บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในปูทะเล (*Scylla* sp.)

ภัทราวดี ศรีมีเทียน[1,#] จิติมา สุวรรณมาลา[2] และสุริยัน ธัญกิจจานุกิจ[3]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ อ. เมือง จ. นราธิวาส 96000

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. เมือง จ. ปัตตานี 96000

[3]ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ: การศึกษาการก่อให้เกิดโรคในปูทะเล (*Scylla* sp.) ที่ได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการนำปูทะเลสุขภาพดีมาทำการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปริมาณความเข้มข้น 10^1-10^{10} CFU (Colony Forming Unit) ต่อมิลลิลิตรหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ปริมาณความเข้มข้น 10^8-10^{10} พบว่าปูมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 1 วัน และความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรีย 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูมีอัตราการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2 วัน ส่วนที่ความเข้มข้นเชื้อปริมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูมีอัตราการตายสะสม 22.22 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 30 วัน นอกจากนี้ที่ปริมาณความเข้มข้น 10^1-10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูไม่มีอัตราการตายสะสมเกิดขึ้นซึ่งการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดความรุนแรงถึงขั้นทำให้ปูทะเลตายได้อย่างรวดเร็ว

คำสำคัญ: ความรุนแรงของเชื้อ ปูทะเล วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2560. 12(1): 19-27.

E-mail address: srimeetian1212@gmail.com

Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* in Mud Crab (*Scylla* sp.)

Pattarawadee Srimeetian[1,#], Jitima Suwanmala[2] and Suriyan Tunkijjanukij[3]

[1]Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University, Narathiwas 96000, Thailand
[2]Faculty of Sciences and Technology, Prince of Songkla University, Pattani 94000, Thailand
[3]Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: The study on virulence of *Vibrio parahaemolyticus* was challenged by experimental study against mud crab (*Scylla* sp.). The healthy mud crabs were injected with *V. parahaemolyticus* at 10^1-10^{10} CFU (Colony Forming Unit) per milliliter (ml). After injected for 1 day, the cumulative mortality of crabs was 100% at 10^8-10^{10} CFU per ml of bacteria. After injected for 2 days, the cumulative mortality was 100% at 10^7 CFU per ml of *V. parahaemolyticus*. During 30 days, the cumulative mortality was 22.22% at 10^6 CFU per ml of bacteria. Furthermore, during 30 days, the cumulative mortality was 0.00% at 10^5-10^1 CFU per ml of *V. parahaemolyticus*. This study suggesting that the virulence of *V. parahaemolyticus* causes for rapid mass mortality of mud crab.

Keywords: Virulence, Mud crab, *Vibrio parahaemolyticus*

[#]Corresponding author
E-mail address: srimeetian1212@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2017. 12(1): 19-27.

บทนำ

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาสูง คลอเรสเตอรอลต่ำ และอุดมไปด้วยแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม ไคติน ฟอสฟอรัส สังกะสี เหล็ก ไอโอดีน และแมกนีเซียม จึงเป็นที่นิยมบริโภคทั้งชาวไทยและต่างประเทศ การเพาะเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยมีมานานกว่า 20 ปี ในหลายจังหวัด เช่น ตราด จันทบุรี สมุทรสงคราม ชุมพร ระนอง ตรัง เป็นต้น ซึ่งปูที่จำหน่ายในท้องตลาดมี 3 รูปแบบด้วยกัน คือ ปูเนื้อ (ปูขุน) ปูไข่ และปูนิ่ม โดยเกษตรกรนิยมเลี้ยงปูเนื้อและปูไข่ในบ่อหรือเลี้ยงปูนิ่มในกล่องพลาสติกลอยน้ำ โดยปูหนึ่งตัวต่อหนึ่งกล่องพลาสติก เพื่อสะดวกต่อการเก็บเกี่ยวและป้องกันการทำร้ายกันเอง (Srimeetian and Tunkijjanukij, 2016) เนื่องจากปูทะเลมีนิสัยก้าวร้าวและดุร้ายมาก

ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงปูทะเล เช่น พันธุ์ปู อาการผิดปกติและโรค เป็นต้น ซึ่งโรคในการเพาะเลี้ยงปูทะเลพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อจุลชีพต่างๆ เช่น ไวรัส โปรโตซัว และแบคทีเรีย (Srimeetian, 2010) เป็นต้น โดย Vogan and Rowley (2002) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม

Vibrio ทำให้โครงร่างของปูชนิด *Cancer pagurus* มีลักษณะเป็นจุดสีดำทั่วร่างกาย และกระดองเปราะบาง เรียกโรคดังกล่าวว่า shell disease หรือ black spot (Ayres and Edwards, 1982) นอกจากนี้ (Laoprasert *et al*., 2010) ยังรายงานพบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ในปูระยะวัยอ่อนชนิด *Scylla* sp. เช่นเดียวกับ Laoprasert and Laoprasert (2010) ที่รายงานว่า ปูวัยอ่อนในโรงอนุบาลตั้งแต่เริ่มฟักออกจากไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (nauplius) ระยะที่ 2 (zoea) ระยะที่ 3 (magalopa) และตัวเต็มวัย พบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. ซึ่งเชื้อโรคที่พบเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลให้ลูกปูมีอัตราการรอดตายต่ำ โดยชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. ที่ก่อโรคในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (กุ้ง-ปู) ได้แก่ *V. harveyi, V. carchariae, V. fluvalis, V. mefiteranci, V. splendidus, V. metschnikovii, V. cholera, V. oventalis* และ *V. parahaemolyticus* เป็นต้น Intanakom (2010) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของอาการอกท้องแดงในปูชนิด *Scylla* sp. ซึ่งเมื่อปูมีอาการดังกล่าวจะมีลักษณะเป็นอัมพาตและตายในที่สุด โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะรูปแท่ง เจริญเติบโตได้ในน้ำทะเลและน้ำกร่อยมีมากตามชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งฝั่งทะเลไทย (Somjetlertcharoen, 1993) ซึ่ง *V. parahaemolyticus* จะฉวยโอกาสในขณะที่สัตว์น้ำอยู่ในสภาวะเครียดหรือภูมิคุ้มกันลดต่ำลง โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างหนาแน่นหรือเลี้ยงในที่กักขัง นอกจากนี้การสะสมของเสียพวกสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ก้นบ่อก็เป็นการเพิ่มโอกาสให้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายปูได้ง่ายด้วยเช่นกัน โดย Ruangpan *et al*. (1997) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ นอกจากนี้ Somjetlertcharoen (1993) ยังรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในตับของกุ้งกุลาดำที่มีอาการป่วย ขณะที่ Chaweepack (2007) รายงานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของกุ้งแชบ๊วยบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออกส่วน Sudheesh and Xu (2001) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุการตายของกุ้งชนิด *P. monodon* สำหรับ Davis and Sizemore (1982) รายงานว่าปูชนิด *Callinectes sapidus* มีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงที่สุดในฤดูร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วงซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะทำให้ปูป่วยและตายในที่สุด นอกจากนี้ Plainpun (2014) ยังพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุการตายของปูทะเลชนิด *Scylla* sp. อีกด้วย

