T ---	Tests against -----
V.parahaemolyticus	99.8	0.53	2
Next choice			
Vibrio alginolyticus	0.1	0.03	4

V.parahaemolyticus : 2 test(s) against

VOGES PROSKAUER	(VP)	1 %	AMYGDALINE	(AMY)	12 %
b					

Next choice

Vibrio alginolyticus : 4 test(s) against

VOGES PROSKAUER	(VP)	10 %	SACCHAROSE	(SAC)	100 %
AMYGDALINE	(AMY)	10 %	L-ARABINOSE	(ARA)	1 %

ภาคผนวก 3 แสดงการวิเคราะห์หาค่า LC₅₀ ในลูกกุ้งระยะ protozoell เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Probit analysis

Probit

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

8 unweighted cases accepted.
2 cases rejected because of missing data.
2 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 10 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
BRONOPOL	,44117	,02650	16,64876

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1,27898	,09024	-14,17236

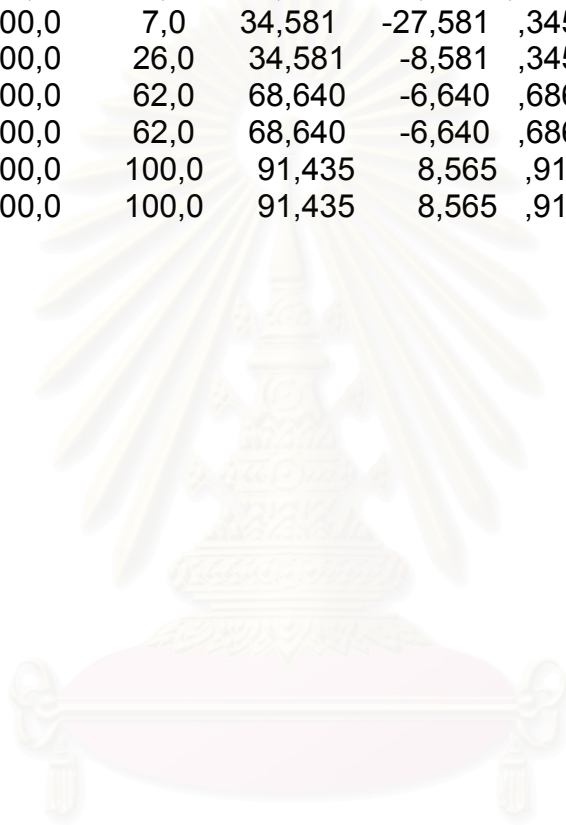
Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 93,339 DF = 6 P = ,000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

	Number of BRONOPOL	Observed Subjects	Expected Responses	Expected Responses	Residual	Prob
,00	100,0	25,0	10,045	14,955	,10045	
,00	100,0	19,0	10,045	8,955	,10045	
2,00	100,0	7,0	34,581	-27,581	,34581	
2,00	100,0	26,0	34,581	-8,581	,34581	
4,00	100,0	62,0	68,640	-6,640	,68640	
4,00	100,0	62,0	68,640	-6,640	,68640	
6,00	100,0	100,0	91,435	8,565	,91435	
6,00	100,0	100,0	91,435	8,565	,91435	