โดยจะเห็นได้ว่า *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนซึ่งเป็นปัญหาที่พบในการเลี้ยงสัตว์น้ำกลุ่มดังกล่าว ซึ่งปัจจุบันการรายงานเกี่ยวกับความรุนแรงของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในปูทะเลยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปูทะเลที่ติดเชื้อปริมาณความเข้มข้นในระดับต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงระดับความรุนแรงของแบคทีเรียดังกล่าวต่อปูทะเล และศึกษาลักษณะอาการ พฤติกรรมของปูทะเลหลังการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วย ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปูทะเล เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาหาวิธีการป้องและรักษาในปูทะเลที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างปูทะเล น้ำหนัก 304-400 กรัม นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาส ที่ความเค็มน้ำ 25 ส่วนในพันส่วน มีการให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลา 14 วัน เพื่อปรับสภาพปู โดยระยะเวลา 14 วัน เป็นการตรวจสอบว่าปูจะไม่มีอาการเครียดและไม่ตาย ซึ่งจะยังคงเหลือไว้เฉพาะปูที่สุขภาพแข็งแรงเท่านั้น เพื่อตรวจสอบก่อนทำการทดลองว่าปูตัวอย่างจะไม่มีการตายเกิดขึ้นจากสาเหตุอื่น ก่อนที่จะนำปูตัวอย่างมาศึกษาการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปูทะเล โดยมีการให้ปลาสดเป็นอาหารวันละ 1 ครั้ง ซึ่งปลาสดก่อนนำไปให้เป็นอาหารปูนั้นจะนำมาแช่ใน 1 ppm (part per million) คลอรีน (Calcium hypochlorite) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย (Direkbusarakom, and Rojanapitayakul, 1998) โดยหลังจากนั้นก่อนนำปูทะเลไปทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรียงดให้อาหารปูเป็นเวลา 1 วัน

การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย V. parahaemolyticus

นำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ลงเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) ที่เติม 3 เปอร์เซ็นต์ NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร tryptic soy broth (TSB) ที่เตรียมขึ้นจาก 3 เปอร์เซ็นต์ NaCl แล้วเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างตะกอนของแบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl จำนวน 3 ครั้ง แล้วเจือจางตะกอนของแบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ให้ได้สารแขวนลอยของแบคทีเรียปริมาณความเข้มข้น 6.1×10^{1}, 5.7×10^{2}, 7.0×10^{3}, 5.0×10^{4}, 1.97×10^{5}, 2.8×10^{6}, 5.7×10^{7}, 4.6×10^{8}, 3.69×10^{9}และ 7.88×10^{10} colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียวัดจากค่า optical density (O.D.) ที่ 600 นาโนเมตร (Intanakom, 2010)

การเหนี่ยวนำสารแขวนลอยเชื้อ V. parahaemolyticus โดยวิธีการฉีดเข้าไปในปูทะเล

ทำการเหนี่ยวนำด้วยวิธีการฉีดแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าไปในบริเวณขาว่ายน้ำของปูทะเล (Figure 1) (Srimeetian, 2010) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 11 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ปูทะเลที่ฉีดด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl (กลุ่มควบคุม) และชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 6.1×10^{1} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 5.7×10^{2} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 4 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 7.0×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 5 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 5.0×10^{4} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 6 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 1.97×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 7 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 2.8×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 8 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 5.7×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 9 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 4.6×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลอง

ที่ 10 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 3.69×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่ 11 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย 7.88×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแต่ละชุดการทดลองทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ปูทดลอง 3 ตัว หลังจากนั้นทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของปูทะเลทุกวันเป็นเวลา 30 วัน

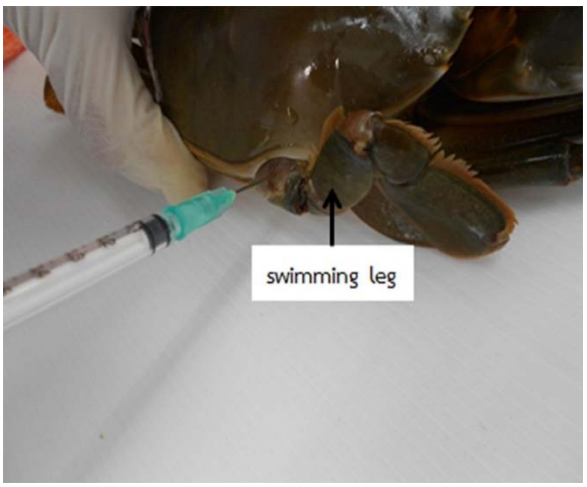

Figure 1 The injection of *Vibrio parahaemolyticus* into swimming leg of mud crab

การสังเกตลักษณะ พฤติกรรม และการคำนวณอัตราการตายสะสมของปูทะเลหลังการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ V. parahaemolyticus

สังเกตลักษณะอาการ พฤติกรรม และอัตราการตายของปูทะเล ระหว่างการทดลอง และทำการจดบันทึกลักษณะอาการ พฤติกรรมของปูทดลอง นอกจากนี้ยังทำการบันทึกจำนวนปูทะเลที่ตายในระยะเวลา 30 วัน แล้วนำข้อมูลจำนวนปูทะเลที่ตายหลังการทดลองมาคำนวณหาอัตราการตายสะสมของปูทะเลในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยใช้สูตรดังนี้ (Promchairat *et al*., 2013)

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปูทะเลได้รับเท่ากับ 10^{10}-10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูทดลองตายทั้งหมดภายใน 1 วัน ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าภายใน 1 วัน ทำให้ปูทดลองตาย 8 ตัว ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 88.88 เปอร์เซ็นต์ และภายใน 2 วัน พบว่าปูทดลองตายทั้งหมด ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้ปูทดลองตาย 1 ตัว ภายใน 1 วัน ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายสะสมเท่ากับ 11.11 เปอร์เซ็นต์ และภายในเวลา 2 วัน พบว่าปูทดลองมีการตายเพิ่มขึ้นอีก 1 ตัว ซึ่งคิดเป็นอัตราการตายเท่ากับ 22.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจนกระทั่งถึงวันที่ 30 ของการทดลองพบว่าไม่มีการตายของปูทะเลเกิดขึ้นอีก นอกจากนี้ปูทะเลที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียปริมาณเท่ากับ 10^5-10^1 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูทดลองไม่มีอัตราการตายสะสมภายในเวลา 30 วัน เนื่องจากเมื่อปูได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่พบการตายของปูทะเล ซึ่งเหมือนกันกับกลุ่มควบคุมที่ไม่พบการตายของปูทะเลเช่นกัน

ลักษณะอาการของปูทะเลที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีดังนี้ คือ อาการขั้นแรกพบว่าปูจะไม่กินอาหาร มีการเคลื่อนที่แต่ไม่รวดเร็วปราดเปรียว ใช้ก้ามในการป้องกันตนเอง ดุร้าย ส่วนอาการขั้นที่ 2 พบว่า ปูจะเก็บก้ามบ้าง ชูก้ามบ้าง เมื่อใช้สิ่ง

$$\text{อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนปูทะเลที่ตายสะสมในแต่ละระยะเวลา (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปูทะเลเริ่มต้นการทดลอง}}$$

เร้ากระตุ้นก็จะชูก้ามในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า การเคลื่อนที่เริ่มจะไม่คล่องแคล่วไม่รวดเร็ว ขณะที่อาการขั้นที่ 3 พบว่า ปูเก็บพับก้ามไว้ใต้ลำตัวตลอดเวลา ไม่ชูก้ามเมื่อมีสิ่งกระตุ้น การเคลื่อนที่เริ่มช้าหรือไม่ค่อยเคลื่อนที่ สำหรับอาการขั้นที่ 4 พบว่า ปูไม่เคลื่อนที่ กางก้ามออกวางไว้กับพื้น และอาการขั้นที่ 5 พบว่า ปูมีลักษณะเป็นอัมพาต แน่นิ่ง ก้ามแข็งไม่พับงอ ขาว่ายน้ำและขาเดินมีลักษณะอ่อนล้าไม่มีแรง สุดท้ายอาการขั้นที่ 6 พบว่า ปูจะแสดงอาการ คือคายพ่นเมือกหรือน้ำที่มีลักษณะสีดำอมน้ำตาลแก่ออกมาจากปาก หลังจากนั้นประมาณ 3 นาที ปูก็ตาย ส่วนปูทะเลที่มีชีวิตรอดหลังจากการได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีพฤติกรรมอาการคล้ายกับปูที่ได้รับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl คือ กินอาหารปกติ เคลื่อนที่คล่องแคล่วว่องไว กระโดด ใช้ก้ามตอบสนองต่อสิ่งเร้าได้อย่างรวดเร็ว และดุร้ายมาก

ตารางที่ 1 อัตราการตายสะสมของปูทะเล ที่ฉีดด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ปริมาณต่างๆ กัน ในระยะเวลา 30 วัน

ระดับความเข้มข้นของ *Vibrio parahaemolyticus* (CFU ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์)
0 (0.85% NaCl; กลุ่มควบคุม)	0.00±0.00
6.1×10^{1}	0.00±0.00
5.7×10^{2}	0.00±0.00
7.0×10^{3}	0.00±0.00
5.0×10^{4}	0.00±0.00
1.97×10^{5}	0.00±0.00
2.8×10^{6}	22.22±15.71
5.7×10^{7}	100.00±0.00
4.6×10^{8}	100.00±0.00
3.69×10^{9}	100.00±0.00
7.88×10^{10}	100.00±0.00

สรุปและวิจารณ์ผล

แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำเค็มทั่วไป โดยเฉพาะสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (Somjetlertcharoen, 1993) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปูที่ได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้นของ *V. Parahaemolyticus* เท่ากับ 10^{1}-10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร ไม่พบอัตราการตายของปูทะเล และที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูมีอัตราการตาย 22.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นของแบคทีเรีย 10^{7}-10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าปูอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Aguirre-Guzmán *et al*. (2001) ที่ทำการทดลองความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 10^{3}, 10^{5} และ 10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ในกุ้งชนิด *Litopenaeus vannamei* ผลการทดลองพบว่า กุ้งมีอัตราการตายสูงสุดที่ 10^{7}, 10^{5} และ 10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ Sudheesh and Xu (2001) รายงานว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้กุ้งชนิด *P. monodon* ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Aguirre-Guzmán *et al*. (2010) รายงานว่า *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ทำให้กุ้งชนิด *L. vannamei* มีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl) ที่ไม่พบอัตราการตายของกุ้งชนิดดังกล่าว จากการทดลองในครั้งนี้จะสังเกตได้ว่าปูทะเลมีการตายอย่างรวดเร็วหลังการติดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูง (10^{7}-10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร) อาจเนื่องมาจากที่ความเข้มข้นเชื้อดังกล่าวเป็นการเพิ่มความรุนแรงของ

แบคทีเรีย ซึ่งเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อเข้าไปอาศัยอยู่ในสัตว์น้ำจะผลิตเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีพิษสามารถทำลายเซลล์ของสัตว์น้ำได้ (Sudheesh and Xu, 2001) ดังนั้นเมื่อ *V. parahaemolyticus* มีระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นอาจเป็นการเพิ่มปริมาณ protease ด้วยเช่นกัน Aguirre-Guzmán *et al*. (2001) รายงานว่าเชื้อ *V.parahaemolyticus* สร้างความเสียหายทำลายเซลล์ heptopencreas ของกุ้งชนิด *L. vannamei* ซึ่งทำให้ heptopencreas ไม่สามารถทำงานได้ส่งผลให้กุ้งตายในที่สุด นอกจากนี้การทดลองในครั้งนี้ยังพบว่า ก่อนตายปูทะเลจะแสดงลักษณะอาการคือเป็นอัมพาต ไม่สามารถเคลื่อนที่หรือเคลื่อนไหวได้และมีการพ่นเมือกสีดำออกมา ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Costa-Ramosand Rowley (2004) ที่รายงานว่าปูชนิด *Cancer pagurus* เมื่อได้รับเชื้อ *Pseudoalteromonas atlantica* ปูจะมีลักษณะอาการเป็นอัมพาตหลังจากนั้นปูจะตายลงในที่สุด

จากการศึกษาการก่อให้เกิดโรคของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีการฉีดเชื้อเข้าในปูทะเลทำให้ทราบถึงระดับความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อปูทะเล โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียสูงมีผลทำให้ปูมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นอาจนำข้อมูลการวิจัยในครั้งนี้ไปใช้ในการแนะนำเกษตรกรเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงปูทะเล ซึ่งอาจโดยการสังเกตลักษณะอาการของปูที่อาจมีการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในฟาร์มเลี้ยงปูทะเล หรืออาจทำการตรวจเช็คเชื้อแบคทีเรียจากน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหรือจากปูทะเลโดยตรง นอกจากนี้จากผลการทดลองในครั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปูทะเลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปูทะเลหลังการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว และควรมีการศึกษาการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับปูทะเลได้อันจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในปูทะเลต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Juárez, R. and Ascencio, F. 2001. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 215-219.

Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, G. J., Perez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T. and Cruz-Hernández, I. N. 2010. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 41(3): 464-470.

Ayres, P.A. and Edwards, E. 1982. Notes on the distribution of black spot shell disease in crustacean fisheries. *Chem. Ecol*. 1: 125-130.

Chaweepack, T., Ruangpan, L. and Nuphin, V. 2007. Parasites and vibrio flora of wild broodstock banana shrimp (*Penaeus merguiensis*) from eastern gulf of Thailand. Technical paper. Coastal

Fisheries Research and Development Bureau. Chanthaburi Coastal Fisheries Research and Development Center; Department of Fisheries, Chanthaburi (Thailand). (in Thai)

Costa-Ramos, C. and Rowley, A. F. 2004. Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus. Appl. Environ. Microbiol*. 70(2): 729-735.

Davis, W. J. and Sizemore, K. R.1982. Incidence of *Vibrio* species associated with Blue Crabs *Callinectes sapidus* collected from Galveston Bay, Texas. *Appl. Environ. Microbiol*. 43(5): 1092-1097.

Direkbusarakom, S. and Rojanapitayakul, S. 1998. Effect of chlorine (Calcium hypochlorite) in seawater and seawater with soil on *Vibrio harveyi*. Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference: Abstracts. (in Thai)

Intanakom, J. 2010. Study on morphological, bacterial identification and histology in mud crab (*Scylla* sp.) with red thoracic-abdominal syndrome. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Laoprasert, T. and Laoprasert, S. 2010. Diseases in mud crab, *Scylla* sp. Thai Fisheries Gazette (Thailand). 63: 265-267. (in Thai)

Laoprasert, T., Laoprasert, S., Soonthornwit, S. and Phonwari, N. 2010. Study on bacterial flora in mud crab (*Scylla* sp.). Thai Fisheries Gazette (Thailand). 63: 238-241. (in Thai)

Plainpun, N. 2014. Induction of red thoracic – abominal syndrome with bacteria isolated from mud crab (*Scylla* sp.). The thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Promchairat., J., Limsuwan, C. and Chuchird, N. 2013. Experimental exposure and evaluation of *Artemia* sp. to *Vibrio* sp. As possible vectors of pathogenic bacteria. Proceedings of 51st Kasetsart University Annual Conference: Veterinary Medicine, Fisheries. (in Thai)

Ruangpan, L., Tanasomwang, W. and Sangrungruang, K. 1997. Bacterial flora of intensively cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Science, Engineering, Environmental Management, Home Economics, Education and Economics. (in Thai)

Somjetlertcharoen, A. 1993. Study on Vibrio species and oxolinic acid residues from Penaeus monodon Fabricius in intensive culture ponds. The thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Srimeetian, P. 2010. Antioxidant and lipid peroxidation in molting cycle of mud crab (*Scylla serrata* Forskål 1775). The

thesis of Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)

Srimeetian, P., and Tunkijjanukij, S. 2016. Differential protein expression in haemolymph of first-stage red sternum mud crabs (*Scylla serrata*). *Thai J. Vet. Med*. 46(3): 401-407.

Sudheesh, P.S. and Xu, H.S. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*.196: 37-46.

Vogan, C.L. and Rowley, A.F. 2002. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. *Aquaculture*. 205: 237–252.