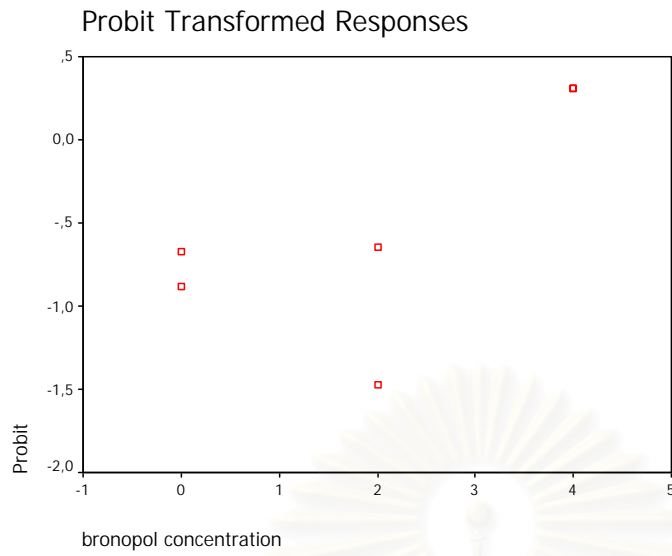


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective BRONOPOL

Prob	95% Confidence Limits		
	BRONOPOL	Lower	Upper
,01	-2,37408	-9,69471	-,27012
,02	-1,75618	-8,25203	,14844
,03	-1,36413	-7,34055	,41786
,04	-1,06922	-6,65743	,62309
,05	-,82933	-6,10373	,79199
,06	-,62514	-5,63409	,93740
,07	-,44611	-5,22374	1,06633
,08	-,28581	-4,85763	1,18308
,09	-,14002	-4,52587	1,29046
,10	-,00582	-4,22163	1,39044
,15	,54979	-2,97664	1,81908
,20	,99137	-2,01067	2,18324
,25	1,37021	-1,20695	2,52066
,30	1,71042	-,51330	2,85179
,35	2,02568	,09718	3,19092
,40	2,32482	,63956	3,54963
,45	2,61425	1,12328	3,93771
,50	2,89909	1,55584	4,36314
,55	3,18393	1,94491	4,83206
,60	3,47336	2,29924	5,34955
,65	3,77250	2,62854	5,92133
,70	4,08776	2,94323	6,55625
,75	4,42797	3,25462	7,26964
,80	4,80681	3,57629	8,08911
,85	5,24839	3,92783	9,06771
,90	5,80400	4,34612	10,32303
,91	5,93820	4,44423	10,62915
,92	6,08399	4,54979	10,96273
,93	6,24429	4,66474	11,33063
,94	6,42332	4,79191	11,74274
,95	6,62751	4,93556	12,21414
,96	6,86740	5,10269	12,76962
,97	7,16232	5,30607	13,45458
,98	7,55436	5,57351	14,36804
,99	8,17226	5,98973	15,81307



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 4 แสดงการวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ในลูกกุ้งระยะ postlarva 6 เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Probit analysis

Probit

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

14 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
2 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 13 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
BRONOPOL	,09988	,00639	15,62452

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1,64231	,10431	-15,74403

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 27,433 DF = 12 P = ,007

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

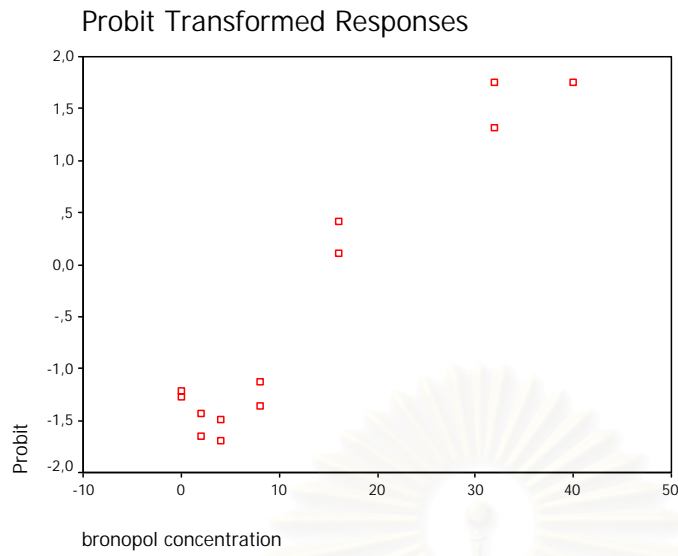
BRONOPOL	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
,00	45,0	5,0	2,262	2,738	,05026
,00	39,0	4,0	1,960	2,040	,05026
2,00	41,0	2,0	3,058	-1,058	,07457
2,00	39,0	3,0	2,908	,092	,07457
4,00	44,0	3,0	4,707	-1,707	,10697
4,00	45,0	2,0	4,814	-2,814	,10697
8,00	46,0	4,0	9,179	-5,179	,19954
8,00	46,0	6,0	9,179	-3,179	,19954
16,00	50,0	33,0	24,118	8,882	,48236
16,00	48,0	26,0	23,153	2,847	,48236
32,00	43,0	39,0	40,415	-1,415	,93989
32,00	50,0	48,0	46,994	1,006	,93989
40,00	50,0	48,0	49,534	-1,534	,99069
40,00	50,0	50,0	49,534	,466	,99069

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective BRONOPOL

Prob	95% Confidence Limits		
	BRONOPOL	Lower	Upper
,01	-6,84869	-12,54803	-2,92464
,02	-4,11941	-9,17477	-,58537
,03	-2,38776	-7,04699	,91126
,04	-1,08511	-5,45451	2,04529
,05	-,02551	-4,16538	2,97395
,06	,87638	-3,07323	3,76950
,07	1,66716	-2,12003	4,47144
,08	2,37521	-1,27046	5,10385
,09	3,01915	-,50135	5,68255
,10	3,61190	,20334	6,21852
,15	6,06605	3,08126	8,47724
,20	8,01653	5,31177	10,32916
,25	9,68986	7,17515	11,96815
,30	11,19257	8,80304	13,48550
,35	12,58505	10,27023	14,93285
,40	13,90638	11,62518	16,34350
,45	15,18478	12,90276	17,74168
,50	16,44291	14,13034	19,14742
,55	17,70105	15,33145	20,57965
,60	18,97945	16,52820	22,05865
,65	20,30078	17,74369	23,60877
,70	21,69326	19,00484	25,26215
,75	23,19597	20,34709	27,06514
,80	24,86930	21,82328	29,09132
,85	26,81978	23,52463	31,47240
,90	29,27392	25,64287	34,49080
,91	29,86667	26,15149	35,22284
,92	30,51062	26,70292	36,01922
,93	31,21867	27,30799	36,89613
,94	32,00945	27,98234	37,87692
,95	32,91134	28,74977	38,99718
,96	33,97094	29,64938	40,31537
,97	35,27359	30,75268	41,93858
,98	37,00523	32,21539	44,10028
,99	39,73452	34,51336	47,51484



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 5 แสดงการวิเคราะห์ค่า LC₅₀ ในลูกกุ้งระยะ postlarva 18 เมื่อแช่ bronopol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Probit analysis

Probit

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

7 unweighted cases accepted.
0 cases rejected because of missing data.
1 case is in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 13 iterations.
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
BRONOPOL	.03216	.00189	17.01634

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.97290	.09906	-19.91644

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 25.198 DF = 5 P = .000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

BRONOPOL	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	132.0	.0	3.201	-3.201	.02425
5.00	141.0	.0	4.933	-4.933	.03499
15.00	129.0	5.0	8.778	-3.778	.06805
30.00	131.0	26.0	20.529	5.471	.15671
40.00	140.0	42.0	34.470	7.530	.24621
50.00	129.0	59.0	46.132	12.868	.35761
100.00	143.0	119.0	127.714	-8.714	.89310



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective BRONOPOL

Prob	95% Confidence Limits		
	BRONOPOL	Lower	Upper
.01	-10.99013	-41.55768	5.30612
.02	-2.51402	-29.11315	12.01683
.03	2.86379	-21.28185	16.33891
.04	6.90931	-15.43464	19.63421
.05	10.20003	-10.71300	22.34931
.06	13.00095	-6.72345	24.68958
.07	15.45681	-3.25128	26.76743
.08	17.65574	-.16593	28.65146
.09	19.65557	2.61822	30.38676
.10	21.49643	5.16045	32.00469
.15	29.11805	15.42630	38.96304
.20	35.17547	23.19710	44.88147
.25	40.37221	29.51064	50.31209
.30	45.03903	34.86416	55.50517
.35	49.36354	39.55060	60.59174
.40	53.46708	43.76644	65.64952
.45	57.43730	47.65440	70.73390
.50	61.34457	51.32421	75.89418
.55	65.25184	54.86523	81.18324
.60	69.22206	58.35594	86.66488
.65	73.32560	61.87252	92.42192
.70	77.65011	65.49856	98.56888
.75	82.31693	69.33922	105.27483
.80	87.51366	73.54719	112.81101
.85	93.57109	78.38219	121.66524
.90	101.19271	84.38655	132.88508
.91	103.03356	85.82636	135.60543
.92	105.03340	87.38663	138.56461
.93	107.23233	89.09795	141.82268
.94	109.68819	91.00436	145.46629
.95	112.48911	93.17296	149.62751
.96	115.77982	95.71385	154.52335
.97	119.82535	98.82852	160.55120
.98	125.20316	102.95563	168.57747
.99	133.67926	109.43525	181.25308

ภาคผนวก 6 ผลการตรวจวัดค่า pH ในน้ำทะเลด้วย pH meter เมื่อใส่ bronopol ในน้ำทะเล ให้
ได้ความเข้มข้นของ bronopol เท่ากับ 20 µg/ml 50 µg/ml และ 200 µg/ml

ตัวอย่างน้ำ	ค่า pH วัดครั้งที่ 1	ค่า pH วัดครั้งที่ 2	ค่า pH เฉลี่ย
น้ำทะเลความเค็ม 30 ppt	8.39	8.48	8.435
bronopol 20 µg/ml	8.35	8.39	8.370
bronopol 50 µg/ml	8.31	8.32	8.315
bronopol 200 µg/ml	7.92	7.92	7.92



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 7 ผลการตรวจคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองด้วยชุดทดสอบ

	pH	ammonia (ppm)	nitrite (ppm)	alkalinity (ppm of CaCO ₃)	อุณหภูมิ (°C)
การศึกษาประสิทธิภาพของ bronopol ในการควบคุมเชื้อไวรัสในลูกกุ้ง postlarva 15					
กลุ่มควบคุม (1)	8	0.0	0.0	110	28
กลุ่มควบคุม (2)	8	0.0	0.0	120	28
bronopol 8 µg/ml (1)	8	0.25	0.0	110	28
bronopol 8 µg/ml (2)	8	0.0	0.0	100	28
กลุ่มใส่เชื้อ Vibrio (1)	8	0.25	0.05	110	28
กลุ่มใส่เชื้อ Vibrio (2)	8	0.0	0.05	130	28
กลุ่ม Vibrio + bronopol (1)	8	0.0	0.05	120	28
กลุ่ม Vibrio + bronopol (2)	8	0.25	0	110	28
การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อกุ้งกุลาดำระยะ protozoa					
กลุ่มควบคุม	8.6	0.25	0.1	120	28
bronopol 2 µg/ml	8.6	0.25	0.25	130	28
bronopol 4 µg/ml	8.6	0.25	0.1	110	28
bronopol 6 µg/ml	8.6	0.25	0.1	130	28
bronopol 8 µg/ml	8.6	0.25	0.1	120	28
การศึกษาพิษเฉียบพลันของ bronopol ต่อกุ้งกุลาดำระยะ postlarva 6					
กลุ่มควบคุม	8.3	0.25	0.1	150	27.5
bronopol 2 µg/ml	8.3	0.25	0.1	150	27.5
bronopol 4 µg/ml	8.3	0.25	0.1	150	27.5
bronopol 8 µg/ml	8.3	0.25	0.1	150	27.5
bronopol 16 µg/ml	8.3	0.25	0.1	150	27.5
bronopol 32 µg/ml	8.3	0.25	0.25	160	27.5
bronopol 40 µg/ml	8.3	0.25	0.25	160	27.5
การศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนระยะของกุ้งกุลาดำระยะ protozoa					
กลุ่มควบคุม	8.3	0	0.25	150	30
bronopol 2 µg/ml	8.6	0.25	0.25	150	30
bronopol 4 µg/ml	8.3	0.25	0.25	150	30
การศึกษาผลของ bronopol ต่อการเปลี่ยนระยะของกุ้งกุลาดำระยะ mysis					
กลุ่มควบคุม	8.3	0.5	0.25	170	29
bronopol 2 µg/ml	8.3	0.5	0.1	160	29
bronopol 3 µg/ml	8.3	0.5	0.25	170	29
bronopol 4 µg/ml	8.3	0.25	0.25	170	29
bronopol 5 µg/ml	8.3	0.25	0.1	170	29
bronopol 6 µg/ml	8.3	0.5	0.25	160	29

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณณานิ ลิ้มปานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2521 ที่กรุงเทพฯ
จบการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา พ.ศ. 2544 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาสัตวศาสตร์ สาขาโรค
สัตว์น้ำ ปีการศึกษา 2545



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย