## การตรวจเอกสาร

### *อนุกรมวิธานของหอยเป๋าฮื้อ (Abalone)*

หอยเป๋าฮื้อจัดอยู่ใน Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Subclass Prosobranchia

Order Archaeogastropoda

Family Haliotidae

Genus *Haliotis*

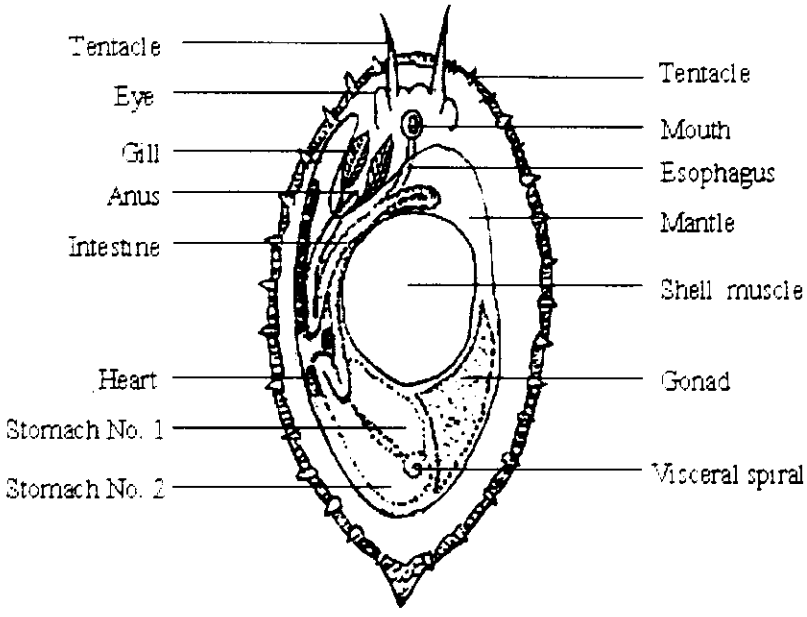
หอยเป๋าฮื้อทั้งหมดทั่วโลกจะมีเพียงสกุล (genus) เดียว คือ *Haliotis* (Linnaeus) แม้จะมีการแบ่งเป็นสกุลอื่นๆ ได้แก่ *Nordotis*. *Notohaliotis*. *Marinautis*. *Exohaliotis* และ *Schismotis* แต่ไม่เป็นที่ยอมรับของนักวิจัยระยะหลังและเห็นสมควรให้จัดอยู่ในสกุล *Haliotis* ทั้งหมดดังเดิม (สุชาติ และคณะ. 2538)

### *ชีววิทยาทั่วไปของหอยเป๋าฮื้อ*

ลักษณะหอยพวกนี้จะมีเปลือกแบนและมีรูปร่างยาวรี ปากเปลือกกว้าง รูปร่างเป็น ear shape ซึ่งใช้ปกคลุมเพื่อปกป้องเนื้อตัวหอย และมีรูเรียงต่อกันหนึ่งแถวเพื่อให้น้ำและของเสียผ่านออกไป ไม่มีโอเปอร์คิวลัม (operculum) พบในทะเลตั้งแต่บริเวณน้ำตื้นชายฝั่งที่มีน้ำขึ้นน้ำลงไปจนถึงบริเวณที่มีน้ำลึกประมาณ 20 เมตร แพร่กระจายมากในทะเลแถบประเทศจีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และนิวซีแลนด์ เป็นต้น (สุชาติ และคณะ. 2538) ส่วนหอยเป๋าฮื้อที่พบในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ *H. asinina*. *H ovina* และ *H. varia* (สิริ และคณะ. 2529)

สำหรับหอยฝาเดียวในออร์เดอร์อาร์คีโอแกสโตรโปดา (Archaeogastropoda) จะมีเหงือกแบบแอสปิโดแบรนค์ (aspidobranch) ซึ่งมีลักษณะบางอย่างที่ทำให้เกิดการอุดตันของเศษตะกอนที่ด้านบนของช่องผนังลำตัว (mantle cavity) เหนือเหงือกได้ง่าย เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการหายใจลดลง หอยพวกนี้จึงถูกจำกัดทางนิเวศวิทยาให้อยู่ในบริเวณน้ำสะอาดเหนือพื้นแข็ง เช่น หิน และไม่สามารถอยู่ในบริเวณพื้นทรายหรือชายฝั่งที่เป็นโคลนหรือปกคลุมด้วยตะกอนได้ อาหารของหอยเป๋าฮื้อเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่เกาะตามโขดหินหรือสาหร่ายขนาดใหญ่ (macroalgae) ขึ้นอยู่กับว่ามีสาหร่ายชนิดใดแพร่กระจายอยู่มากในบริเวณนั้น และค่อนข้างชอบสาหร่ายจำเพาะชนิด แต่หอยเป๋าฮื้อวัยอ่อนยังไม่กินสาหร่ายขนาดใหญ่ โดยกินพวกไดอะตอมที่เกาะติดตามโขดหิน (sessile diatom) และโดยมากหากินในเวลากลางคืน ซึ่งลักษณะการกินอาหารเป็นแบบแทะเล็ม (grazing) เมื่ออาหารถูกกินเข้าไป ปากทำหน้าที่บดอาหารให้เป็นชิ้นเล็กลงโดยใช้ซี่ฟันซึ่งเรียงอยู่

เป็นแถว (radula teeth) แล้วผ่านไปยังหลอดอาหาร (esophagus) ไปยังถุงเก็บอาหาร (crop) ไปยังกระเพาะอาหาร (stomach) ไปยังสไปรอล ซีคัม (spiral ceacum) และลำไส้ (intestine) ส่วนที่ไม่ต้องการจะขับออกทางทวาร (anus) สำหรับอวัยวะย่อยอาหาร (digestive gland หรือ liver) เป็นรูปกรวยอยู่ทางด้านขวาของกล้ามเนื้อยึดเปลือก (shell muscle) และถูกหุ้มโดยอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) สำหรับของเสียและเซลล์สืบพันธุ์จะถูกปล่อยออกมาทางช่องเปิดบริเวณเหงือก (branchial หรือ gill chamber) ที่อยู่ทางด้านซ้ายของกล้ามเนื้อยึดเปลือก ซึ่งเหงือกจะมี 1 คู่ ขนานกัน ขณะหายใจกระแสน้ำจะพัดเข้าทางปลายด้านหน้า (anterior end) ของเปลือก แล้วไหลผ่านซี่เหงือก (gill filaments) ขณะไหลออกจะชะเอาของเสียแล้วออกทางรูเปิดของเปลือก ส่วนหนวด (tentacle) ที่อยู่บนผนังลำตัว(mantle) ซึ่งมีอยู่หลายอันด้วยกันนั้น จะเป็นตัวคอยปัดเขี่ยพวกกรวดทรายและสิ่งที่ไม่ต้องการออกทางรูเปิด เมื่อพลิกดูใต้เปลือกจะพบกล้ามเนื้อเท้า (foot muscle) ซึ่งมีขนาดใหญ่ เท้านี้จะทำหน้าที่คืบคลานและมีแรงยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุแน่นมาก ส่วนหลัง (dorsal part) ของเท้ามีอีพิโปเดียม (epipodium) หุ้มอยู่ เรียงรายไปด้วยอวัยวะรับสัมผัส (sensory organs) เล็กๆ และหนวด ส่วนของกล้ามเนื้อเท้าที่อยู่ทางด้านหลังและยึดติดกับเปลือกเรียกว่า right shell muscle (สุชาติ และคณะ. 2538) กล้ามเนื้อส่วนนี้จะทำให้เกิดรอยขนาดใหญ่ที่เปลือกเมื่อเอาเนื้อออกหมดแล้ว (ภาพที่ 1)




ภาพที่ 1 แสดงอวัยวะต่าง ๆ ของหอยเป๋าฮื้อ

***การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ***

หอยเป๋าฮื้อที่พบในธรรมชาติทั่วโลกมีประมาณ 100 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate zone) แต่ที่นิยมเลี้ยงมีไม่เกิน 20 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดที่ค่อนข้างมีขนาดใหญ่และใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 4-5 ปี ประเทศที่มีการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเป็นอุตสาหกรรม ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก ชิลี จีน ไต้หวัน และเกาหลี เป็นต้น (ทรงชัย. 2543)

หอยเป๋าฮื้อที่นิยมเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

- หอยเป๋าฮื้อพันธุ์น้ำเย็น (temperate zone abalone)
- หอยเป๋าฮื้อพันธุ์น้ำอุ่น (tropical zone abalone)

ตารางที่ 1 ความแตกต่างของหอยเป๋าฮื้อ 2 ชนิด

| พันธุ์น้ำเย็น | พันธุ์น้ำอุ่น |
|---|---|
| อยู่ที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ | อยู่ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง |
| การเจริญเติบโตช้า | การเจริญเติบโตเร็วกว่า |
| ระยะเวลาการเลี้ยง 3-5 ปี | ระยะเวลาการเลี้ยง 1-2 ปี |
| ขนาดใหญ่ (200-500 กรัม) | ขนาดเล็ก (25-280 กรัม) |
| ไม่สามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี | สามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี |
| เปลือกใหญ่ เนื้อน้อย | มีทั้งเปลือกใหญ่และเปลือกเล็ก |

ที่มา: สิทธิศักดิ์. 2543

ตารางที่ 2 ชนิดหอยเป๋าฮื้อที่นิยมเลี้ยงในต่างประเทศ

| ประเทศ | ชนิดที่นิยมเลี้ยง |
|---|---|
| ญี่ปุ่น | *H. discus. H. discus hannai* |
| ไต้หวัน | *H. diversicolor supertexta* |
| | *H. diversicolor diversicolor* |
| สหรัฐอเมริกา | *H. rufescens. H. cracherodii* |
| | *H. sorenseni. H. fulgens* |
| เม็กซิโก | *H. fulgens. H. rufescens* |
| | *H. cracherodii* |
| อาฟริกาใต้ | *H. midue* |
| ออสเตรเลีย | *H. laevigata. H. ruber. H. roei* |

ที่มา : สิทธิศักดิ์. 2543

ส่วนหอยเป๋าฮื้อชนิดที่มีการส่งเสริมในประเทศไทย คือ *H. asinina* นั้น เป็นชนิดที่มีความพิเศษกว่าหอยเป๋าฮื้อพันธุ์อื่นๆ ในต่างประเทศ คือ มีน้ำหนักเนื้อต่อเปลือกสูงกว่ามาก (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบน้ำหนักเปลือก น้ำหนักเครื่องใน น้ำหนักที่เหลือของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* และหอยเป๋าฮื้อพันธุ์อื่นๆ ในต่างประเทศ

| ชนิด | น้ำหนักเปลือก (%) | น้ำหนักเครื่องใน (%) | น้ำหนักที่เหลือ(%) |
|---|---|---|---|
| *H. fulgens* | 38 | 22 | 40 |
| *H. ebragzia* | 47 | 18 | 35 |
| *H. discus* | 29 | 23 | 48 |
| *H. diversicolor supertexta* | 33 | 20 | 37 |
| *H. asinina* | 8 | 8 | 84 |

ที่มา : สิทธิศักดิ์. 2543

จะเห็นว่าน้ำหนักที่เหลือของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปรับประทาน มีปริมาณที่สูงกว่าหอยชนิดอื่นๆ มาก จึงเป็นชนิดที่ได้รับความสนใจในการที่จะพัฒนาการเพาะเลี้ยงหรือนำเข้าหอยเป๋าฮื้อชนิดนี้ในรูปของหอยเนื้อ ดังนั้นนับว่าประเทศไทยมีความได้เปรียบที่มีแหล่งพ่อแม่พันธุ์หอยชนิดนี้ และกำลังมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปสู่ความเป็นอุตสาหกรรม

***การเพาะและขยายพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ (H. asinina )***

หลังจากที่ได้รวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติมาเลี้ยงในบ่อคอนกรีตซึ่งจะมีการให้อากาศและเปิดน้ำไหลผ่านตลอดเวลา ทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อนำไปขุนในห้องควบคุม ซึ่งในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์มีหลักการดังนี้

1. มีลักษณะภายนอกดี เปลือกไม่ผุกร่อนหรือแตก ไม่มีบาดแผลตามตัวและเคลื่อนที่รวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง

2. มีขนาดความยาวเปลือกระหว่าง 7-10 เซนติเมตร หรือมีน้ำหนักระหว่าง 100-150 กรัม/ตัว

3. มีความสมบูรณ์เพศหรือกำลังจะสมบูรณ์เพศ สำหรับลักษณะความสมบูรณ์เพศของเพศผู้สังเกตได้จากที่ต่อมเพศ (gonad) ซึ่งอยู่ที่ใต้เปลือกด้านขวาจะอูมเปล่งและมีสีครีม ส่วนเพศเมียจะมีลักษณะอูมเปล่งแต่มีสีเขียวเข้ม

4. การคัดพ่อแม่พันธุ์หอยเป๋าฮื้อขึ้นขุนและนำไปเพาะพันธุ์ครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 200-250 ตัว โดยจัดให้มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:4

***การขุนพ่อแม่พันธุ์***

ในการขุนพ่อแม่พันธุ์จะจัดให้หอยอยู่ในห้องที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ดังนี้ คือ

1. จัดให้มีช่วงมืดและสว่างในห้องช่วงละ 12 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามกับช่วงมืดและสว่างจริงและความสว่างของแสงไฟเหนือถังพ่อแม่พันธุ์ไม่ต่ำกว่า 600 ลักซ์

2.ใส่หอยเพศผู้และเพศเมียแยกกันในถังปริมาตร 500 ลิตร โดยใส่ถังละประมาณ 40-60 ตัว ให้น้ำทะเลสะอาดไหลผ่านในอัตรา 1 ลิตร นาที น้ำหนักหอย 1 กิโลกรัม

3.ให้สาหร่ายผมนางสด 1 เท่าของน้ำหนักตัวหอยทั้งหมด หรืออาหารแผ่นสำเร็จรูปในปริมาณ 0.01 เท่าของน้ำหนักตัวหอยทั้งหมด

4. เปลี่ยนถ่ายน้ำ 100 เปอร์เซ็นต์ เก็บของเสีย เศษอาหาร และทำความสะอาดถังทุกวัน

***การเพาะพันธุ์และการรวบรวมไข่***

หลังจากทำการขุนพ่อแม่พันธุ์ภายในห้องควบคุมเป็นเวลา 3 วัน จะเริ่มเตรียมการเพาะพันธุ์ โดยถ่ายน้ำออก เก็บเศษอาหารที่เหลือออกและทำความสะอาดถังในเวลาประมาณ 11.00 น. แล้วเติมน้ำทะเลสะอาดที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตลงในถังเพาะพันธุ์ประมาณครึ่งถัง เพื่อความสะดวกในการรวบรวมไข่และน้ำเชื้อ แล้วหยุดเปิดน้ำไหลผ่านโดยให้เฉพาะอากาศเบาๆ เท่านั้น หลังจากนั้นปิดห้องควบคุมให้มืดและรอจนถึงเวลาประมาณ 12.30-13.00 น. จึงเริ่มสังเกตการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ หอยจะเริ่มปล่อยไข่และน้ำเชื้อในเวลาประมาณ 11.30-13.30 น. หลังจากทำการขุนเป็นเวลา 4-7 วัน เมื่อพบว่าหอยปล่อยไข่ออกมาจะสังเกตเห็นเม็ดสีเขียวขนาดเล็กที่พื้นหรือข้างถัง ส่วนในถังเพศผู้นั้นน้ำจะเป็นสีขาวขุ่น ต่อจากนั้นสุ่มดูลักษณะของไข่และน้ำเชื้อ ไข่ที่ดีจะกลม มีวุ้นหุ้มรอบนิวเคลียส มีขนาดประมาณ 180-190 ไมโครเมตร ส่วนน้ำเชื้อที่ดีจะเคลื่อนที่ได้เร็ว และสุ่มนับจำนวนไข่และน้ำเชื้อเพื่อที่จะคำนวณอัตราการผสมได้เหมาะสม ซึ่งความเหมาะสมระหว่างน้ำเชื้อกับไข่ คือ น้ำเชื้อ 500,000 เซลล์/มิลลิลิตร และไข่ 5-10 ฟอง/มิลลิลิตร หลังจากที่ผสมไข่กับน้ำเชื้อด้วยกันแล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เทไข่ที่ได้รับการผสมแล้วลงในกระบอกรวบรวมไข่ซึ่งมีผ้ากรองขนาดตา 40/60 ไมโครเมตรกรุอยู่ แล้วใช้น้ำทะเลสะอาดล้างไข่ 2-3 ครั้ง ก่อนที่จะเทลงอนุบาลในถังกรวยต่อไป

***การอนุบาลลูกหอยวัยอ่อน***

ลูกหอยวัยอ่อนหมายถึงระยะตั้งแต่ไข่ได้รับการผสมและพัฒนาจนถึงลูกหอยขนาดความยาวเปลือก 1-2 มิลลิเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 วัน ในช่วง 2-3 วันแรกลูกหอยจะอาศัยอาหารจากถุงไข่แดง (yolk sac) จึงยังไม่ต้องให้อาหาร ซึ่งขั้นตอนการอนุบาลมีดังนี้

1.นำไข่หอยที่ได้รับการผสมแล้วใส่ลงในถังอนุบาลทรงกรวย หรือถังฟักไข่อาร์ทีเมียปริมาตร 250 ลิตร ให้มีความหนาแน่นของไข่ 5 ฟอง/มิลลิลิตร หรือ 1,250,000 ฟอง/ถัง

2.ให้อากาศจากก้นกรวยเพื่อป้องกันไม่ให้ไข่มารวมกันที่ก้นถัง และเปิดน้ำทะเลที่ผ่านการกรองให้ไหลผ่านในอัตรา 1 ลิตร/นาที

3.ในวันที่ 2 ลูกหอยจะเข้าสู่ระยะว่ายน้ำ (veliger larva) ดังนั้นจึงต้องถ่ายน้ำก้นถังทิ้งเพื่อให้ลูกหอยที่ตายและไม่แข็งแรงหลุดออกไป แล้วเปิดน้ำทะเลที่ผ่านการกรองให้ไหลผ่านในอัตรา 1 ลิตร นาที

4. เตรียมไดอะตอมชนิด *Nitzchia* sp. ให้เกาะบนแผ่นกระเบื้องขนาด 30x50 เซนติเมตร

5.ในวันที่สามลูกหอยเข้าสู่ระยะลงเกาะ (creeping stage) ทำการย้ายลูกหอยไปอนุบาลในถังซึ่งเตรียมแผ่นอาหารไดอะตอมไว้ โดยคำนวณให้มีความหนาแน่นของลูกหอยบนแผ่นล่ออาหาร 1 ตัว/ตารางเซนติเมตร

6. ขณะปล่อยลูกหอยลงเกาะจะต้องเบาอากาศและหยุดเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากที่ลูกหอยลงเกาะหมดแล้ว เปิดน้ำให้ไหลผ่านในอัตรา 1-2 ลิตร/นาที

7. เปลี่ยนแผ่นล่ออาหารเมื่ออาหารหมด หรือหยดปุ๋ยเสริมเพื่อให้ไดอะตอมเกิดขึ้นในถังอนุบาล

8. หมั่นดูดตะกอนและทำความสะอาดแผ่นล่ออาหาร แล้วย้ายลูกหอยไปเลี้ยงในถังกลางแจ้งเมื่อมีขนาดความยาวเปลือก 2 มิลลิเมตรขึ้นไป

***การอนุบาลลูกหอยวัยรุ่น***

ลูกหอยวัยรุ่นคือลูกหอยที่มีขนาดความยาวเปลือก 2 มิลลิเมตร ถึงขนาดความยาวเปลือก 5 มิลลิเมตร ซึ่งระยะแรกลูกหอยยังคงกินไดอะตอม แต่เมื่อลูกหอยมีขนาด 3 มิลลิเมตรขึ้นไปจะเริ่มให้สาหร่ายผมนางสับละเอียด จากลูกหอยขนาด 3 มิลลิเมตร ใช้เวลาเลี้ยงอีกประมาณ 1 เดือน ก็จะมีขนาด 5 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถนำไปเลี้ยงต่อโดยให้สาหร่ายผมนางอย่างเดียว

***การเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ***

รูปแบบการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อมี 3 วิธี คือ

1. การเลี้ยงในบ่อคอนกรีต โดยการสูบน้ำจากทะเลผ่านเครื่องกรองทราย (sand filter) เข้าบ่อเลี้ยงหอย เพื่อป้องกันมิให้ศัตรู เช่น ปู ปลา เข้ามาในบ่อ รวมทั้งเพื่อให้ได้น้ำทะเลที่ใส สะอาดเนื่องจากหอยเป๋าฮื้อไม่ชอบน้ำขุ่น ขนาดของบ่อเลี้ยงไม่จำกัดแต่ควรมีระดับความลึกไม่เกิน 1 เมตร เพื่อความสะดวกในการจัดการ พื้นบ่อจะต้องมีที่หลบซ่อนให้แก่หอย อาจใช้ก้อนหินหรือแผ่นกระเบื้องหลังคาหรือแผ่นพลาสติก หลังคาควรพรางแสงด้วยตาข่ายพรางแสงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของตะไคร่น้ำ และใช้กระเบื้องใสมุงบนเพื่อป้องกันฝน สำหรับน้ำในบ่อเลี้ยงต้องไหลตลอดเวลาในอัตรา 5-10 ลิตร/นาที ขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่น ของหอย และให้อากาศตลอดเวลา

การให้อาหาร ใช้สาหร่ายผมนางสดในอัตรา 10-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวหอยทุกๆ 2 วัน สำหรับอาหารแห้ง (artificial feed) ให้ทุกวัน วันละ 1-3 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

อัตราการเลี้ยง ขนาด 1-2 เซนติเมตร เลี้ยงในอัตรา 2,000 ตัว/ตารางเมตร
ขนาด 3-4 เซนติเมตร เลี้ยงในอัตรา 400-500 ตัว/ตารางเมตร
ขนาดมากกว่า 4 เซนติเมตร เลี้ยงในอัตรา 200 ตัว/ตารางเมตร

2. การเลี้ยงหอยในตะกร้าหรือถุงอวนแขวนไว้ใต้แพ วิธีนี้จะต้องมีแพในทะเลแล้วใส่หอยในตะกร้าพลาสติกแขวนไว้ใต้แพ ซึ่งลูกหอยควรมีขนาดไม่ต่ำกว่า 3 เซนติเมตร วิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีแรกแต่ค่อนข้างเสี่ยงจากคลื่นลม จึงต้องพิจารณาแหล่งเลี้ยงที่มีที่กำบังคลื่นลมได้ตลอดทั้งปีและใช้สาหร่ายสดเป็นอาหารเท่านั้น เพราะไม่จำเป็นต้องให้อาหารทุกวัน โดยมีอัตราการเลี้ยงที่ หอยประมาณ 200 ตัวต่อตะกร้าขนาด 45 x 32 x 14 เซนติเมตร

3. วิธีเลี้ยงโดยการปล่อยลูกหอยลงในแหล่งเลี้ยงธรรมชาติ ซึ่งจะต้องเป็นบริเวณที่เป็นแก่งหิน มีสาหร่ายธรรมชาติเพียงพอ วิธีนี้นิยมเลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น แม้ต้นทุนน้อยแต่ผล ตอบแทนที่ได้ประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

***ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต***

1. ความเค็ม มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการตายของหอยเป๋าฮื้อเป็นอย่างมาก เนื่องจากหอยเป๋าฮื้อมีถิ่นอาศัยในทะเลที่มีน้ำใสซึ่งจะอยู่ห่างจากชายฝั่งออกไป ความเค็มที่เหมาะสมคือ 24.1-36.3 ppt ถ้าต่ำกว่า 15 ppt หอยจะตายภายใน 24 ชั่วโมง จากการทดลองเลี้ยง *H. asinina* พบว่าหอยมีการเจริญเติบโตดีที่ความเค็ม 32.5 ppt มากกว่าที่ความเค็มต่ำๆ (Singhagraiwan. 1992 . ทรงชัย. 2543)

2. อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของหอยเป๋าฮื้อ หอยเป๋าฮื้อที่เลี้ยงในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาวได้แก่ *H. discus hannai. H. giganta. H. rufescens. H. iris. H. ruber. H. roei* ต้องการอุณหภูมิระหว่าง 21-27 องศาเซลเซียส สำหรับ *H. diversicolor* อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 24-30 องศาเซลเซียส ส่วน *H. asinina* อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 27-31 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ต่ำในฤดูหนาวจะทำให้หอยเจริญเติบโตช้า และหากต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียส หอยจะกินอาหารน้อยลง

3. อาหาร หอยเป๋าฮื้อเป็นพวกกินพืช (herbivorous) กินสาหร่ายเกือบทุกชนิดที่มีลักษณะอ่อนนิ่มเป็นอาหาร เช่น *Laminaria. Eisenia. Undaria. Ulva. Macrocytis. Gracilaria. Acanthophora. Laurencia* เป็นต้น สำหรับ *H. asinina* นั้น พบว่าสาหร่ายที่ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria* sp.) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในหลายประเทศที่ใช้สาหร่ายชนิดนี้เป็นอาหารหอยเป๋าฮื้อ เช่น ในประเทศไต้หวัน ซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ *H. diversicolor supertexta* เป็นต้น ส่วนอัตราการให้อาหารต่อวันขึ้นอยู่กับขนาดและชนิดของหอย สำหรับ *H. asinina* อัตราการให้อาหารโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 10-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ซึ่งมีอัตราแลกเนื้อ (Feed conversion ratio. FCR) คือ อาหาร 20-25 กิโลกรัม/น้ำหนักหอย 1 กิโลกรัม ส่วนอาหารสำเร็จรูป (artificial feed) มีความจำเป็นต้องใช้ในการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเช่นกัน เนื่องจากใช้สะดวก ทำให้หอยเจริญเติบโตเร็ว แต่มีข้อจำกัด คือ คงรูปอยู่ในน้ำได้ไม่นาน และอาจทำให้น้ำเสียได้ง่ายเมื่อมีเศษอาหารตกค้าง ดังนั้นอาหารสำเร็จรูปที่จะนำมาใช้จึงต้องมีคุณสมบัติพิเศษ คือ ควรคงรูปอยู่ในน้ำได้นานไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง สำหรับสูตรอาหารที่นำมาใช้มีส่วนผสมดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| กากถั่วเหลือง | 441 | กรัม |
| สาหร่ายเกลียวทอง | 100 | กรัม |
| น้ำมันปลา | 51.2 | กรัม |
| วิตะมิน ซี | 1 | กรัม |
| แป้งข้าวหนียว | 100 | กรัม |
| แป้งสาลี (wheat gluten) | 177.6 | กรัม |
| วิตะมินรวม | 9 | กรัม |
| เลซิธิน | 10 | กรัม |
| B.H.T. | 0.2 | กรัม |
| ซีโอไลท์ | 15 | กรัม |
| แร่ธาตุรวม (trace element) | 40 | กรัม |
| คลอเรสเตอรอล | 5 | กรัม |
| สาหร่ายผมนางต้มสุก | 520 | กรัม |

(ความชื้นของอาหารไม่ควรเกิน 12 เปอร์เซ็นต์)

สูตรอาหารนี้เหมาะสำหรับการเลี้ยง *H. asinina* โดยมี FCR ประมาณ 1.5:1 สำหรับความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยง *H. asinina* เป็นดังนี้

| ขนาดความยาวเปลือก | ความหนาแน่น |
|---|---|
| 1-2 มม. | 1.500-2.000 ตัว/แผ่น (33 x 40 ซม.) |
| 3-5 มม. | 500 ตัว/ แผ่น |
| 6-10 มม. | 1.500-2.000 ตัว/ตารางเมตร |
| 2-3 ซม. | 500 ตัว/ตารางเมตร |
| 4-8 ซม. | 200 ตัว/ ตารางเมตร |

***อัตราการเจริญเติบโต***

การเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการดังกล่าวมาแล้ว แต่สายพันธุ์และสิ่งแวดล้อมก็มีผลต่อการเจริญเติบโตเช่นกัน สำหรับหอยเป๋าฮื้อพันธุ์ *H. asinina* มีอัตราการเจริญเติบโต 2-5 มิลลิเมตร/เดือน ดังนั้นในเวลา 1.5 ปี จะได้ขนาด 4-6 เซนติเมตร และขนาดโตเต็มที่จะใช้เวลาในการเลี้ยง 2-3 ปี (ทรงชัย. 2543)

***โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในหอยเป๋าฮื้อ***

เชื้อที่ก่อให้เกิดโรค เช่น

*Vibrio alginolyticus* ก่อให้เกิดการติดเชื้อในหอยเป๋าฮื้อ red abalone (*H. rufescens* ) ในโรงเพาะฟักที่ตั้งอยู่ชายฝั่งของประทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งส่วนใหญ่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในลูกหอยช่วงที่มีความยาวเปลือกประมาณ 1 เซนติเมตร (Elston. 1983b) และในการทดลองสร้างสภาพเครียดให้แก่หอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* โดยการเลี้ยงในสภาพน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนระหว่าง 152-203 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วงสุดท้ายของการทดลองลูกหอยเกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* เช่นกัน (Elston. 1983a)

*V. fluvialis* II เชื้อวิบริโอชนิดนี้ก่อให้เกิดการระบาดในหอยเป๋าฮื้อ *H. discus hannai* ช่วงปี 1993-1995 โดยแยกเชื้อนี้ได้จากกล้ามเนื้อเท้าของหอยป่วย (Taiwu *et al.*. 1996)

*Vibrio* sp. ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ที่ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ (นันทริกา. 2541) ลักษณะอาการที่พบของหอยเป๋าฮื้อที่ติดเชื้อแบคทีเรีย คือ หอยที่มีอาการเบื้องต้นจะเคลื่อนที่ช้า ไม่หลบแสง บางครั้งบริเวณใต้กล้ามเนื้อเท้ามีอาการที่เรียกว่าเท้าเปื่อย คือมีแผลปรากฏที่ฝ่าเท้า หรือบางครั้งหอยที่ตายมีอาการท้องบวม เปลือกแตกผุ ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่พบว่าเกิดจากการติดเชื้อ วิบริโอ ส่วนสาเหตุการก่อโรคเนื่องมาจากการ

เน่าเสียของพื้นบ่อหรือถัง โดยเฉพาะเมื่อให้อาหารสำเร็จรูป หรือการเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไปและไม่มีการถ่ายเทน้ำอย่างเพียงพอ ทำให้คุณภาพน้ำสกปรกเป็นที่หมักหมมของเชื้อโรค

จากการตรวจวินิจฉัยลูกหอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* ระยะวัยอ่อนตอนปลาย (juvenile) ที่ป่วย พบว่าหอยป่วยจะมีความจำกัดในการตอบสนองของกล้ามเนื้อเท้าเมื่อถูกรบกวน และไม่สามารถช่วยตัวเองได้เมื่อวางใกล้ๆ กับที่เป่าอากาศเหมือนหอยปกติ เมื่อตัดเหงือกมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเหงือกยังเคลื่อนไหวอยู่ ส่วนในเลือดพบแบคทีเรียแท่งสั้นเคลื่อนที่ได้ หอยที่มีอาการป่วยหนักพบว่าหนวดเล็กๆ ที่อยู่บนอีพิโปเดียมหดสั้นลง เหี่ยว และโป่งไม่ยาวเหมือนปกติ บางตัวกล้ามเนื้อเท้าและอีพิโปเดียมบวม ปากบานออกและหย่อน ส่วนที่ติดเชื้อรุนแรงนั้นทางเดินอาหารหดสั้นลง และกล้ามเนื้อเท้าหดเข้าไปในเปลือกมากกว่าปกติ เมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยป่วย โดยใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดบริเวณแผลที่ใต้กล้ามเนื้อเท้า แล้วใช้มีดกรีดแผลเป็นช่องเล็กๆ จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยในช่องแผลมาเกลี่ย (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ marine agar (MA) และบนอาหาร thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar และศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อโดยนำหอยที่ติดเชื้อแบคทีเรียมาแช่ในฟอร์มาลิน 19.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เจือจางด้วยน้ำทะเล จากนั้นนำเนื้อออกจากเปลือกและฝังในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) สำหรับผลทางด้านเนื้อเยื่อนั้นเริ่มแรกจะพบแบคทีเรียแท่งสั้นที่บริเวณใต้กล้ามเนื้อเท้า ด้านข้างของเท้าบนอีพิโปเดียม และผนังลำตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสัมพันธ์กับการเกิดแผล ส่วนบริเวณเนื้อเยื่ออีพิโปเดียมที่บวมจะเห็นของเหลวติดสีชมพูเข้ม มีรอยแตกบางบริเวณซึ่งจะเห็นว่ามีการไหลของของเหลว สามารถสังเกตเห็นเม็ดเลือด บางบริเวณมีการตายของเนื้อเยื่อในที่ที่แบคทีเรียเจริญไปถึง ส่วนบริเวณอื่นที่ถูกทำลาย เช่น ที่ชั้นอีพิโปเดียมด้านข้างของกล้ามเนื้อเท้า พบว่ามีกลุ่มแบคทีเรียเกาะอยู่ซึ่งจะเจริญแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และขยายเป็นบริเวณกว้างซึ่งทำให้อีพิโปเดียมรวมทั้งใต้กล้ามเนื้อเท้าเป็นทางลึกแคบๆ นอกจากนี้ยังขยายการเจริญไปยังแอ่งเลือด เพราะปรากฏแบคทีเรีย 2-3 เซลล์ เกาะอยู่ที่ผิวแอ่งเลือด ในบางตัวอย่างจะเห็นเม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์ ฮีโมไซต์ (granular hemocyte, GH) บริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย และพบแวคิวโอล (vacuole) มีขนาดใหญ่แต่ไม่พบเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งการติดเชื้อนั้นส่วนใหญ่พบในกล้ามเนื้อเท้าและอีพิโปเดียม ส่วนที่ผนังลำตัวพบโอกาสติดเชื้อน้อย สำหรับอวัยวะอื่นๆ เช่น เหงือก มีการติดเชื้อเช่นกัน โดยพบว่าเซลล์ชั้นผิว (epithelium cell) หายไปบางส่วน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บุผิวทางเดินอาหารก็มีการติดเชื้อเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียน่าจะติดมาจากแผลที่บริเวณกล้ามเนื้อเท้าก่อน แล้วเข้าไปในแอ่งเลือดไปตามระบบไหลเวียนเลือดติดต่อไปยังส่วนอื่นๆ (Elston, 1983b)

***โรคติดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในหอยชนิดอื่น***

1. โรค bacillary necrosis เป็นโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดด้วยกันที่ก่อโรคในโรงเพาะฟัก ในยุคแรกเริ่มของการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์หอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเมื่อประมาณ 40 กว่าปีมาแล้ว โดยเฉพาะที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ซึ่งได้ประสบผลสำเร็จและมีความก้าวหน้ามาก แต่ก็ต้องประสบปัญหาการระบาดของโรคที่เกิดในลูกหอยระยะวัยอ่อน (larva) และวัยอ่อนตอนปลาย โดยในระยะแรกเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อราสกุล *Sirolpidium* แต่เมื่อมีการแก้ไขปัญหาการระบาดจนเบาบางไป ก็มีปัญหาการระบาดของเชื้อแบคทีเรียตามมาและก่อความรุนแรงมากขึ้น สร้างความเสียหายแก่ผู้ประกอบการเป็นอย่างมาก เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น

- *Pseudomonas* sp. และ *Vibrio* sp. ได้ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยระยะวัยอ่อนของหอยตลับ (hard clam. *Mercenaria mercenaria*) (Guillard. 1959 อ้างโดย Tubiash *et al.*. 1965)

- *Aeromonas* sp. และ *Vibrio* sp. ก่อให้เกิดการระบาดในโรงเพาะฟักหอยที่เมือง Milford ชายฝั่งประเทศสหรัฐอเมริกา (Tubiash *et al.*. 1965)

- *V. alginolyticus*. *V. anguillarum* และ *Vibrio* sp. ก่อให้เกิดการระบาดในหอยตลับ (*M. mercenaria*) และหอยนางรม American oyster (*Crassostrea virginica*) ระยะวัยอ่อนและวัยอ่อนตอนปลายในโรงเพาะฟักต่างๆ ที่ชายฝั่งของประเทศสหรัฐอเมริกา เช่นที่ Milford. Virginia. Chesapeake Bay. Long Island Sound เป็นต้น (Tubiash *et al.*. 1970)

- *P. aeruginosa* และ *V. tubiashii* ซึ่งก่อให้เกิดการตายของลูกหอยนางรมวัยอ่อน (*Ostrea edulis*) ในประเทศสเปนในช่วงฤดูร้อนโดยเฉพาะ *V. tubiashii* พบว่ามีความรุนแรงสูงมากโดยแม้จะมีปริมาณเพียง 170 เซลล์มิลลิลิตร ก็สามารถทำให้ลูกหอยวัยอ่อนตาย 70 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 36 ชั่วโมง (Lodeiros *et al.*. 1987)

- *V. splendidus* biovar II ก่อให้เกิดการตายเป็นอย่างมากในโรงเพาะฟักหอยนางรม Pacific oyster (*C. gigas*) ทางฝั่งตะวันตกของประเทศญี่ปุ่น (Sugumar *et al.*. 1998)

2. โรควิบริโอซีส (vibriosis) ลักษณะของโรควิบริโอซีสเช่นเดียวกับ bacillary necrosis แต่สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เป็นสำคัญ เนื่องจากระยะหลังพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ก่อความรุนแรงมากขึ้นโดยเฉพาะในโรงเพาะฟัก และสร้างความเสียหายเป็นอย่างมากจึงมีการให้ชื่อเฉพาะว่าโรควิบริโอซีส เชื้อวิบริโอที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น

- *V. anguillarum* พบว่าเชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดการระบาดขึ้นได้เสมอที่โรงเพาะฟักแห่งหนึ่งชายฝั่งรัฐ California ซึ่งโรงเพาะฟักแห่งนี้มีชื่อเสียงมากในการผลิตลูกหอยนางรมหลายชนิด

แต่บุคคลที่เปลี่ยนกันมาเป็นเจ้าของกิจการมักประสบปัญหา คือ เกิดการตายของลูกหอยระยะวัยอ่อน ก่อนที่ลูกหอยจะลงเกาะอยู่เสมอ (Di Salvo *et al.*, 1978)

- *V. tubiashii* ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยวัยอ่อนของหอยนางรม (*C. virginica, C. gigas, O. edulis*) และลูกหอยวัยอ่อนของหอยตลับ (*M. mercenaria*) ที่โรงเพาะฟักชายฝั่งตะวันออกของประเทศสหรัฐอเมริกา (Jeffries, 1982)

- *Vibrio* sp. ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยวัยอ่อนของหอยแมลงภู่ หอยนางรม และหอยตลับ ที่โรงเพาะฟักชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศสเปน (Montilla *et al.*, 1994)

- *V. pectenicida* ก่อให้เกิดโรคในลูกหอยวัยอ่อนของหอยเชลล์ (*Pecten maximus*) ซึ่งเชื้อวิบริโอชนิดนี้เป็นชนิดใหม่ในกลุ่มของ *V. splendidus* แต่ฟีโนไทพ์ (phenotype) และ จีโนไทพ์ (genotype) จะต่างออกไป (Lambert *et al.*, 1999)

อาการของ bacillary necrosis และวิบริโอซีสที่พบได้ในโรงเพาะฟัก คือ จะเห็นลูกหอยกองอยู่เป็นกลุ่มๆ ที่พื้นกระจัดกระจาย ไม่กินอาหาร และพบว่าเนื้อเยื่อถูกทำลายโดยแบคทีเรีย มีการตายประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ (Elston *et al.*, 1981) จากการทดลองให้เชื้อที่ก่อโรคแก่ลูกหอยวัยอ่อนหอยต่างๆ เช่น หอยนางรม (*O. edulis* และ *C. virginica*) และ หอยตลับ (*M. mercenaria*) ลูกหอยจะแสดงอาการอย่างรวดเร็วภายใน 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นประมาณ 7 ชั่วโมงก็มีการตายของเนื้อเยื่อภายในและเริ่มจมลงก้นถัง เท้าและวีลัม (velum) ขยายออกจากเปลือก ต่อมาเริ่มสังเกตเห็นว่าลูกหอยกองอยู่เป็นกลุ่มๆ กระจัดกระจายและสะสมหนาขึ้น จากนั้นจะตายหมดภายใน 18 ชั่วโมงหลังจากให้เชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อวิบริโอที่ก่อโรคในหอยขนาดใหญ่มีรายงานไม่มากนัก แต่ที่พบบ้าง คือ เชื้อ *V. alginolyticus, V. anguillarum* ซึ่งก่อโรคในหอยนางรมเต็มวัย ส่วน Pass และคณะ (1987) พบว่าเชื้อ *V. harveyi* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในหอยมุก (*Pinctada maxima*) ทางทิศตะวันตกของประเทศออสเตรเลียโดยแยกเชื้อได้จากเลือดและทางเดินอาหาร ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากหอย 75 เปอร์เซ็นต์ของหอยป่วยทั้งหมด และเชื้อที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อวิบริโอ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อวิบริโอที่แยกได้นี้ คือ *V. harveyi* อาการที่ปรากฏ คือ ทำให้เกิดแผลหนอง ส่วนลักษณะทางเนื้อเยื่อพบการถูกทำลายของเยื่อบุผิวบริเวณซอกของผนังลำตัว มีการเข้าไปกักล้อมของเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytic cell) บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ถูกทำลาย ได้ชั้นเยื่อบุผิวของผนังลำตัว และพบว่าเซลล์ท่อตับถูกทำลายทำให้ท่อตับกว้างขึ้น เมื่อทดลองให้เชื้อ $10^{7}$-$10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร เข้าไปในช่องผนังลำตัว หอยมุกจะพัฒนาอาการของโรคในวันที่ 3 หลังจากให้เชื้อ ซึ่งเป็นอาการลักษณะเดียวกับที่พบในธรรมชาติ แต่หอยบางตัวเท่านั้นที่แสดงอาการของโรค และเมื่อแยกเชื้อจากหอยที่แสดงอาการออกมา สามารถตรวจพบเชื้อ *V. harveyi* ในเลือด และลักษณะการทำลายเนื้อเยื่อเป็นลักษณะเดียวกับที่พบในธรรมชาติ

3. โรค hings ligament disease

ลักษณะของโรค คือ เอ็นยึดเปลือก (ligament) ถูกทำลายโดยแบคทีเรียพวก gliding bacteria ซึ่งแบคทีเรียจำพวกนี้สามารถที่จะย่อยโปรตีน เช่น เอ็นยึดเปลือกของหอยสองฝาต่างๆ เช่น หอยตลับ หอยนางรม หอยเชลล์ เป็นต้น ซึ่งจากเอ็นปกติที่แข็งๆ เมื่อถูกแบคทีเรียชนิดนี้ทำลายจะกลายเป็นลักษณะอ่อนนิ่ม (jelly like) ส่วนใหญ่จะพบโรคนี้ในลูกหอยระยะวัยอ่อนตอนปลายในโรงเพาะฟัก เมื่อเอ็นยึดเปลือกถูกทำลายทำให้ไม่สามารถที่จะเปิดเปลือกสำหรับกินอาหารหรือหายใจได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อเอ็นยึดเปลือกถูกทำลายทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นมาทำลายเนื้อเยื่อต่อไป ซึ่งโรคนี้มีรายงานการอุบัติขึ้นในหลายๆ แห่งที่มีการเลี้ยงหอยสองฝาแบบหนาแน่น

สำหรับการแพร่กระจายของโรคพบในหอยสองฝาระยะวัยอ่อนตอนปลาย ในโรงเพาะฟักทั้งฝั่งตะวันตกและฝั่งตะวันออกของอเมริกาเหนือ แต่สามารถเกิดขึ้นได้ทุกๆ ที่ที่มีการเลี้ยงหอยสองฝา ซึ่งหอยที่พบการเกิดโรคนี้ เช่น หอยนางรม (*C. gigas. C. virginica. O. edulis*) หอยตลับ (*M. mercenaria. Tapes philippinarum. Silique patula*) และ หอยเชลล์ (bay scallop. *Argopecten irradians* ) เป็นต้น

ส่วนอัตราการตายพบว่าในโรงเพาะฟักหอยตลับและหอยนางรม มีรายงานการตายเป็นจำนวนมาก ซึ่งเกิดตั้งแต่ระยะวัยอ่อนถึงระยะตัวเต็มวัยที่มีขนาดความสูงของเปลือก 1 เซนติเมตร โดยหอยขนาดเล็กจะมีความอ่อนแอต่อโรคมากกว่าหอยขนาดใหญ่ และสามารถเกิดได้ตลอดทั้งปี สำหรับการตรวจวินิจฉัยสามารตรวจดูการถูกทำลายเอ็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และหากมีการตายเป็นจำนวนมากก็เป็นที่น่าสงสัยและควรหาสาเหตุการเกิดโรค โดยแยกเชื้อแบคทีเรียออกมา ส่วนการรักษานั้นไม่สามารถทำได้ แต่สามารถป้องกันโดยการจัดการฟาร์มที่ถูกสุขลักษณะ และสามารถควบคุมโรคโดยการใช้สารฆ่าเชื้อ (disinfectant) คือ sodium hypochlorite 25 ppm ใส่ในน้ำวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เป็นเวลา 5 วัน หรือใช้ยาปฏิชีวนะ คือ Penicillin. Novobiocin และ Tetracycline ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคได้ (Elston. 1990)

4. โรค brown ring disease

พบเมื่อประมาณปี1987 ซึ่งได้เกิดการตายเป็นอย่างมากของหอยสองฝา (Manila clam. *Ruditapes philippinarum*) ที่เลี้ยงในธรรมชาติทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของ Brittany ประเทศฝรั่งเศส และยังมีการระบาดเกิดขึ้นช่วงเดียวกันในทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศสเปน ซึ่งมีอาการลักษณะเดียวกันและมีการตายมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Castro *et al.*. 1995) สาเหตุของโรคพบว่าเกิดจากเชื้อ *Vibrio* sp. แต่ยังไม่ทราบว่าเกิดจากเชื้อวิบริโอชนิดใด ต่อมาทราบว่าเป็นเชื้อวิบริโอชนิดใหม่จึงให้ชื่อว่า *V. tapetis* (Borrege *et al.*. 1996 อ้างโดย Novoa *et al.*. 1998) อาการที่ปรากฏมีลักษณะเด่น คือ มีการสะสมของสารอินทรีย์แข็งๆ สีน้ำตาล (brown conchiolin deposit)

เป็นแนวเนินบนขอบเปลือกด้านใน โดยทั่วไปจะอยู่ระหว่างพาลเลียล ไลน์ (pallial line) และขอบเปลือก (Paillard and Maes. 1994) อย่างไรก็ตามลักษณะอาการอย่างนี้สามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ ทั้งปัจจัยทางเคมี สิ่งแวดล้อม และปาราสิต ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยจึงควรมีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคออกมา คือ *V. tapetis* และให้เชื้อกลับเข้าไปในหอยปกติเพื่อดูผลของอาการที่เกิดขึ้น จากการทดลองเพื่อศึกษาพัฒนาการของการเกิดโรคนี้โดยการฉีดเชื้อ *V. tapetis* $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว เข้าไปในพาลเลียล คาวิตี (pallial cavity) พบว่าสามารถสังเกตการสะสมของสารอินทรีย์สีน้ำตาลได้ด้วยตาเปล่าที่ขอบเปลือกด้านใน ซึ่งหอยในห้องทดลองนั้นมีสารอินทรีย์สะสมน้อยกว่าหอยในธรรมชาติ ส่วนในธรรมชาตินั้นหอยที่อยู่บนผิวดินมีการสะสมของสารอินทรีย์น้อยกว่าหอยที่ฝังตัวอยู่ในโคลน

ถึงแม้ว่าอาการลักษณะนี้มีรายงานว่าเกิดจากหลายสาเหตุก็ตามแต่ Novoa และคณะ (1998) พบว่าในการทดลองฉีดเชื้อ *V. tapetis* และเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น *V. pelagius*, *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophilla* และ *A. salmonicida* ในสภาพการทดลองเดียวกัน แต่ปรากฏว่าเชื้อชนิดอื่นไม่ได้ก่ออาการของโรคลักษณะนี้อย่างเชื้อ *V. tapetis*

5. โรคโนคาร์ดิโอซีส (nocardiosis)

พบโรคนี้เกิดขึ้นในหอยนางรม Pacific oyster สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Nocardia ลักษณะอาการที่พบจะมีลักษณะเป็นแผลกลมสีเหลืองถึงเขียวขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร แต่อาจจะใหญ่ถึงขนาด 1 เซนติเมตร ปรากฏบนผนังลำตัว เหงือก กล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) และหัวใจ เป็นต้น ซึ่งเชื้อนี้จะแพร่กระจายผ่านระบบเลือด

การแพร่ระบาดของโรคนี้พบว่าเกิดในช่วงฤดูร้อน ซึ่งเกิดขึ้นที่บริเวณอ่าว Matsushima ประเทศญี่ปุ่น ด้านฝั่งตะวันตกของสหรัฐอเมริกา จากรัฐ California ถึงอ่าว Tomales ที่ Washington. D.C. และอีกหลายๆ ที่ซึ่งแพร่กระจายกว้างมาก แต่ค่อนข้างจะมีความจำเพาะกับหอยนางรม Pacific oyster มากกว่าหอยชนิดอื่น เพราะเมื่อใดก็ตามที่มีการเลี้ยงหอยนางรมชนิดนี้จะต้องพบโรคนี้เกิดขึ้นเสมอ นอกจากนี้ยังพบว่าโรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในหอยนางรม European flat oyster (*O. edulis*) เช่นเดียวกัน แต่ไม่รุนแรงมากหากเทียบกับที่เกิดในหอยนางรม Pacific oyster (Elston. 1990)

6. โรคริกเก็ตเซีย (rickettsia)

สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อริกเก็ตเซีย ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีขนาดเล็กกว่าแบคทีเรียทั่วไป และมีการดำรงชีพที่แตกต่างออกไป คือ เข้าไปอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์เจ้าบ้าน (intracellular bacteria) เชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดอัตราการตายของหอยสูงมากประมาณ 95-100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการระบาดในหอยสองฝานั้นไม่มีอาการภายนอกปรากฏอย่างเด่นชัด นอกจาก

เกิดการตายเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว แต่อาการที่เกิดขึ้นในหอยฝาเดียวนั้น จากรายงานการแพร่ระบาดในหอยเป๋าฮื้อ black abalone (*H. cracherodii*) ที่บริเวณเกาะชายฝั่งรัฐ California ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งก่อให้เกิดการตายอย่างรุนแรงทำให้ประชากรหอยลดจำนวนลงเป็นอย่างมาก อาการที่ปรากฏ คือ กล้ามเนื้อเท้าหดลีบอ่อนแอมากจนไม่สามารถเกาะกับผิวก้อนหินได้และตายในที่สุด (Lafferty and Kuris. 1993: Gardner *et al*.. 1995) เมื่อตรวจวินิจฉัยทางด้านเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (Transmission electron microscope. TEM) พบเซลล์ริกเก็ตเซียปรากฏในไซโตพลาสซึมตลอดเซลล์บุผิวทางเดินอาหาร ตั้งแต่หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ซีคัม จนถึงลำไส้ ซึ่งการติดเชื้อนี้ทำให้ประสิทธิภาพการดูดซึมอาหารลดลง และเอนไซม์สำหรับการย่อยที่ผลิตโดยซีคัมหายไป ส่วนกล้ามเนื้อเท้าพบว่าไมโอฟิลาเมนต์ (myofilament)และไมโอไฟบริล (myofibril) หายไป เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเปลี่ยนไป เมื่อ กล้ามเนื้อไม่สามารถเกาะกับวัสดุได้หอยก็จะตาย

สำหรับการแพร่ระบาดของโรคนี้พบในหอยนางรม Pacific oyster (Comps *et al*.. 1977: Renaut and Cochennec. 1994 อ้างโดย Gardner. 1998) และหอยสองฝาชนิดอื่น เช่น *Tellina tenuis* (Buchanan. 1978 อ้างโดย Gardner. 1998) *Mytilus galloprovincialis* (Cajavaville and Angulo. 1991 อ้างโดย Gardner. 1998) tridacnid clam (*Tridacna crocea*) (Goggin and Lester. 1990 อ้างโดย Gardner. 1998) และ giant clam (*Hippopus hippopus*) (Norton *et al*.. 1993 อ้างโดย Gardner. 1998)นอกจากนี้มีรายงานการระบาดในหอยมุก (black-lipped pearl oyster. *Pinctada margaritifera*) ที่ฟาร์มเลี้ยงมุกที่ประเทศฝรั่งเศสและในหอยมุกเขตร้อน (*P. maxima*) ที่ฟาร์มเลี้ยงมุกที่ประเทศจีน (Wu and Pan. 1999) ซึ่งที่นี่มักมีการระบาดเกิดขึ้นเสมอทั้งในหอยมุกขนาดเล็กในโรงเพาะฟักและในหอยมุกที่เลี้ยงในธรรมชาติ จากการตรวจวินิจฉัยทางด้านเนื้อเยื่อในหอยมุก (*P. margaritifera*) พบการติดเชื้อริกเก็ตเซียตลอดเยื่อบุผิวทางเดินอาหารเช่นเดียวกับลักษณะที่พบในหอยเป๋าฮื้อ

***สาเหตุของโรคติดเชื้อแบคทีเรียในโรงเพาะฟัก***

สาเหตุเบื้องต้นมาจากสภาพการเลี้ยงในโรงเพาะฟัก ซึ่ง Lodeiros และคณะ (1987) กล่าวว่าการเลี้ยงหอยวัยอ่อนจะเลี้ยงในน้ำนิ่ง อุณหภูมิสูง ปริมาณหนาแน่น และอาหารที่ให้ คือ สาหร่ายเซลล์เดียว ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Achromobacter. Acinetobacter. Aeromonas. Pseudomonas. Cytophaga. Corynebacterium* และ *Vibrio* ซึ่งบางสกุลก่อให้เกิดการระบาดในโรงเพาะฟักอยู่เสมอ การเกิดการระบาดมักเกิดในช่วงฤดูร้อนจนถึงฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งปัจจัยที่เอื้ออำนวย คือ อุณหภูมิ อาหารที่มีคุณภาพไม่ดี คุณภาพน้ำ

Central Library
Prince of Songkla University



เนื่องจากในน้ำประกอบด้วยของเสีย สิ่งขับถ่าย (feces) ซากสาหร่าย เป็นต้น ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีตามปัจจัยเหล่านี้ ผลที่ตามมา คือ ลูกหอยจะเกิดความเครียด โดยเฉพาะเชื้อวิบริโอส่วนใหญ่จะมีการผลิตสารพิษ (toxin) ออกมา ซึ่งสารพิษนี้จะมีผลในการยับยั้งการว่ายน้ำอันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ลูกหอยเกิดการรวมกลุ่ม จึงอาจเป็นสาเหตุการตายเมื่อปริมาณแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเชื้อมาจากสิ่งแวดล้อมหรือมาจากตัวสัตว์เองที่เป็นพวกฉวยโอกาสก่อโรคเมื่อเจ้าบ้านอ่อนแอ (Colwell and Sparks. 1967) ซึ่งในโรงเพาะฟักเชื้อเข้ามาในระบบได้หลายทาง เช่น ทางน้ำ พ่อแม่พันธุ์ อาหาร (phytoplankton) และการปนเปื้อนของเครื่องมือ เป็นต้น

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดอีกประการหนึ่ง คือ ปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไป ในการเลี้ยงแบบหนาแน่นหากการหมุนเวียนน้ำไม่ดีพอจะทำให้ออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งอาจสูงถึง 200 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการผลิตโดยสาหร่ายที่เป็นอาหารร่วมด้วย ปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปจะทำให้เกิดโรค oxygen toxicity ซึ่งลูกหอยจะเครียดหรือกินอาหารไม่ปกติ เนื่องจากมีอากาศเข้าไปแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อจึงเหนี่ยวนำให้เกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆ ได้ (Elston. 1983a)

***การใช้ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ในโรงเพาะฟัก***

การควบคุมการระบาดของโรคโดยใช้ยาต้านจุลชีพ เป็นวิธีที่ปฏิบัติกันอยู่โดยส่วนใหญ่และค่อนข้างจะได้ผล เพราะบางครั้งสามารถที่จะควบคุมการระบาดและลดอัตราการตายได้ เช่น Tubiash และคณะ (1965) ได้ทดสอบความไวของเชื้อที่ก่อโรค bacillary necrosis ในโรงเพาะฟักด้วยวิธี Senitivity disc ปรากฏว่าเชื้อไวต่อยา 4 ชนิด คือ คลอแรมเฟนนิคอล (chloramphenicol), โพลีมัยซิน บี (polymycin B), อิริโทรมัยซิน (erythromycin) และนีโอมัยซิน (neomycin) ซึ่งเมื่อทดลองใช้ยาเหล่านี้ควบคุมการติดเชื้อปรากฏว่าคลอแรมเฟนนิคอล 50-100 ppm สามารถที่จะควบคุมการติดเชื้อได้ และทำให้ลูกหอยวัยอ่อนรอดตาย 90-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Di Salvo และคณะ (1978) พบว่าการใช้ยาเพนนิซิลลินในการควบคุมการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ *V. anguillarum* สามารถใช้ได้ผลเช่นเดียวกันถึงแม้เชื้อจะไม่ไวต่อยาชนิดนี้ก็ตาม

สำหรับ Lodeiros และคณะ (1987) ได้ใช้คลอแรมเฟนนิคอล 50 ppm ในโรงเพาะฟัก ซึ่งสามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ ทำให้อัตราการตายของลูกหอยวัยอ่อนลดลง นอกจากนี้ยังใช้ในการควบคุมปริมาณเชื้อวิบริโอในถังพ่อแม่พันธุ์และลูกหอยวัยอ่อนมิให้เชื้อมีปริมาณมากกว่า $10^3$ cfu/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถที่จะป้องกันการติดเชื้อระหว่างวางไข่ได้ ส่วน Jeffries (1982) แนะนำว่าควรมีการกำจัดเชื้อวิบริโอมิให้มีมากกว่า $10^2$ cfu/มิลลิลิตร ทุกขั้นตอนก็จะสามารถลดการก่อโรคได้ นอกจากนี้เตตร้าซัยคลิน (tetracycline) เป็นยาอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการควบ

คุมและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการขั้นต้น คือระยะที่มีการติดเชื้อไม่รุนแรงมากนัก ซึ่งจะใช้ 2 สัปดาห์ติดต่อกัน (ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์. 2541)

***เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในหอย (normal flora bacteria)***

Montilla และคณะ (1994) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยที่เลี้ยงในโรงเพาะฟักที่ตั้งอยู่ชายฝั่งทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศสเปน โดยเก็บตัวอย่างจากหอยแมลงภู่ หอยตลับ และหอยนางรมทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ เชื้อแบคทีเรียที่พบ คือ *Vibrio* sp.. *Aeromonas* sp. และ *Plesiomonas* sp. ซึ่งเชื้อที่พบมากที่สุด คือ เชื้อ *Vibrio* sp. โดยเฉพาะในหอยแมลงภู่ (*M. galloprovincialis*) พบว่ามีปริมาณเชื้อวิบริโอเฉลี่ยสูงกว่า 80.4 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสูงสุดที่นับได้มากกว่า $10^5$ cfu กรัม เชื้อวิบริโอที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *V. fluvialis* รองลงมาคือ *V. pelagius* และ *V. tubiashii* และยังพบ *V. alginolyticus*. *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้ส่วนน้อยสามารถตรวจพบว่ามีเชื้อ *V. cholerae* และ *V. mimicus* ร่วมด้วย ซึ่งเชื้อ *V. cholerae* นั้นเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียอย่างรุนแรงในคน และทั้งในหอยแมลงภู่และหอยตลับพบว่ามีปริมาณเชื้อวิบริโอสูง เพราะน้ำที่เลี้ยงจะมีสภาพสกปรกกว่าการเลี้ยงหอยนางรมซึ่งต้องการน้ำสะอาดเป็นพิเศษ และถึงแม้ว่าจะแยกเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคอยู่เสมอ เช่น *V. pelagius*. *V. splendidus*. *V. anguillarum*. *V. tubiashii* และ *V. alginolyticus* แต่การศึกษาในครั้งนี้หอยก็ไม่ได้แสดงอาการของโรค แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียจำพวกนี้เป็นพวกฉวยโอกาส

ส่วน Lodeiros และคณะ (1987) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อพ่อแม่พันธุ์และลูกหอยวัยอ่อนพบว่าส่วนใหญ่เป็น *Pseudomonas* sp. นอกจากนี้ Tubiash และคณะ (1970) พบว่า *V. alginolyticus*. *V. anguillarum* และ *Vibrio* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุการก่อโรคในหอยสองฝาในโรงเพาะฟัก เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวหอยด้วยเช่นกัน

ส่วน Sawabe และคณะ (1995) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากทางเดินอาหาร(gut) ของหอยเป๋าฮื้อวัยรุ่น (*H. discus hannai*) พบแบคทีเรียในทางเดินอาหาร $10^6$-$10^9$ cfu กรัม เป็นพวก nonmotile fermenters (NMF) 73.4 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ได้แยกชนิด) *Vibrio* 14.9. *Alteromonas* 5.8 และ *Cytophaga* 5.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในหอยนางรม Pacific oyster ที่เก็บตัวอย่างจากหลายๆ ที่ชายฝั่งเมือง Washington. D.C. พบว่าเป็นสกุล *Pseudomonas*. *Vibrio*. *Achromobactor* และ *Flavobacterium* (Colwell and Sparks. 1967) ส่วนในเนื้อเยื่อพ่อแม่พันธุ์และลูกหอยวัยอ่อนของหอยนางรม European flat oyster ที่แยกได้จากโรงเพาะฟักทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศสเปนนั้นส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp. (Lodeiros *et al*.. 1987) นอกจากนี้ Pass และคณะ (1987) ได้แยกเชื้อจากเลือดของหอยมุก (*P. maxima*) ที่ปกติและที่เป็นโรค ปรากฏว่าในหอยปกตินั้นไม่พบเชื้อใดๆ ในเลือด แต่สามารถพบเชื้อวิบริโอในทางเดินอาหาร

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1. เพื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในหอยเป๋าฮื้อในระบบการเลี้ยง
2. เพื่อศึกษาผลจากการติดเชื้อแบคทีเรียต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของหอยเป๋าฮื้อ
3. เพื่อศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียที่จะสามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค
4. เพื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยปกติเปรียบเทียบกับชนิดแบคทีเรียในหอยที่เป็นโรค
5. เพื่อศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**การศึกษาลักษณะอาการและการแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยป่วย**

เก็บตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อที่มีอาการป่วยซึ่งสังเกตจากการแสดงอาการเหล่านี้ เช่น มีแผลหรือมีตุ่มหนองที่ใต้กล้ามเนื้อเท้า กล้ามเนื้อเท้าหดลีบไม่แข็งแรงและชอบเกาะขอบบ่อบริเวณผิวน้ำ หรือหอยมีการตายเกิดขึ้น เป็นต้น โดยหอยที่มีอาการป่วยอย่างรุนแรงจนไม่สามารถใช้เวลาลำเลียงมายังห้องปฏิบัติการได้ จะแยกเชื้อและดองตัวอย่างให้แล้วเสร็จที่ฟาร์ม ส่วนหอยที่มีอาการป่วยไม่รุนแรงมากและที่ตั้งฟาร์มอยู่ไม่ไกล จะลำเลียงมาแยกเชื้อและดองตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยป่วยโดยแยกเชื้อจากส่วน แผล เลือด และทางเดินอาหารโดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ในการเก็บตัวอย่างจากแผลนั้นใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทาที่บริเวณแผลแล้วใช้มีดกรีดแผลลงไปลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อจากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ห่วง เกลี่ย(streak) บนอาหาร TSA และ อาหาร TCBS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ส่วนการแยกเชื้อจากเลือดนั้น ใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ทาที่บริเวณหลังกล้ามเนื้อเท้า แล้วใช้มีดกรีดให้เป็นแผลยาวใช้ปากคีบปลายแหลม (forcep) ถ่างแผล รอให้ของเหลวไหลออกมา แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ห่วง เกลี่ยบนอาหาร TSA และ อาหาร TCBS เช่นกัน ส่วนการเก็บตัวอย่างจาก ทางเดินอาหารนั้นใช้สำลีพันไม้จุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทาบริเวณภายนอกกระเพาะอาหารก่อนที่จะใช้มีดกรีด แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะมา 1 ห่วง เกลี่ยบนอาหาร TSA และ TCBS

นำตัวอย่างทั้งหมดบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เลือกโคโลนีที่แตกต่างกันให้ได้มากที่สุดมาถ่ายเชื้อ (subculture) บนอาหาร TSA จนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ (pure culture) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมสีแกรม ก่อนที่จะเก็บในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร TSA (slant)

นำเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มาแยกชนิดโดยการทดสอบลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีดังต่อไปนี้ การติดสีแกรม (gram stain) การเคลื่อนที่ (motility test) การมีแฟลกเจลลา (flagella) การเกิดปฏิกิริยากลูโคสออกซิเดชัน-เฟอร์เมนเตชัน (glucose oxidation-fermentation test) การเจริญบนอาหารแมคคองกี (McConkey agar) การสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส(cytochrome oxidase test) การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) การสร้างเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส ($\beta$-D- galactosidase test) อาร์จินีน ไดไฮโดรเลส (arginine dihydrolase) ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ออร์นิทีน ดีคาร์บอกซิเลส (ornithine decarboxylase) การทดสอบอินโดล (indole test) การทดสอบยูรีเอส (urease test) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ($H_2S$) การทดสอบการสร้างสารอะเซโตอีน (VogesProskauer test) การทดสอบเอนไซม์เจลาติเนส (gelatinase test) การทดสอบความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาล (กลูโคส (glucose) แมนนิทอล (mannitol) อินโนซิทอล (inositol) ซอร์บิทอล (sorbitol) แรมโนส (rhamnose) ซูโครส (sucrose) เมลลิไบโอส (melibiose) อะมิกดาลิน (amygdalin) อะราไบโนส (arabinose) L-อะราบิโนส (L-arabinose) และแลคโตส (lactose)) ความสามารถในการผลิตไนไตรท์ ($NO_2$ production) และแกสไนโตรเจน ($N_2$) การสร้างแกสจากการหมักย่อยน้ำตาล D-กลูโคส (gas from D-glucose) การทดสอบความไวของเชื้อต่อ vibrostat O 129 10 µg และ 150 µg แอมพิซิลลิน (ampicillin) 10 µg การเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

นำผลการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อแบคทีเรียมาตรวจผลโดยเทียบเคียงจาก Finegold และ Baron (1986), Alsina และ Blanch (1994) และ นันทนา (2537) เพื่อจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุล (genus) และระดับชนิด (species)

**การทดสอบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่แท้จริง (Koch' postulate)**

-นำหอยเป๋าฮื้อปกติมาเลี้ยงในตู้กระจกตู้ละ 3 ตัว แต่ละตู้มีหอยขนาดความยาวเปลือกระหว่าง 4.2-6 เซนติเมตร เลี้ยงปรับสภาพให้เข้ากับการทดลองเป็นเวลา 5 วัน

-เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้แต่ละเชื้อความเข้มข้น $10^{7}$-$10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปในบริเวณกล้ามเนื้อเท้าด้านข้างของหอยปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตัว สังเกตอาการ ถ่ายรูป และบันทึกอัตราการป่วยและการตาย

-นำหอยที่มีอาการป่วยมาแยกเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งจากส่วนของเลือดและแผล แล้วทดสอบคุณสมบัติของเชื้ออีกครั้งตามวิธีการเดิม เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการของโรคเป็นแบคทีเรียชนิดเดิมหรือไม่

**การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของหอยป่วย**

-ตัดเนื้อหอยออกจากเปลือกโดยให้อวัยวะทุกส่วนอยู่ในสภาพสมบูรณ์ ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 ฉีดสารละลาย Davidson's fixative เข้าไปในอวัยวะต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อเท้า ตับ ทางเดินอาหาร แล้วจึงแช่ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 3-4 วัน (อย่างน้อย 24 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรอทำขั้นตอนต่อไปตามวิธีของ Bancroft (1967)

-นำตัวอย่างหอยมาแยกอวัยวะต่างๆ หรือตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในพลาสติกสี่เหลี่ยม แล้วใส่ในตะกร้าโลหะนำไปลงในเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ เพื่อผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) จนถึงการให้ wax แทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อฝังในพาราฟิน (embedding)

-ตัดตัวอย่างที่ได้ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร แล้วนำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ใช้สไลด์ตักแผ่นเนื้อเยื่อให้ติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง

-นำเนื้อเยื่อที่ติดแน่นบนแผ่นสไลด์มาผ่านขั้นตอนการย้อมสี H&E (ภาคผนวก ก) แล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วบาง (cover glass) ที่ทาด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) วางทิ้งไว้ให้แห้ง

-นำเนื้อเยื่อนี้มาศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพจากการทำลายเนื้อเยื่อของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแล้วถ่ายภาพบันทึกไว้

**การศึกษาเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยเป๋าฮื้อ**

-แยกเนื้อหอยออกจากเปลือกก่อนที่จะแยกอวัยวะส่วนเหงือก ตับ และลำไส้ออกมาชั่งน้ำหนักแต่ละส่วน แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เพื่อฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำแต่ละส่วนมาบดด้วยโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนละเอียด แล้วเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งได้ทดสอบมาก่อนนี้แล้ว จากนั้นเพาะเชื้อจากแต่ละอัตราส่วนเจือจางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีเกลี่ยเพลท (spread plate) นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดและจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายๆ กันแต่ละลักษณะโคโลนี เพื่อที่จะคำนวณปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อกรัม

-ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละลักษณะโคโลนีเพื่อทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพและทางชีวเคมี เพื่อแยกชนิดแบคทีเรียเช่นเดียวกับวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค แล้วคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดต่อกรัมในแต่ละอวัยวะ

-ศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ของแบคทีเรียบางชนิดที่จำเป็นต้องศึกษา โดยวิธีทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนทั้งแบบส่องผ่าน (transmision electron microscope. TEM) และแบบลำแสงส่องกราด (scanning electron microscope. SEM) เพื่อใช้ในการจำแนกกลุ่มแบคทีเรีย

-ศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างสารที่อาจจะผลิตออกมานอกเซลล์ (extracellular product) หรือสารที่ผลิตภายในเซลล์ (intracellular product) ของแบคทีเรียประจำถิ่นบางชนิดที่ได้ตรวจพบมาก่อน (budding และ หรือ appendaged bacteria) ที่อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นโดยการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหาร tryptic soy broth ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24. 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อัตราเร็ว 5.000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหยดลงบนเชื้อต่างๆ ที่ป้ายไว้บนอาหาร TSA แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 3-4 ครั้ง นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เสียงคลื่นความถี่สูง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่อัตราเร็วและเวลาเดิม ใช้ส่วนใสหยดลงบนสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ

**การศึกษาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี disc sensitivity test (ตามวิธีของ Bauer และคณะ. 1966)**

นำเชื้อบริสุทธิ์มาละลายด้วยน้ำเกลือ 1. 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเชื้อจะมีความเข้มข้นเท่ากับ $1.5 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ใช้สำลีพันไม้จุ่มในสารละลายเชื้อป้ายลงบนอาหาร MHA ให้ทั่ว แล้ววางแผ่นยาต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ คือ คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม ออกซีเตตราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม นอร์ฟล๊อกซาซิน 10 ไมโครกรัม ออกโซลินิก แอซิด 2 ไมโครกรัม ซัลฟาเมทท๊อกซาโซล 23.75 ไมโครกรัมร่วมกับไตรเมทโทปริม 1.25 ไมโครกรัมลงบนอาหารนั้น นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วจึงวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดรอยใส (clear zone) ลบด้วยค่ามาตรฐานช่วงที่มีความไว (sensitive) ของยาแต่ละชนิด ยาที่ก่อให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยใสเท่ากับหรือมากกว่าค่ามาตรฐานแสดงว่าเชื้อมีความไวต่อยานั้นๆ

**การศึกษาปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการดิดเชื้อแบคทีเรีย**

วัดคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงทุกครั้งที่ออกเก็บตัวอย่างโดยวิเคราะห์ ความเค็ม วัดโดยใช้เครื่องวัดแบบหักเหแสง (salinometer) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ วัดโดยใช้เครื่องวัดออกซิเจนยี่ห้อ

YSI ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำในบ่อเลี้ยงหอยโดยเพาะเชื้อบนอาหาร TSA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาปริมาณวิบริโอทั้งหมดโดยเพาะเชื้อลงบนอาหาร TCBS นำมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ 18-24 ชม. ส่วนพารามิเตอร์ที่วัดในห้องปฏิบัติการ คือ pH วัดโดยใช้เครื่องวัด pH (pH meter) และค่าความเป็นด่างวัดโดยใช้วิธีการไตเตรท

**ผลการศึกษา**

**1. ลักษณะอาการและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยเป๋าฮื้อป่วย**

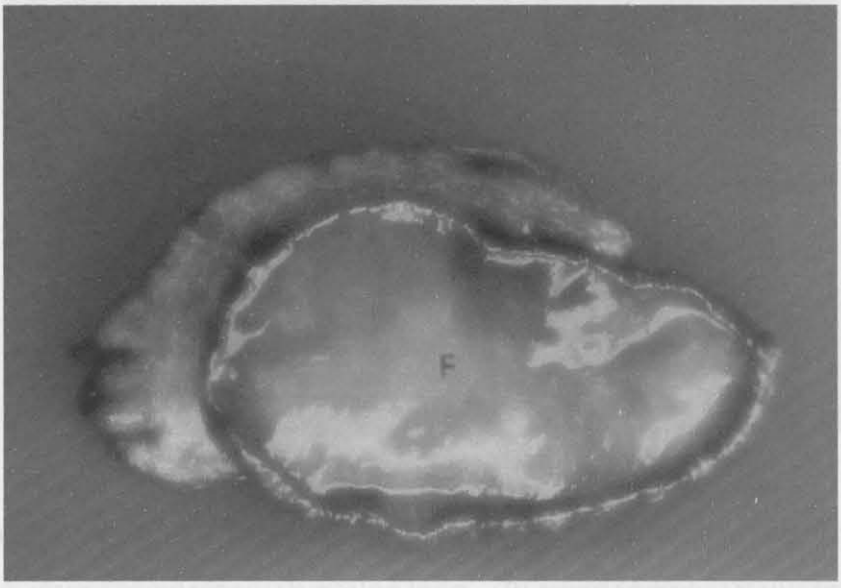
เก็บตัวอย่างหอยที่มีอาการป่วยทั้งหมด 4 ครั้งในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2542-พฤศจิกายน 2543 จากหน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ตำบลสะกอม อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จำนวน 1 ครั้ง จากฟาร์มเอกชน ตำบลนาทับ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา จำนวน 1 ครั้ง และจากฟาร์มเอกชน อำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี จำนวน 2 ครั้ง

อาการของหอยที่เป็นโรค

จากการสังเกตอาการของหอยป่วยหรือหอยที่แสดงอาการของโรคแยกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ อาการป่วยที่ไม่รุนแรงและอาการป่วยที่รุนแรงหรืออาจกล่าวได้ว่าเกิดการระบาดของโรค โดยหอยที่มีอาการป่วยระดับไม่รุนแรงนั้น ระยะแรกจะสังเกตได้ว่าหอยไม่มีการหลบแสงในที่กำบังที่จัดไว้ให้ สำหรับหอยที่เลี้ยงในระดับน้ำลึก (ประมาณ 1 เมตร) จะสังเกตได้ว่ามีการขึ้นมาเกาะที่ขอบบ่อบริเวณผิวน้ำ และหากจับขึ้นมาด้วยมือเปล่า สามารถที่จะดึงออกมาจากที่ยึดเกาะได้โดยง่ายเนื่องจากกล้ามเนื้อเท้าไม่แข็งแรง และไม่กินอาหาร หอยที่เริ่มมีอาการลักษณะนี้จะตายภายใน 4-5 วัน แต่บางครั้งพบว่าแม้จะมีอาการเช่นนี้ หอยป่วยบางตัวสามารถที่จะมีชีวิตในสภาพปกติต่อไปได้อีก ส่วนหอยที่มีอาการป่วยอย่างรุนแรงนั้นพบว่ากล้ามเนื้อเท้าจะหดลีบลง อ่อนแอมาก หากวางหงายจะหย่อนตกจากเปลือก แทบจะไม่มีการตอบสนองใดๆ ของกล้ามเนื้อเท้า เพียงแต่เคลื่อนไหวได้เล็กน้อย และส่วนใหญ่จะมีแผลและตุ่มหนองบริเวณฝ่าเท้าทำให้ไม่สามารถยึดเกาะได้ตามปกติ (ภาพที่ 2. 3) ซึ่งหอยที่มีอาการติดเชื้ออย่างรุนแรงนี้จะมีการระบาดของเชื้อแบคทีเรียทั้งระบบอย่างรวดเร็วมาก และปริมาณการตายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทุกวัน หากไม่สามารถควบคุมโรคได้ก็จะตายเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลาประมาณ 10 วัน

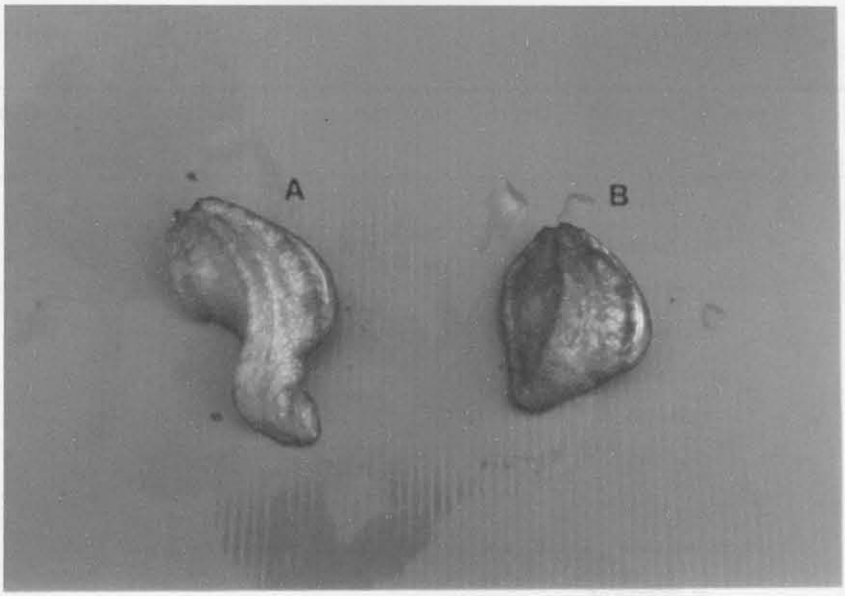
ส่วนหอยปกตินั้นกล้ามเนื้อเท้าจะแข็งแรงมาก ไม่สามารถที่จะใช้มือดึงขึ้นมาจากที่ยึดเกาะได้ง่ายนักซึ่งจะต้องใช้แผ่นวัสดุบางๆเปิดฝ่าเท้าขึ้นมาเล็กน้อยเพื่อทำลายสภาพสุญญากาศใต้

กล้ามเนื้อเท้าทำให้ดึงออกมาได้ง่ายขึ้น เมื่อจับหงายก็สามารถที่จะใช้กล้ามเนื้อเท้าดันพลิกตัวเองกลับมาในท่าปกติได้อีก (ภาพที่ 4)




ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของหอยป่วยอย่างรุนแรง กล้ามเนื้อเท้า ( F ) จะหดลีบลงและหย่อนตกจากเปลือก

ภาพที่ 3 บริเวณกล้ามเนื้อฝ่าเท้าของหอยที่ป่วยจะมีตุ่มหนองเกิดขึ้น (ศรชี้ ) และมีการสร้างเมือกปกคลุมฝ่าเท้ามากขึ้น




ภาพที่ 4 เปรียบเทียบหอยปกติและหอยที่ติดเชื้ออย่างรุนแรง (A) หอยที่ปกติสามารถใช้กล้ามเนื้อเท้าดันพลิกตัวเองกลับมาในท่าปกติได้อีก (B) หอยที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงจะไม่สามารถใช้กล้ามเนื้อเท้าได้เนื่องจากอ่อนแอมาก

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วย

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งจากหอยที่ป่วยรุนแรงและหอยป่วยไม่รุนแรง โดยได้ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากส่วนของเลือด ทางเดินอาหาร และจากแผลลงบนอาหาร TSA และอาหาร TCBS ซึ่งได้แยกเชื้อจากหอยที่ป่วยไม่รุนแรง 3 ครั้ง ในจำนวนหอยป่วยทั้งหมด 12 ตัว แยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 8 ชนิด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยไม่รุนแรงในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง

| ครั้งที่เก็บตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง (ตัว) | แหล่งที่เก็บ ตัวอย่าง | เชื้อแบคทีเรียที่ แยกได้ | อวัยวะที่แยกเชื้อได้ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | ฟาร์มเอกชน ตำบลนาทับ อำเภอจะนะ | *V. pelagius* II | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *V. mediterranei* | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *Pseudomonas* sp. | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *Alcaligenes* sp. | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| 2 | 5 | ฟาร์มเอกชน อำเภอ ยะหริ่ง (ครั้งที่ 1) | *V. pelagius* II | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *V. splendidus* I | เลือด |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| ครั้งที่เก็บตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง (ตัว) | แหล่งที่เก็บ ตัวอย่าง | เชื้อแบคทีเรียที่ แยกได้ | อวัยวะที่แยกเชื้อได้ |
|---|---|---|---|---|
| | | | *V. nereis* | เลือด |
| | | | *V. alginolyticus* | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *V. carchariae* | ทางเดินอาหาร |
| | | | *V. mediterranei* | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *Pseudomonas* sp. | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *Alcaligenes* sp. | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| 3 | 3 | ฟาร์มเอกชน อ.ยะหริ่ง (ครั้งที่ 2) | *V. mediterranei* | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | | ทางเดินอาหาร |
| | | | *Pseudomonas* sp. | เลือด, ทางเดินอาหาร |
| | | | *Alcaligenes* sp. | |

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มแกรมลบรูปท่อนไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส (glucose-non-ferment gram negative bacilli) มี 2 ชนิด คือ *Pseudomonas* sp. และ *Alcaligenes* sp. ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบรูปท่อนไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส

| คุณสมบัติที่ทดสอบ | ผลการทดสอบ | |
|---|---|---|
| การเจริญบนอาหาร TSA | โคโลนีเล็กมาก, ใส | โคโลนีเล็ก, สีน้ำตาลอ่อน |
| Gram | - | - |
| Catalase | + | + |
| Oxidase | + | + |
| Indole | - | - |
| Pigment | - | สีน้ำตาลอ่อน |
| Urease | - | - |
| $H_2S$ | - | - |
| Flagella | ไม่ชัดเจน | Polar (1) |
| Oxidative Fermentative | -/- | -/- |
| Motility | + | + |
| Arginine dihydrolase | - | - |
| Ornithine decarboxylase | - | + |
| Nitrite production | - | + |

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| คุณสมบัติที่ทดสอบ | ผลการทดสอบ | |
|---|---|---|
| Denitrification ($N_2$) | + | - |
| Gelatinase | - | + |
| Growth at 42 ° C | - | + |
| Growth on MacConkey agar | - | + |
| | *Alcaligenes* sp. | *Pseudomonas* sp. |

2. กลุ่มวิบริโอ ซึ่งเป็นพวกแกรมลบรูปท่อน ปฏิกิริยาออกซิเดสให้ผลบวก เจริญได้ดีบนอาหาร TCBS และเจริญได้ทั้งภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) แยกได้ทั้งหมด 6 ชนิด คือ *V. pelagius* II, *V. splendidus* I, *V. nereis*, *V. alginolyticus*, *V. carchariae* และ *V. mediterranei* ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยกลุ่มวิบริโอ

| คุณสมบัติที่ทดสอบ | ผลการทดสอบ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Vibrio pelagius* II | *Vibrio splendidus* I | *Vibrio nereis* | *Vibrio alginolyticus* | *Vibrio carchariae* | *Vibrio mediterranei* |
| TCBS | Y | | Y | Y | Y | Y |
| Gram | - | - | - | - | - | - |
| O/F | -/+ | -/+ | -/+ | -/+ | +/+ | +/+ |
| McConkey agar | - | - | - | - | + | + |
| Oxidase | + | + | + | + | + | + |
| Motility | + | - | - | - | + | + |
| Gas from D- glucose | - | - | - | - | - | - |
| Fermentation of | | | | | | |
| Mannitol | - | - | - | - | + | + |
| L-arabinose | - | - | - | - | + | - |
| Lactose | - | - | - | - | - | + |
| Glucose | - | - | - | + | + | + |
| Inositol | - | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | +* | - | - | - | - | + |
| Rhamnose | - | - | - | - | - | - |
| Sucrose | - | + | + | + | + | + |
| Melibiose | - | - | - | - | + | + |
| Amygdalin | - | - | -* | - | - | - |

ตารางที่ 6 (ต่อ)

| คุณสมบัติที่ทดสอบ | ผลการทดสอบ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Vibrio pelagius* II | *Vibrio splendidus* I | *Vibrio nereis* | *Vibrio alginolyticus* | *Vibrio carchariae* | *Vibrio mediterranei* |
| Arabinose | - | - | - | - | - | - |
| Luminescence | - | - | - | - | - | - |
| ONPG | + | + | - | - | +[a] | + |
| Arginine dihydrolase | - | - | - | - | - | - |
| Lysine decarboxylase | - | - | - | - | + | - |
| Ornithine decarboxylase | - | - | - | - | + | - |
| Citrate utilization | + | + | - | + | - | - |
| Urease | - | - | - | - | -[a] | - |
| Indole | + | - | - | + | + | + |
| VP | - | - | - | -[a] | - | - |
| Gelatinase | - | - | - | - | - | - |
| $NO_2$ production | + | - | - | + | + | + |
| Resistance to | | | | | | |
| O/129 10 μg | - | - | - | + | + | - |
| O/129 150 μg | - | - | - | - | - | - |
| Ampicillin 10 μg | - | - | - | - | - | - |
| NaCl | | | | | | |
| 0% | - | - | - | - | - | - |
| 3% | + | + | - | - | + | + |
| 6% | + | + | + | + | + | + |
| 8% | - | - | -[a] | + | + | - |
| 10% | - | - | - | -[a] | - | - |
| Temperature | | | | | | |
| 4°C | - | - | - | - | - | - |
| 20°C | + | + | - | + | - | + |
| 30°C | + | + | - | + | - | + |
| 35°C | + | + | - | - | - | + |
| 40°C | - | - | + | -[a] | + | - |
| 45°C | - | - | - | - | - | - |
| | *Vibrio pelagius* II | *Vibrio splendidus* I | *Vibrio nereis* | *Vibrio alginolyticus* | *Vibrio carchariae* | *Vibrio mediterranei* |

[a] หมายถึงผลการทดสอบต่างจากตารางเทียบเคียง

ส่วนหอยป่วยรุนแรงที่เกิดขึ้นในโรงเพาะฟักที่หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานีนั้น ได้แยกเชื้อจากตุ่มหนองและเลือดของหอยป่วยทั้งหมด 14 ตัว เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ออกซิเดสให้ผลบวก เจริญได้ดีบนอาหาร TCBS และส่วนใหญ่ให้โคโลนีสีเขียว (ไม่หมักย่อยน้ำตาลซูโครส) ส่วนเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSA ให้โคโลนีลักษณะเดียวกันเกือบทั้งหมด คือ เป็นโคโลนีขนาดเล็กและขุ่น เมื่อนำมาทดสอบบนอาหาร TCBS เชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะเดียวกันเหล่านี้ให้โคโลนีสีเขียวทั้งหมดเช่นกัน (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ลักษณะบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยที่ติดเชื้อรุนแรง จากหน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

| หอยตัวที่ | อวัยวะที่เพาะเชื้อ | ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TSA | ปริมาณโคโลนีบนอาหาร TCBS (%) | | ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร TCBS (ถ่ายเชื้อจาก TSA) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | สีเขียว | สีเหลือง | |
| 1 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | | ขนาดใหญ่,ใส | | | สีเหลือง |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| 2 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 75 | 25 | สีเขียว |
| 3 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | แผล | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| 4 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 84 | 16 | สีเขียว |
| 5 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 73 | 27 | สีเขียว |
| | | ขนาดใหญ่,ใส | น้อย | น้อย | สีเหลือง |
| | แผล | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| 6 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 90 | 10 | สีเขียว |
| 7 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 88 | 12 | สีเขียว |
| 8 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| 9 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| 10 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| 11 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 75 | 25 | สีเขียว |
| 12 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |

ตารางที่ 7 (ต่อ)

| หอยตัวที่ | อวัยวะที่เพาะเชื้อ | ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TSA | ปริมาณโคโลนีบนอาหาร TCBS (%) | | ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร TCBS (ถ่ายเชื้อจาก TSA) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | สีเขียว | สีเหลือง | |
| 13 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |
| | ตุ่มหนอง | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 77 | 23 | สีเขียว |
| 14 | เลือด | ขนาดเล็ก, ขุ่น | 100 | 0 | สีเขียว |

หมายเหตุ : ไม่สามารถทำการแยกชนิดต่อไปได้เนื่องจากเชื้อตายในระหว่างการเก็บรักษา

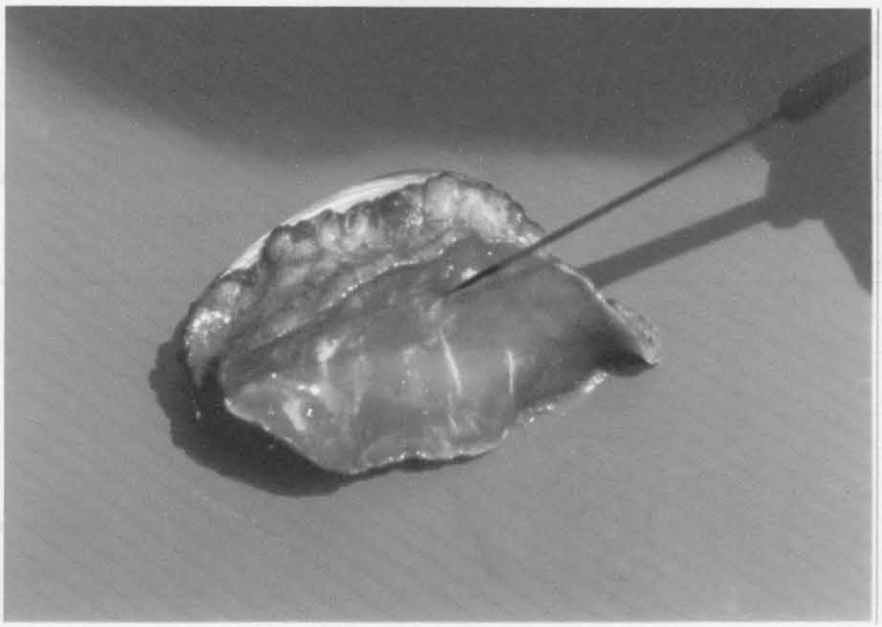
## 2. ผลการทดสอบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่แท้จริง

เมื่อทำการให้เชื้อทั้ง 8 ชนิดที่แยกได้ในตารางที่ 5 และ 6 กลับเข้าสู่หอยปกติ (reinfection) โดยวิธีการฉีด ในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตัว เข้าไปในส่วนกล้ามเนื้อเท้าด้านข้าง ซึ่งความเข้มข้นของเชื้ออยู่ระหว่าง $8.6 \times 10^{-}$-$1.34 \times 10^{}$ เซลล์/มิลลิลิตร เชื้อที่ก่อให้เกิดอาการของโรคมี 3 ชนิด (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เชื้อที่ก่อให้เกิดอาการของโรคหลังจากทดสอบโดยการให้เชื้อแก่หอยปกติ

| เชื้อที่ก่อโรค | วันที่สามารถสังเกตอาการ | จำนวนหอยที่ป่วย รุนแรง และใกล้ตาย | จำนวนหอยทั้งหมด/ตู้ |
|---|---|---|---|
| *V. splendidus I* | 2 | 2 | 3 |
| *V. alginolyticus* | 3 | 2 | 3 |
| *V. nereis* | 6 | - | 3 |

สำหรับเชื้อ *V. splendidus* I ทำให้หอยเกิดอาการใกล้ตาย คือ ไม่สามารถเกาะกับพื้นผิวตู้กระจกได้ในวันที่ 2 จำนวน 1 ตัว ส่วนอีก 1 ตัวขึ้นมาเกาะที่ผิวน้ำ อาการอ่อนแอมาก กล้ามเนื้อหดลีบเล็กลง บริเวณใต้ฝาเท้ามีแผลและมีน้ำหนองไหลออกมา ส่วนหอยที่ได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* เริ่มสังเกตอาการป่วยในวันที่ 3 จำนวน 2 ตัว โดยหอยจะขึ้นมาเกาะที่บริเวณผิวน้ำ และต่อไปกล้ามเนื้อจะหดลีบ อ่อนแอ และมีแผลที่มีน้ำหนองบริเวณใต้กล้ามเนื้อเท้าเช่นกัน (ภาพที่ 5) ซึ่งหอยที่มีอาการป่วยจนใกล้ตายนั้นเป็นหอยที่มีขนาดความยาวเปลือกระหว่าง 4.4 -4.5 เซนติเมตร



ภาพที่ 5 ลักษณะแผลหนองที่ใต้กล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อ หลังจากได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นเวลา 3 วัน (เข็มชี้)

ส่วนหอยขนาดใหญ่ซึ่งมีความยาวเปลือก 5.5-6 เซนติเมตร ไม่แสดงอาการรุนแรงและสามารถมีชีวิตรอดตลอดการทดลองเป็นเวลา 1 เดือน

สำหรับหอยที่ได้รับเชื้อ *V. nereis* นั้น พบว่ามีแผลหนองขนาดใหญ่ใต้กล้ามเนื้อเท้าในวันที่ 6 จำนวน 1 ตัว ซึ่งมีความยาวเปลือก 5.2 เซนติเมตร ในขณะที่ตู้นี้หอยทดลองค่อนข้างจะมีขนาดใหญ่ คือ มีความยาวเปลือกอยู่ระหว่าง 5.2-6.0 เซนติเมตร แต่อย่างไรก็ตามหอยที่ได้รับเชื้อชนิดนี้ก็ยังมีความแข็งแรง สามารถหากินได้ตามปกติและสามารถมีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง และแผลหนองที่เคยปรากฏนั้นได้หายไป เมื่อเพาะเชื้อจากเลือดและจากแผลหนองของหอยป่วยที่ใกล้ตายที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 ชนิด นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอีกครั้ง ผลการทดสอบให้คุณสมบัติของเชื้อวิบริโอชนิดเ ดิม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้ในหอยป่วยจากการฉีดเชื้อ

| คุณสมบัติที่ทดสอบ | ผลการทดสอบ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | เชื้อที่ฉีด (*V. splendidus* I) | เชื้อที่แยกได้จากเลือดและจากแผล (*V. splendidus* I) | เชื้อที่ฉีด (*V. alginolyticus*) | เชื้อที่แยกได้จากเลือดและจากแผล (*V. alginolyticus*) |
| TCBS | Y | Y | Y | Y |
| Gram | - | - | - | - |
| McConkey agar | + | + | + | + |
| Oxidase | + | + | + | + |
| Motility | + | + | + | + |
| Gas from D- glucose | - | - | - | - |
| Fermentation of | | | | |
| Mannitol | + | + | + | + |
| Lactose | - | - | - | - |
| L-arabinose | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - |
| Rhamnose | - | - | - | - |
| **Sucrose** | + | + | + | + |
| Melibiose | - | - | - | - |
| Amygdalin | - | - | - | - |
| Arabinose | - | - | - | - |
| Luminescence | - | - | - | - |
| ONPG | + | + | - | - |
| Arginine dihydrolase | + | + | - | - |
| Lysine decarboxylase | - | - | + | + |
| Ornithine decarboxylase | - | - | + | + |
| Citrate utilization | + | + | + | + |
| Urease | - | - | - | - |
| Indole | + | + | + | + |
| VP | - | - | -* | -* |
| Gelatinase | + | + | + | + |
| $NO_2$ production | + | + | + | + |
| Resistance to | | | | |
| O 129 10 µg | - | - | + | + |
| O 129 150 µg | - | - | - | - |
| Ampicillin 10µg | - | - | + | - |

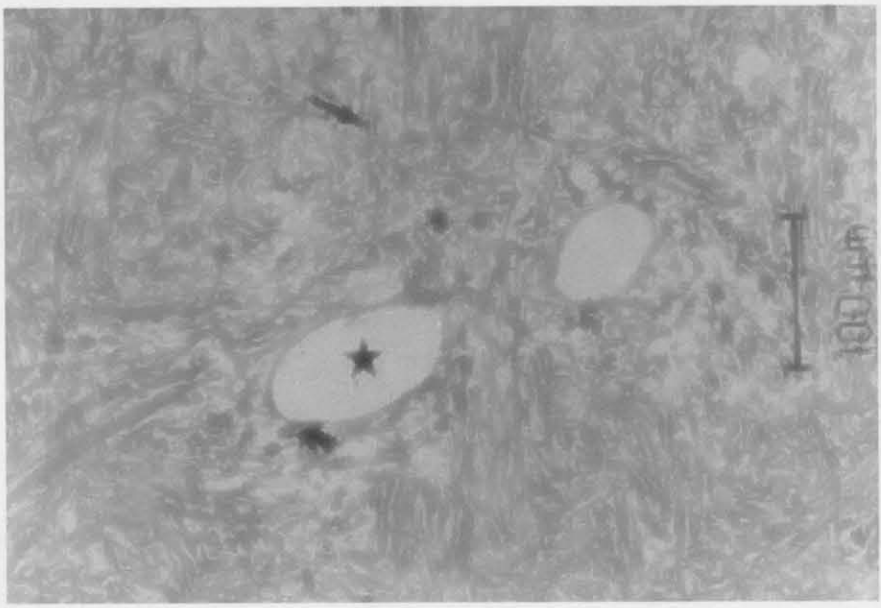
ตารางที่ 9 (ต่อ)

| คุณสมบัติที่ทดสอบ | ผลการทดสอบ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | เชื้อที่ฉีด (*V. splendidus* I) | เชื้อที่แยกได้จากเลือดและจากแผล (*V. splendidus* I) | เชื้อที่ฉีด (*V. alginolyticus*) | เชื้อที่แยกได้จากเลือดและจากแผล (*V. alginolyticus*) |
| NaCl | | | | |
| 0% | - | - | - | - |
| 3% | + | + | + | + |
| 6% | + | + | + | + |
| 8% | - | - | + | + |
| 10% | - | - | -* | -* |
| Temperature | | | | |
| 4°C | - | - | - | - |
| 20°C | + | + | + | + |
| 30°C | + | + | + | + |
| 35°C | + | + | + | + |
| 40°C | - | - | -* | -* |
| 45°C | - | - | - | - |
| | *V. splendidus* I | *V. splendidus* I | *V. alginolyticus* | *V. alginolyticus* |

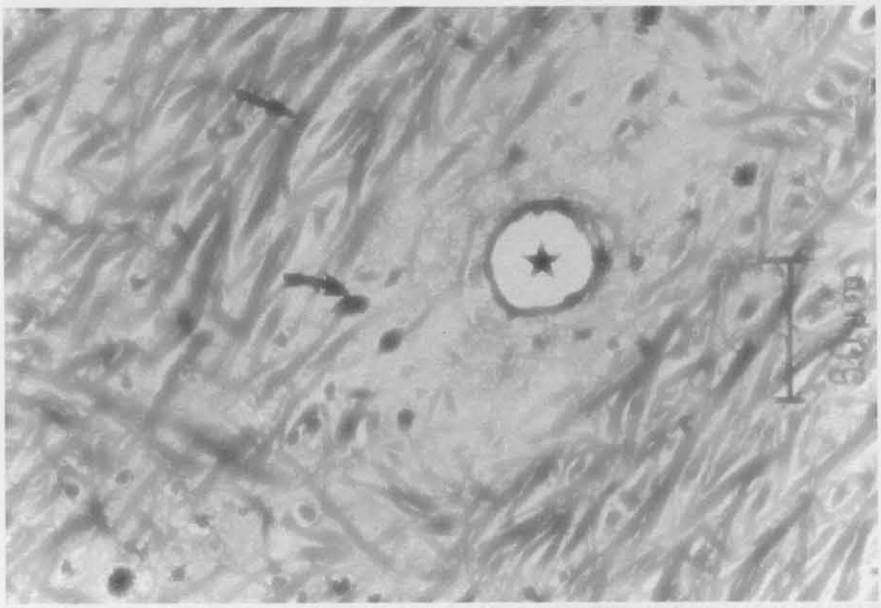
* หมายถึงผลการทดสอบต่างจากตารางเทียบเคียง

**3. ผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของหอยป่วย**

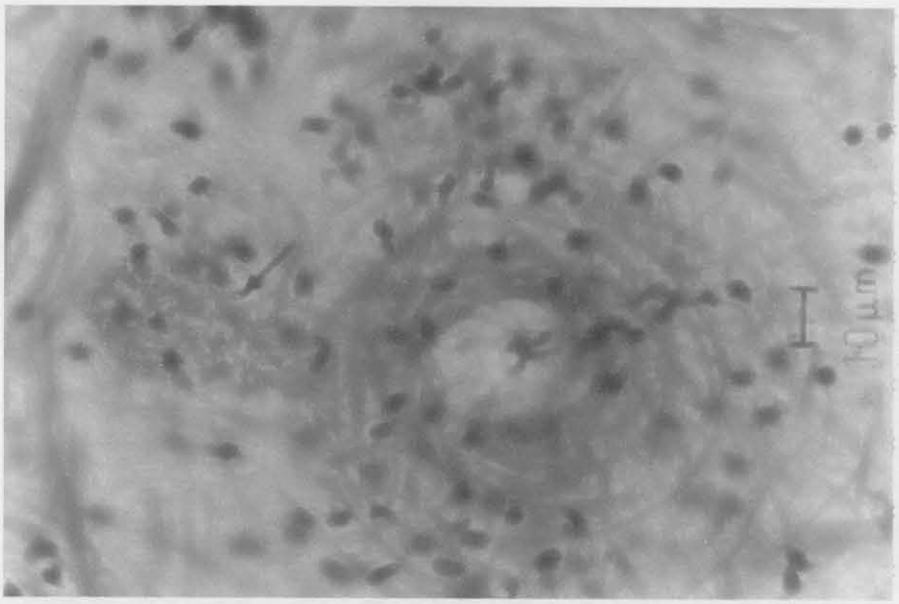
จากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อทั้งหอยที่ป่วยรุนแรง ป่วยไม่รุนแรง และหอยป่วยจากการฉีดเชื้อ ลักษณะการทำลายเนื้อเยื่อที่ปรากฏมีลักษณะเดียวกัน และส่วนใหญ่การถูกทำลายจะปรากฏชัดเจนในส่วนของกล้ามเนื้อเท้า ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อหอยปกติ พบว่าในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเท้าของหอยปกติจะสังเกตเห็นเส้นใยกล้ามเนื้อเรียงตัวอยู่ตามปกติ ไม่ปรากฏการถูกทำลาย มีเม็ดเลือดกระจายอยู่ทั่วไปแต่เบาบาง และแสดงลักษณะของท่อเลือดที่ปกติ (ภาพที่ 6. 7) ซึ่งในหอยที่ป่วยรุนแรงจะเห็นกลุ่มเซลล์แบคทีเรียเจริญกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 8) โดยในระยะแรกยังไม่เกิดการล้อมรอบของเซลล์เม็ดเลือด ต่อมากลุ่มเซลล์แบคทีเรียนี้จะถูกล้อมรอบโดยเม็ดเลือดหนาแน่นขึ้นเป็นลักษณะของโนดูล ฟอร์เมชัน (nodule formation) (ภาพที่ 9) และพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณนั้นเริ่มถูกทำลายโดยแบคทีเรีย ในขณะเดียวกันก็เกิดการตายของเม็ดเลือด (ภาพที่ 10.11.12) ซึ่งบริเวณที่ถูกทำลายนี้ต่อไปจะกลายเป็นโพรงหนอง (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเท้าปกติของหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งจะสังเกตเห็นท่อเลือด (★) เส้นใยกล้ามเนื้อที่เรียงตัวตามปกติ (ศรตรง) และเม็ดเลือดกระจายอยู่อย่างเบาบาง (ศร โค้ง)

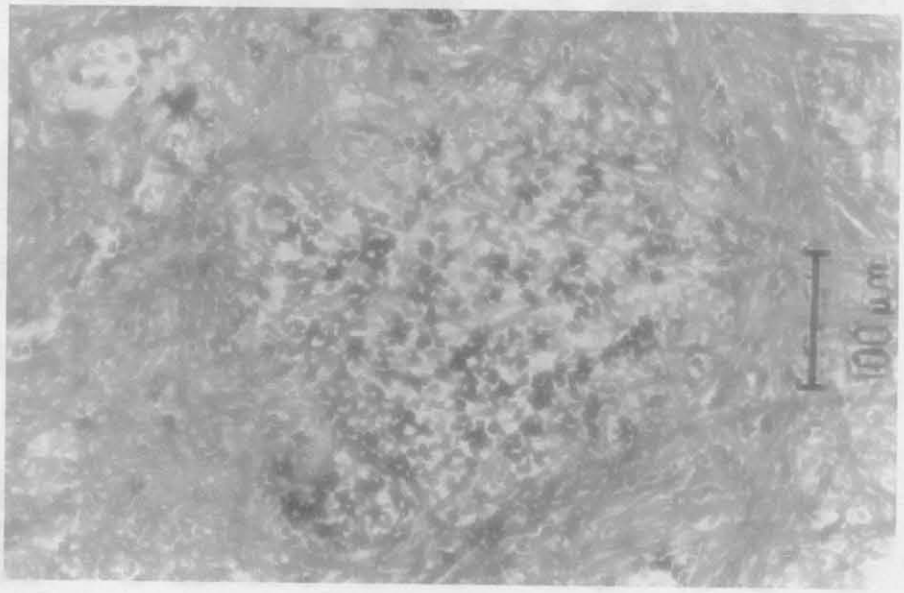


ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อปกติ ท่อเลือด (★) เม็ดเลือด (ศร โค้ง) เส้นใยกล้ามเนื้อ (ศรตรง)

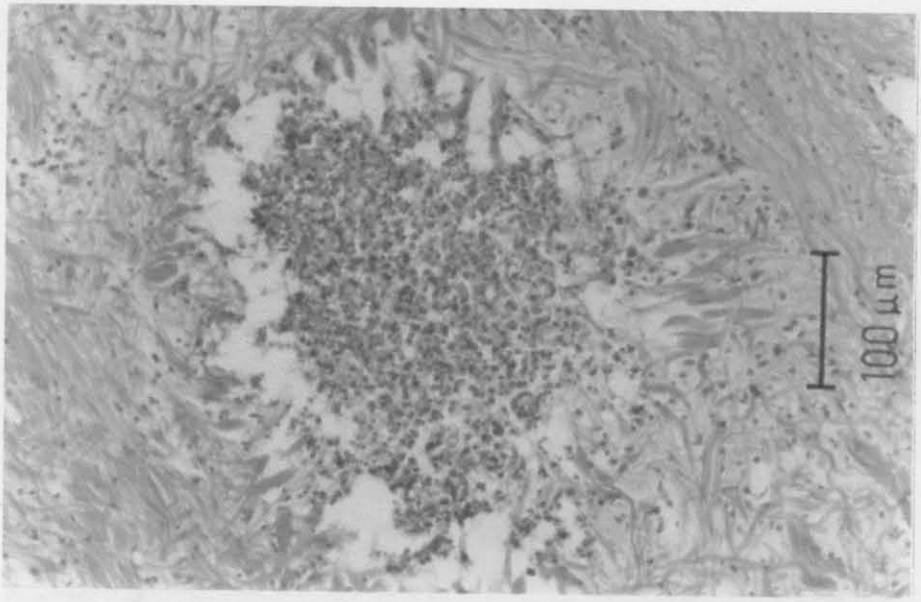


ภาพที่ 8 กลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่เริ่มเข้ามาเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อป่วย (ศรชี้)

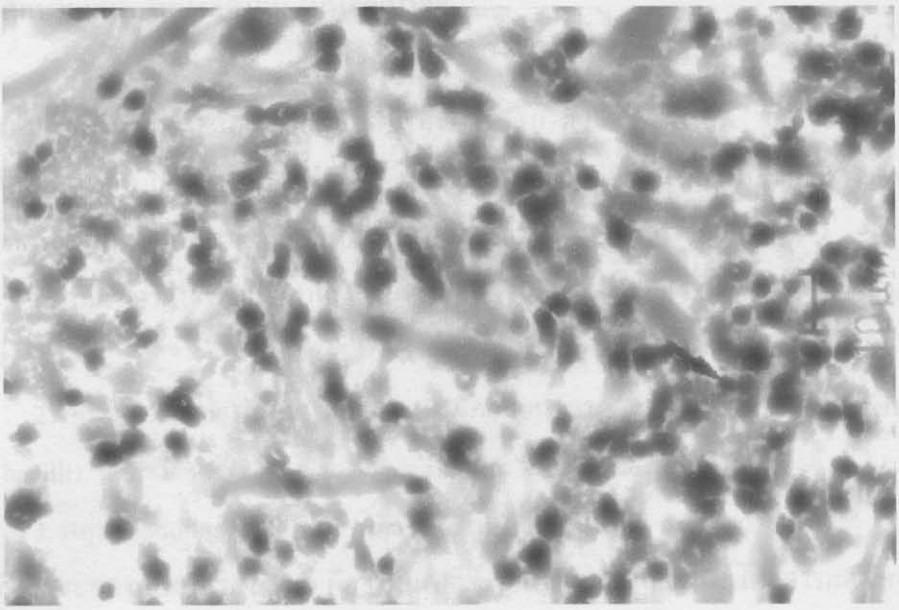
ภาพที่ 9 บริเวณที่มีการติดเชื้อจะมีการเข้ามาห้อมล้อมของเซลล์เม็ดเลือดเป็นจำนวนมาก (hemocytic infiltration) เพื่อที่จะทำลายเชื้อแบคทีเรีย (ศรชี้)



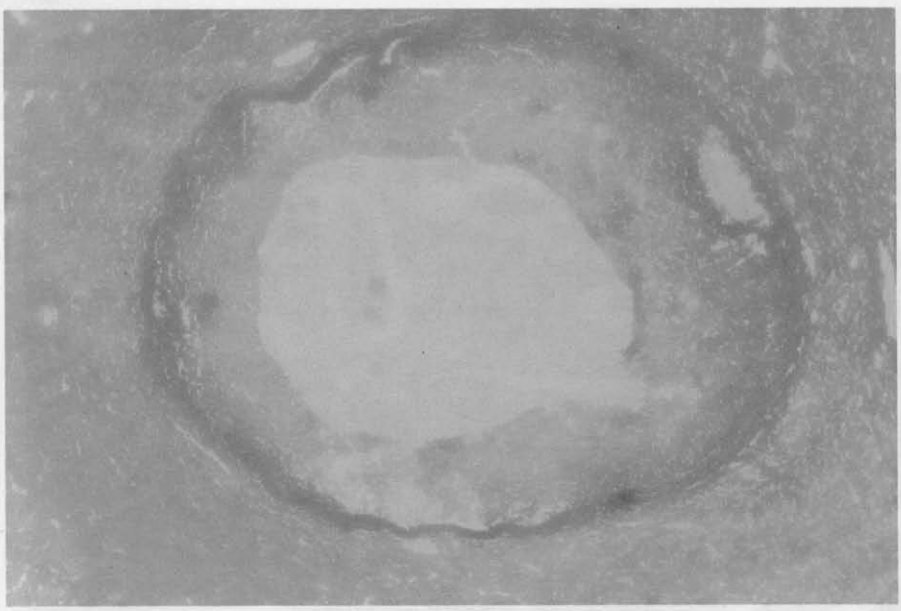

ภาพที่ 10 ภาพขยายเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียอย่างรุนแรงจะมีเม็ดเลือดแทรกตัวเข้ามาและมีการเกาะกลุ่ม (hemocytic aggregation) เส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมากถูกทำลาย




ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อถูกทำลายรุนแรงขึ้นพร้อม ๆ กับเม็ดเลือดมีการตายมากขึ้นเช่นกัน ก่อนที่จะเกิดเป็นโพรงหนองต่อไป



ภาพที่ 12 ภาพขยายลักษณะของเม็ดเลือดตาย ซึ่งจะมีขนาดเล็กลงและติดสีเข้มปรากฏเป็นจำนวนมาก (ศรชี้) และสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียกระจายอยู่ทั่วไปในกลุ่มเซลล์ฟาโกไซท์นี้



ภาพที่ 13 ลักษณะของโพรงหนองที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อป่วย

**4. ผลการศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่น ในหอยเป๋าฮื้อ**

จากการสุ่มตัวอย่างหอยเป๋าฮื้อปกติมาทั้งหมด 10 ตัว ชั่งน้ำหนัก วัดความยาว แล้วแยกอวัยวะแต่ละส่วน คือ เหงือก ตับ ลำไส้ เมื่อเพาะเชื้อจากแต่ละส่วนลงบนอาหาร TSA สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 7 ชนิด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

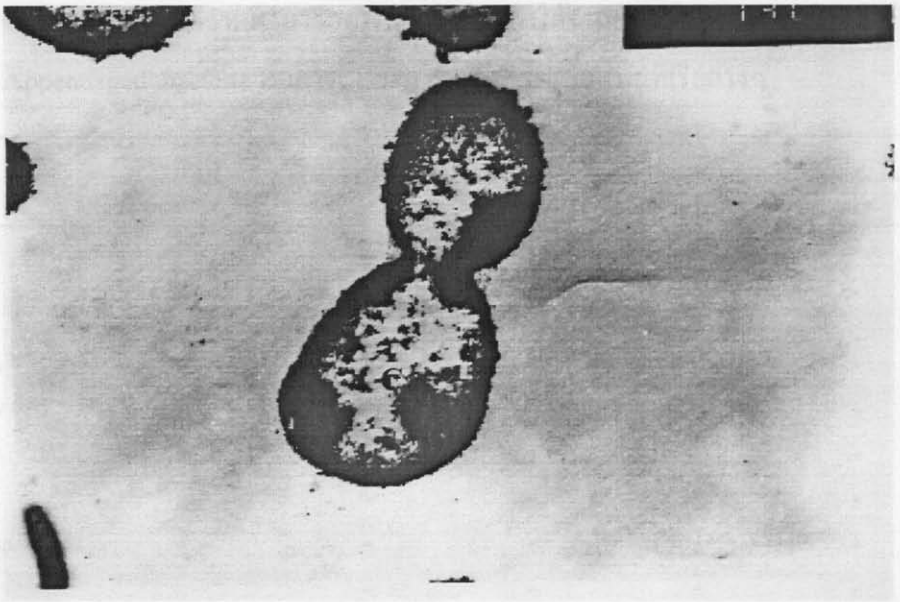
1. กลุ่มวิบริโอ พบทั้งหมด 4 ชนิด คือ *V. carchariae*, *V. pelagius* II, *V. mediterranei* และ *Vibrio* sp.

2. กลุ่มแกรมลบรูปท่อนไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส (glucose-non-ferment gram negative bacilli) มี 2 ชนิด คือ *Pseudomonas* sp. และ *Alcaligenes* sp

3. กลุ่ม Budding และ/หรือ Appendaged bacteria

ลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อมากกว่าที่จะแบ่งตัว และมีแขนยื่นออกไปจากตัวเซลล์ เคลื่อนที่แบบเป็นคลื่นจากจุดศูนย์กลาง (swarmer) แต่ครู่หนึ่งก็จะหยุดเคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารแข็งจะมีขนาดเล็ก ใส และแวววาว โคโลนีแก่เป็นวงที่จุดศูนย์กลาง ลักษณะของเซลล์ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงดังภาพที่ 14 และ 15

ภาพที่ 14 ลักษณะของ Budding และ หรือ Appendaged bacteria (a) แสดงให้เห็นเซลล์ที่กำลังแตกหน่อ (budding) (b) บางเซลล์ก็เป็นลักษณะของ binary fission (SEM 3,500 X)



ภาพที่ 15 ภาพตัดขวางของเซลล์ Budding และ หรือ Appendaged bacteria บริเวณสีเข้ม คือส่วนของโครมาติน (c ) (ย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate) (TEM 5.000 x )

การศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างสารที่ผลิตออกมานอกเซลล์หรือผลิตภายในเซลล์ของ Budding และ หรือ Appendaged bacteria ที่อาจมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น ผลปรากฏว่าสารละลายส่วนใสในการเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตลอดจนสารละลายส่วนใสที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก ก็ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ เช่นกัน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความสามารถของสารละลายที่ได้จากการเลี้ยง Budding และ/หรือ Appendaged bacteria ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่างๆ

| ชนิดแบคทีเรีย | 24 ชม. | | 48 ชม. | | 72 ชม. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | centrifuge | sonicate | centrifuge | sonicate | centrifuge | sonicate |
| *V. pelagius II* | + | + | + | + | + | + |
| *V. carchariae* | + | + | + | + | + | + |
| *V. alginolyticus* | + | + | + | + | + | + |
| *V. mediterranei* | + | + | + | + | + | + |
| *V. splendidus* I | - | - | + | + | + | + |
| *V. nereis* | - | - | + | + | + | + |
| *Pseudomonas* sp. | + | + | + | + | + | + |
| *Alcaligenes* sp. | + | - | + | + | + | + |

centrifuge = สารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง Budding และ หรือ Appendaged bacteria

sonicate = สารละลายส่วนใสที่ได้จากการทำให้เซลล์ Budding และ/หรือ Appendaged bacteria แตก โดยใช้เสียงคลื่นความถี่สูง

\+ = แบคทีเรียที่ทดสอบมีการเจริญในบริเวณที่หยดสารละลาย

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั้ง 3 อวัยวะ คือ เชื้อ *Vibrio* และ *Alcaligenes* ส่วน *Pseudomonas* พบเฉพาะในตับและลำไส้ สำหรับ Budding และ/หรือ Appendaged bacteria พบเฉพาะในเหงือกเท่านั้นและพบในหอยทุกตัว โดยในเหงือกพบแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ Budding และ/หรือ Appendaged bacteria ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ $4.5 \times 10^{4}$-$1.1 \times 10^{6}$ cfu/ กรัม ส่วนอีก 5 ชนิดพบในหอยบางตัว คือ *V. carchariae* ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 0-$1.2 \times 10^{4}$ cfu/กรัม *V. pelagius* II มีปริมาณตั้งแต่ 0-$2.5 \times 10^{3}$ cfu/กรัม *V. mediterranei* มีปริมาณตั้งแต่ 0-$7.5 \times 10^{3}$ cfu/กรัม *Vibrio* sp. มีปริมาณตั้งแต่ 0-$5.5 \times 10^{3}$ cfu/กรัม และ *Alcaligenes* sp. มีปริมาณตั้งแต่ 0-$2.84 \times 10^{5}$ cfu/กรัม ส่วน *Pseudomonas* sp. เป็นเพียงชนิดเดียวที่ไม่พบเลยในเหงือก ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในเหงือกเฉลี่ยเท่ากับ $4.14 \times 10^{5}$ cfu/กรัม (ตารางที่ 11)

ส่วนในตับพบแบคทีเรียทั้งหมด 6 ชนิด *Pseudomonas* เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบในหอยทุกตัว มีปริมาณตั้งแต่ 100-1.500 cfu/กรัม ส่วนอีก 5 ชนิดพบในหอยบางตัว คือ *V. carchariae* ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 0-700 cfu/กรัม *V. pelagius* II มีปริมาณตั้งแต่ 0-800 cfu/กรัม *V. mediterranei* มีปริมาณตั้งแต่ 0-1.900 cfu/กรัม *Vibrio* sp. มีปริมาณตั้งแต่ 0-1.300 cfu/กรัม และ *Alcaligenes* sp. มีปริมาณตั้งแต่ 0-4.500 cfu/กรัม ส่วน Budding และ/หรือ Appendaged bacteria เป็นเพียงชนิดเดียวที่ไม่พบเลยในตับ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับเฉลี่ยเท่ากับ 2.630 cfu/กรัม (ตารางที่ 12)

สำหรับแบคทีเรียในลำไส้พบ 6 ชนิด *Pseudomonas* เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบในลำไส้หอยทุกตัวโดยมีปริมาณตั้งแต่ $1 \times 10^4$-$8 \times 10^5$ cfu/กรัม ส่วนอีก 5 ชนิดพบในหอยบางตัว คือ *V. carchariae* ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 0-$9 \times 10^5$ cfu/กรัม *V. pellagius* II มีปริมาณตั้งแต่ 0-$1 \times 10^5$ cfu/กรัม *V. mediterranei* มีปริมาณตั้งแต่ 0-$1.6 \times 10^6$ cfu/กรัม *Vibrio* sp. มีปริมาณตั้งแต่ 0-$1.1 \times 10^6$ cfu/กรัม และ *Alcaligenes* sp. มีปริมาณตั้งแต่ 0-$1.4 \times 10^6$ cfu/กรัม ส่วน Budding และ/หรือ Appendaged bacteria เป็นเพียงชนิดเดียวที่ไม่พบเลยในลำไส้ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยเท่ากับ $1.41 \times 10^6$ cfu/กรัม (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 11 ชนิดและปริมาณแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนเหงือกของหอยปกติ (cfu/ กรัม)

| หอยตัวที่ | ชนิดแบคทีเรีย | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *V. carcharae* | *V. pelagius II* | *V. mediterranei* | *Vibrio sp.* | *Alcaligenes* sp. | Budding bacteria | รวม |
| 1 | $1.2 \times 10^4$ | $1.8 \times 10^4$ | 0 | 0 | $2.32 \times 10^5$ | $3.2 \times 10^5$ | $5.66 \times 10^5$ |
| 2 | 0 | 0 | 500 | 0 | $2.2 \times 10^5$ | $1.1 \times 10^6$ | $1.32 \times 10^6$ |
| 3 | $1 \times 10^4$ | $2.5 \times 10^4$ | $1.5 \times 10^4$ | 0 | $1.5 \times 10^5$ | $2.28 \times 10^5$ | $3.83 \times 10^5$ |
| 4 | 500 | $1 \times 10^4$ | $2.5 \times 10^4$ | 0 | $1.4 \times 10^5$ | $1.9 \times 10^5$ | $3.34 \times 10^5$ |
| 5 | 0 | 500 | $7.5 \times 10^4$ | 0 | $2.84 \times 10^5$ | $2.4 \times 10^5$ | $5.32 \times 10^5$ |
| 6 | 0 | 0 | $2 \times 10^4$ | $5.5 \times 10^4$ | 0 | $2.4 \times 10^5$ | $2.48 \times 10^5$ |
| 7 | 0 | 0 | $6 \times 10^4$ | $1.5 \times 10^4$ | 0 | $1.68 \times 10^5$ | $1.76 \times 10^5$ |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $4.5 \times 10^4$ | $4.5 \times 10^4$ |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $4.8 \times 10^5$ | $4.8 \times 10^5$ |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | $6 \times 10^4$ | $6 \times 10^4$ |
| เฉลี่ย | $1.35 \times 10^4$ | 580 | $2 \times 10^4$ | 700 | $1.03 \times 10^5$ | $3.07 \times 10^5$ | $4.14 \times 10^5$ |
| เปอร์เซ็นต์เชื้อในเหงือก | 0.33 | 0.14 | 0.48 | 0.17 | 24.9 | 74 | 100 |

ตารางที่ 12 ชนิดและปริมาณแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนตับของหอยปกติ ( cfu/ กรัม)

| หอยตัวที่ | ชนิดแบคทีเรีย | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *V. carcharae* | *V. pelagius II* | *V. mediterranei* | *Vibrio* sp. | *Pseudomonas* sp. | *Alcaligenes* sp. | รวม |
| 1 | 700 | 800 | 0 | 0 | 1,500 | 2,000 | 5,000 |
| 2 | 0 | 0 | 1,900 | 0 | 200 | 1,800 | 3,900 |
| 3 | 200 | 500 | 1,100 | 0 | 1,200 | 600 | 3,600 |
| 4 | 100 | 200 | 700 | 0 | 100 | 1,900 | 3,000 |
| 5 | 0 | 0 | 200 | 0 | 500 | 4,500 | 5,200 |
| 6 | 0 | 0 | 100 | 1,300 | 200 | 0 | 1,600 |
| 7 | 0 | 0 | 200 | 600 | 200 | 0 | 1,000 |
| 8 | 0 | 0 | 100 | 800 | 100 | 0 | 1,000 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 1,100 | 100 | 0 | 1,200 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 700 | 100 | 0 | 800 |
| เฉลี่ย | 100 | 150 | 430 | 450 | 420 | 1,080 | 2,630 |
| เปอร์เซ็นต์เชื้อในตับ | 3.8 | 5.7 | 16.3 | 17.1 | 16.0 | 41 | 100 |

ตารางที่ 13 ชนิดและปริมาณแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วนลำไส้ของหอยปกติ ( cfu/ กรัม)

| หอยตัวที่ | ชนิดแบคทีเรีย | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *V. carcharae* | *V. pelagius II* | *V. mediterranei* | *Vibrio* sp. | *Pseudomonas* sp. | *Alcaligenes* sp. | รวม |
| 1 | $9 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ | 0 | 0 | $5 \times 10^5$ | $4 \times 10^5$ | $1.9 \times 10^6$ |
| 2 | $2 \times 10^4$ | $7 \times 10^4$ | $1.5 \times 10^5$ | 0 | $3 \times 10^4$ | $4.7 \times 10^5$ | $7.4 \times 10^5$ |
| 3 | $2 \times 10^5$ | $8 \times 10^4$ | $7 \times 10^5$ | 0 | $8 \times 10^5$ | $1.4 \times 10^6$ | $3.18 \times 10^6$ |
| 4 | $5 \times 10^4$ | $3 \times 10^4$ | $3.7 \times 10^5$ | 0 | $3 \times 10^5$ | $1.6 \times 10^5$ | $9.1 \times 10^5$ |
| 5 | $2 \times 10^4$ | $3 \times 10^4$ | $4.5 \times 10^5$ | 0 | $6 \times 10^4$ | $1.2 \times 10^6$ | $1.76 \times 10^6$ |
| 6 | 0 | 0 | $1.6 \times 10^6$ | $1.1 \times 10^6$ | $3.8 \times 10^5$ | 0 | $3.08 \times 10^6$ |
| 7 | 0 | 0 | $3.5 \times 10^5$ | $3.5 \times 10^5$ | $7 \times 10^4$ | 0 | $7.7 \times 10^5$ |
| 8 | 0 | 0 | 0 | $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^4$ | 0 | $2 \times 10^4$ |
| 9 | 0 | 0 | $7 \times 10^5$ | $9 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ | 0 | $1.7 \times 10^6$ |
| 10 | 0 | 0 | $1 \times 10^4$ | $5 \times 10^4$ | $2 \times 10^4$ | 0 | $8 \times 10^4$ |
| เฉลี่ย | $1.19 \times 10^5$ | $3.1 \times 10^4$ | $4.33 \times 10^5$ | $2.41 \times 10^5$ | $2.27 \times 10^5$ | $3.63 \times 10^5$ | $1.41 \times 10^6$ |
| เปอร์เซ็นต์เชื้อในลำไส้ | 8.44 | 2.20 | 30.7 | 17.09 | 16.10 | 25.70 | 100 |

**5. ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ**

จากการนำเชื้อแบคทีเรียทั้งที่ก่อให้เกิดโรคโดยแท้จริง และทั้งที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยเป๋าฮื้อแต่มีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็นพวกฉวยโอกาส มาทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disc sensitivity test โดยใช้ยา 5 ชนิด คือ คลอแรมเฟนนิคอล. ออกโซลินิก แอซิด ซัลฟาเมทท็อกซาโซลร่วมกับไตรเมทโทปริม. นอร์ฟล็อกซาซิน และออกซีเตตราซัยคลิน ผลการศึกษาพบว่าเชื้อทุกชนิดที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนตำบลนาทับจะมีความไว (sensitive. S) ต่อยาซัลฟาฯ ร่วมกับไตรเมทโทปริม. ออกโซลินิก แอซิด. คลอแรมเฟนนิคอล และ นอร์ ฟล็อก ซาซิน แต่พบว่าเชื้อ 2 ชนิดมีการดื้อต่อยา (resistance. R) ออกซีเตราซัยคลิน (ตารางที่ 14)

สำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่ง (เก็บตัวอย่างครั้งที่1) พบว่าเชื้อทุกชนิด (ยกเว้น *Alcaligenes* sp.ไม้ได้ทดสอบ) มีความไวต่อยาซัลฟาฯ ร่วมกับไตรเมทโทปริม. ออกโซลินิก แอซิด. คลอแรมเฟนนิคอล และ นอร์ ฟล็อก ซาซิน แต่พบว่าเชื้อ 2 ชนิด มีการดื้อต่อยาออกซีเตราซัยคลิน (ตารางที่15) (แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางรอยใสที่วัดได้จริงในภาคผนวก ข) ส่วนการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่งในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 พบว่าเชื้อมีความไวต่อยาทุกชนิด คือ ซัลฟาฯร่วมกับไตรเมทโทปริม ออกโซลินิก แอซิด คลอแรมเฟนนิคอล. นอร์ฟล็อกซาซิน. และออกซีเตตราซัยคลิน (ตารางที่ 16)

ส่วนในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยรุนแรง ที่หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เชื้อที่แยกได้จากหอยป่วยทุกตัวมีความไวต่อยาทุกชนิด คือซัลฟาฯร่วมกับไตรเมทโทปริม ออกโซลินิก แอซิด. คลอแรมเฟนนิคอล. นอร์ฟล็อกซาซิน และ ออกซีเตตราซัยคลิน (ตารางที่ 17)

ตารางที่14 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนตำบลนาทับ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา

| ชนิดเชื้อ | ชนิดยา | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SXT | OA | C | NOR | OT |
| *V. pelagius II* | S | S | S | S | R |
| *V.mediterranei* | S | S | S | S | S |
| *Pseudomonas* | S | S | S | S | R |

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยจฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่ง (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)

| ชนิดเชื้อ | ชนิดยา | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SXT | OA | C | NOR | OT |
| *V. pelagius II* | R | S | S | S | R |
| *V. splendidus I* | S | S | S | S | S |
| *V. nereis* | S | S | S | S | S |
| *V. alginolyticus* | S | S | S | S | S |
| *V. carcharriae* | S | S | S | S | S |
| *V. mediterranei* | S | S | S | S | S |
| *Pseudomonas* | S | S | S | S | R |

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยจากฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่ง (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)

| ชนิดเชื้อ | ชนิดยา | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SXT | OA | C | NOR | OT |
| *V. mediterranei* | S | S | S | S | S |

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยป่วยที่ติดเชื้อรุนแรง จากหน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

| หอยตัวที่ | ส่วนที่นำมาเพาะเชื้อ | ชนิดยา | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | SXT | OA | C | NOR | OT |
| 1 | เลือด | S | S | S | S | S |
| | กล้ามหนอง | S | S | S | S | S |
| 2 | เลือด | S | S | S | S | S |
| 3 | เลือด | S | S | S | S | S |
| | แผล | S | S | S | S | S |
| 4 | เลือด | S | S | S | S | S |
| | กล้ามหนอง | S | S | S | S | S |
| 5 | เลือด | S | S | S | S | S |
| | แผล | S | S | S | S | S |
| 6 | เลือด | S | S | S | S | S |
| | กล้ามหนอง | S | S | S | S | S |
| 7 | เลือด | S | S | S | S | S |
| 8 | เลือด | S | S | S | S | S |
| | กล้ามหนอง | S | S | S | S | S |
| 9 | เลือด | S | S | S | S | - |

**6. คุณภาพน้ำจากบ่อเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ**

จากการวัดคุณภาพน้ำ 4 พารามิเตอร์ คือ pH ความเค็ม อัลคาลินิตี ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณวิบริโอรวมในบ่อเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อที่ป่วยทั้ง 3 แหล่ง คือจากหน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ฟาร์มเอกชนตำบลนาทับ และฟาร์มเอกชนอำเภอยะหริ่ง พบว่ามีค่า pH เฉลี่ย เท่ากับ 8.36. 8.1 และ 8.02 ตามลำดับ ส่วนความเค็มมีค่าเท่ากับ 31. 30 และ 31 ppt ตามลำดับ อัลคาลินิตีเท่ากับ 106. 102 และ 105 ตามลำดับ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (ไม่ได้ตรวจวัดแหล่งที่ 1) ส่วนแหล่งที่ 2 และ 3 เท่ากับ 7.8 และ 7.6 ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียรวม เท่ากับ $1.69 \times 10^{4}$. $1.32 \times 10^{5}$ และ $6.38 \times 10^{3}$ cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณวิบริโอรวมเท่ากับ $8.69 \times 10^{3}$. $4.58 \times 10^{2}$ และ $6.80 \times 10^{2}$ cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 คุณภาพน้ำที่ตรวจวัดจากบ่อเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อที่ป่วยจากแหล่งต่างๆ

| แหล่งเก็บตัวอย่าง | pH | ความเค็ม (ppt) | อัลคาลินิตี (as mg $CaCO_3$ L) | ปริมาณออกซิเจน (mg/L) | ปริมาณแบคทีเรียรวม (cfu / ml) | ปริมาณวิบริโอรวม (cfu / ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 8.36 | 31 | 106 | - | $1.69 \times 10^4$ | $8.96 \times 10^3$ |
| 2 | 8.10 | 30 | 102 | 7.8 | $1.32 \times 10^5$ | $4.58 \times 10^2$ |
| 3 | 8.02 | 31 | 105 | 7.6 | $6.38 \times 10^3$ | $6.80 \times 10^2$ |

1 หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ (ตำบลสะกอม อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา) ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

2 ฟาร์มเอกชน ตำบลนาทับ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา

3 ฟาร์มเอกชน อำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)

Fu (colony formming unit)

## วิจารณ์ผลการศึกษา

1. ลักษณะอาการและเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอยเป๋าฮื้อป่วย

จากการศึกษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในหอยเป๋าฮื้อในครั้งนี้ พบว่าหอยมีอาการป่วยอยู่เสมอๆ ในแหล่งเลี้ยง 2 แหล่ง แต่เป็นอาการป่วยที่ไม่รุนแรงมากนักและมีอัตราการตายต่ำ โดยทยอยตายครั้งละประมาณ 1-2 ตัว ในระยะเวลาห่างกัน ส่วนอีก 1 แหล่งเลี้ยงแสดงอาการป่วยรุนแรงมากและทยอยตายอย่างรวดเร็วจนแทบหมดบ่อในระยะเวลาอันสั้น

จากการเก็บตัวอย่างหอยป่วยที่มีอาการและอัตราการตายไม่รุนแรง มาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนั้นพบว่าเชื้อที่แยกได้จากหอยป่วยส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อวิบริโอ แต่จากการทดสอบหาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคโดยแท้จริงโดยฉีดเชื้อเข้าสู่หอยปกติพบว่ามีเพียง 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคที่มีอาการรุนแรง คือ *V. splendidus* I และ *V. alginolyticus* ส่วน *V. nereis* นั้นแม้สามารถก่อให้เกิดแผลหนองแต่หอยสามารถมีชีวิตได้ตามปกติจนสิ้นสุดการทดลอง และแผลหนองที่เคยปรากฏกลับหายตามปกติ ซึ่งแสดงว่าเชื้อชนิดนี้อาจจะเป็นเชื้อที่ไม่รุนแรง ส่วนเชื้อที่แยกได้จากหอยเป๋าฮื้อที่แสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงที่หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ไม่สามารถทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีจนถึงระดับที่จะแยกชนิดได้เนื่องจากเชื้อตายในระหว่างเก็บรักษา แต่ทราบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แท่งสั้น ปฏิกิริยา ออกซิเดสให้ผลบวกและเจริญได้ดีบนอาหาร TCBS ซึ่งเป็นอาหารที่จำเพาะ (selective media) สำหรับการเจริญของเชื้อวิบริโอให้โคโลนีสีเขียว (ไม่หมักย่อยน้ำตาลซูโครส) แทบทั้งหมด ทั้งที่แยกได้จากเลือดและจากตุ่มหนอง

ของหอยป่วย แม้จะมีเชื้อวิบริโอที่ให้โคโลนีสีเหลืองบ้างเล็กน้อยแต่ไม่น่าจะเป็นชนิดที่ก่อโรค ส่วนลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร TSA นั้น มีลักษณะเดียวกันและเด่นมาก คือ โคโลนีขุ่น ขนาดเล็ก และเมื่อนำมาทดสอบบนอาหาร TCBS ก็ให้โคโลนีสีเขียวเช่นเดียวกับที่แยกได้จากหอยป่วยในการแยกเชื้อเริ่มต้นบนอาหาร TCBS ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเชื้อ วิบริโอชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดอาการของโรคอย่างรุนแรงในครั้งนี้ และถึงแม้จะไม่ได้ทดสอบการก่อให้เกิดโรค แต่หากสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ชนิดเดียวกันเกินกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนหอยป่วยทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าเชื้อนั้นน่าจะเป็นสาเหตุของโรค (Prof. K. Muroga. personal communication) และกิจการ และคณะ (2539) กล่าวว่าเชื้อกลุ่มวิบริโอมักจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อยและน้ำเค็ม นอกจากนี้ สถาพร และคณะ (2529) รายงานว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซีสในปลากะพงขาวนั้น เป็นกลุ่มของเชื้อวิบริโอเช่นเดียวกัน เช่น *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ส่วนเชื้อวิบริโอที่ก่อให้โรคในกุ้ง เช่น *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnitucus*, *V. damsela*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis* เป็นต้น (Jiravanichpaisal and Miyazaki, 1994) สำหรับเชื้อที่ก่อโรคในหอยส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อวิบริโอเช่นกัน เช่น *V. anguillarum* และ *V. alginolyticus* ซึ่งก่อให้เกิดการตายในลูกหอยวัยอ่อนของหอยเชลล์ (*Argopecten purpuratus*) (Riquelme *et al*., 1996) *V. tubiashii* และ *V. anguillarum* ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยวัยอ่อนในโรงเพาะฟักที่ชายฝั่งประเทศสเปน (Lodeiros *et al*., 1987) เป็นต้น

สำหรับอาการของหอยเป๋าฮื้อที่ป่วยรุนแรงที่หน่วยวิจัยเพาะฟักสัตว์น้ำ ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คือ ส่วนใหญ่กล้ามเนื้อฝ่าเท้ามีแผลหนองหลายบริเวณ กล้ามเนื้อเท้าอ่อนแอ หดตัวลีบลง เมื่อวางหงายไม่สามารถใช้กล้ามเนื้อเท้าดันพลิกกลับตัวได้เหมือนหอยปกติทั่วไป มีการตายอย่างรุนแรงเช่นเดียวกับการรายงานการเกิดโรคเท้าเปื่อยในหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ที่ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ อันมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Vibrio* sp. (นันทริกา, 2541) และอาการลักษณะนี้ก็เกิดขึ้นในหอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* ที่เกิดการติดเชื้อ *V. alginilyticus* (Elston, 1983a) และพบว่ามีแผลที่เป็นหนองเกิดขึ้นในหอยเป๋าฮื้อ *H. discus hannai* ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *V. fluvialis* II เช่นกัน ซึ่งสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากกล้ามเนื้อเท้าของหอยป่วย (Taiwu *et al*., 1996) นอกจากนี้การเกิดแผลที่มีสาเหตุจากการทำลายโดยเชื้อแบคทีเรียสามารถพบได้ในหอยมุก *Pinctada maxima* ที่ติดเชื้อ *V. harveyi* (Pass *et al*., 1987) ส่วนหอยที่ป่วยไม่รุนแรงแม้จะไม่ปรากฏแผลหนองและมีอัตราการตายไม่รุนแรง แต่เมื่อทดสอบการทำให้ติดเชื้อโดยการฉีดพบว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค 2 ชนิด คือ *V. splendidus* I และ *V. alginolyticus* สามารถก่อให้เกิดอาการและการตายที่รุนแรงได้เช่นเดียวกัน อาจเนื่องจากในหอยป่วยไม่รุนแรงขณะนั้นมีปริมาณเชื้อที่ก่อโรคในหอยป่วยขณะนั้นน้อยอยู่ ในการทดลองฉีดเชื้อ 8 ชนิด ที่แยกได้ทั้งจาก

เลือดและทางเดินอาหารของหอยป่วยกลับเข้าสู่หอยปกติ การเกิดผลเช่นเดียวกับการรายงานของ (Elston. 1983a) กล่าวว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* ที่ติดเชื้อได้ 6 ชนิด แต่ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมีเพียงชนิดเดียว คือ *V. alginolyticus*

ในการทดลองครั้งนี้เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทำให้หอยตายเพียงบางส่วน โดยแต่ละเชื้อทำให้หอยตายเพียง 2 ใน 3 ตัว และสังเกตอาการได้ในวันที่ 2 และ 3 หลังจากได้รับเชื้อ โดยพบอาการเริ่มแรกเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในหอยที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงในบ่อเลี้ยง คือ กล้ามเนื้อเท้าหดลีบ อ่อนแอ มีแผลหนองที่ฝาเท้า และมักขึ้นมาเกาะที่บริเวณผิวน้ำ เมื่อวางหงายไม่สามารถดันพลิกตัวเองกลับได้ ส่วนหอยที่ไม่มีอาการของโรคและมีชีวิตรอดตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือนนั้นเป็นหอยที่มีขนาดใหญ่ อาจเนื่องจากเชื้อที่ฉีดเข้าไปมีความรุนแรงต่ำลงเพราะผ่านการถ่ายเชื้อ หลายครั้ง และประกอบกับหอยขนาดใหญ่จะมีความด้านทานโรคได้ดีกว่า เพราะหอยที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ล้วนมีความแข็งแรงทั้งสิ้น ซึ่งการเกิดผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Pass และคณะ (1987) พบว่าในการทดสอบการก่อให้เกิดโรคของเชื้อที่แยกได้จากหอยมุกป่วย โดยให้เชื้อ *V. harveyi* $10^8$ cfu/ml ปริมาณ 0.1 ml ตัว เข้าไปในช่องผนังหุ้มลำตัวของหอยมุกปกติ พบว่าหอยบางตัวเท่านั้นที่พัฒนาอาการของโรคโดยแสดงอาการภายใน 3 วันหลังจากได้รับเชื้อ ส่วนที่ไม่แสดงอาการสามารถมีชีวิตรอดตลอดการทดลองในเวลา 32 วัน ซึ่งโดยปกติแล้วในหอยทั่วไปจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย โดยเม็ดเลือดจะเกิดการเข้ามาล้อมรอบและทำลายเซลล์แปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) (Lane and Birkbeck. 1999) และจากการศึกษาในหอยเป๋าฮื้อ *H. discus hannai* พบกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่สำคัญ คือ เซลล์เม็ดเลือด (leukocytes) 3 ชนิด ทำหน้าฟาโกไซโตซีส ร่วมกับปฏิกิริยา agglutination (Taiwu *et al.* 1997) ดังนั้นหอยที่แข็งแรงจึงสามารถที่จะมีชีวิตรอดได้

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. alginolyticus* จะมีความแตกต่างของคุณสมบัติทางชีวเคมีจากเอกสารเทียบเคียงที่ใช้แยกชนิดเชื้ออยู่บางประการคือ ไม่เจริญที่ 40 องศาเซลเซียส. 10 เปอร์เซ็นต์ NaCl และผลของ VP เป็นลบ ซึ่งเป็นข้อบกพร่องของวิธีการแยกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ที่มีความไม่แน่นอนของบางคุณสมบัติเกิดขึ้นได้เสมอ ทำให้ไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัด ประกอบกับเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ (mutation) เกิดขึ้นอยู่เสมอ เนื่องจากการได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ แต่วิธีนี้ก็เป็นวิธีที่ยังได้รับความนิยมอยู่เนื่องจากค่าใช้จ่ายต่ำและวิธีการไม่สลับซับซ้อน ถึงแม้ว่า ในปัจจุบันจะมีการพัฒนาเทคนิคการแยกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบนสาย ดีเอ็นเอ (16S rRNA sequence) ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้แม่นยำยิ่งขึ้น แต่ก็ยังไม่แพร่หลายเนื่องจาก ค่าใช้จ่ายสูงมาก อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ที่แยกได้นั้นมีรายงานการก่อโรครุนแรงในหอยหลายชนิดดังที่กล่าวใน

ส่วนการศึกษาจากเอกสาร สำหรับในหอยเป้าฮื้อพบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ก่อโรคในลูกหอยเป้าฮื้อวัยอ่อน (*H. rufescens*) (Anguiano *et a.l.*, inpress อ้างโดย Lizarraga- Partida *et al.*, 1998) และในระยะวัยอ่อนตอนปลาย (Elston. 1983a : Elston. 1983b : Anguiano *et al.* 1998) สำหรับ *V. splendidus* I ถึงแม้จะไม่เคยมีรายงานการก่อโรคในหอยเป้าฮื้อ แต่เชื้อกลุ่มนี้ก็มีรายงานการก่อโรคในหอยชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อ *V. splendidus* II ได้ก่อให้เกิดการตายในลูกหอยนางรมวัยอ่อน (*C. gigas*) ในโรงเพาะฟักในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งจากการทดลองให้เชื้อ $10^5$ cfu/ml ทำให้ลูกหอยวัยอ่อนตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (Sugumar *et al.*, 1998) และกลุ่มของเชื้อ *V. splendidus* อีกชนิดหนึ่ง คือ *V. pectinicida* ซึ่งเป็นเชื้อวิบริโอชนิดใหม่ที่พัฒนามาจากเชื้อ *V. splendidus* ได้ก่อโรคในหอยเชลล์วัยอ่อน (*Agopecten maximus*) (Lambert *et al.*, 1999) สำหรับเชื้อ *V. nereis* นั้น สามารถแยกเชื้อได้จากเลือดของหอยป่วยเช่นกัน แต่เมื่อทดสอบการเกิดโรคปรากฏว่าสามารถสังเกตเห็นแผลหนองในวันที่ 6 แต่คงจะมีการพัฒนาอาการมาก่อนแล้ว แต่ไม่ปรากฏรายงานการก่อโรคในหอยของเชื้อชนิดนี้มาก่อน อาจเนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่มีความรุนแรงมากนัก ประกอบกับหอยมีขนาดใหญ่และแข็งแรงจึงสามารถต่อต้านเชื้อได้ดี

อย่างไรก็ตามในหอยป่วยบางตัวที่ไม่สามารถแยกเชื้อที่ก่อโรคได้โดยแยกได้เพียงแบคทีเรียประจำถิ่นจากเลือดและทางเดินอาหาร ซึ่งในสภาพจริงหอยปกติจะไม่พบแบคทีเรียในเลือด เนื่องจากหอยเป้าฮื้อจะมีระบบกำจัดสิ่งแปลกปลอมดังที่กล่าวมาข้างต้น เช่นเดียวกับการรายงานของ Pass และคณะ (1987) พบว่าในเลือดของหอยมุกปกติจะไม่พบเชื้อแบคทีเรีย ส่วนในหอยที่ป่วยสามารถพบเชื้อแบคทีเรีย 75 เปอร์เซ็นต์ของหอยป่วยทั้งหมด และสามารถแยกเชื้อได้จากเลือดและทางเดินอาหาร เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งในหอยเป้าฮื้อป่วยบางตัวที่พบเฉพาะแบคทีเรียประจำถิ่นในเลือดนั้น จากลักษณะทางพยาธิสภาพสามารถเห็นการเข้ามาล้อมรอบเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด เป็นลักษณะของโนดูล ฟอร์เมชันเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงการมีสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อ ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ 2 กรณี คือ กรณีที่หนึ่ง ในหอยป่วยกลุ่มนี้แบคทีเรียประจำถิ่นอาจจะเป็นตัวก่อโรคเมื่อหอยเกิดความเครียดและอ่อนแอ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันขาดประสิทธิภาพเชื้อพวกนี้จึงเป็นพวกฉวยโอกาสในการก่อโรคได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Colwell และ Spark (1967) พบว่า *Pseudomonas* sp.คาดว่าเป็น *P. enalia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยนางรม *C. gigas* สามารถก่อให้เกิดการตายในหอยนางรมเต็มวัยได้เช่นกันเมื่อฉีดเชื้อเข้าไป 0.1 ml/ตัว ในหอยทั้งหมด 19 ตัว แต่มีอัตราการตายที่ไม่รุนแรง คือ มีการตายเพียง 2 ตัว โดยตัวที่ 1 ตายในวันที่ 4 และอีก 1 ตัว ตายในวันที่ 8 ส่วนที่เหลือมีชีวิตรอดตลอดการทดลอง แต่ลักษณะทางพยาธิสภาพของหอยที่ตายนั้นมีการถูกทำลายเนื้อเยื่ออย่างชัดเจน แต่ในการทดลองฉีดเชื้อประจำถิ่นในครั้งนี้พบว่าไม่ก่อให้เกิดการตายอาจเนื่องจากหอยมีขนาดใหญ่และมีความแข็งแรงสมบูรณ์ ประกอบกับเชื้อไม่มีความ รุนแรง จึงไม่ก่อให้เกิดอาการ

เพราะแม้แต่เชื้อที่มีความรุนแรงสูงนั้นยังไม่สามารถทำให้หอยที่มีขนาดใหญ่ตายได้ทั้งหมด กรณีที่สองคือ ไม่สามารถแยกเชื้อที่ก่อโรคโดยแท้จริงจากหอยป่วยบางตัวได้ เนื่องจากอาจจะมีเชื้อในปริมาณน้อยจึงแยกไม่พบ เช่นเดียวกับการรายงานของ Pass และ คณะ (1987) กล่าวว่า ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากหอยมุก *P. maxima* ที่ป่วยอันมีสาเหตุจากเชื้อ *V. harveyi* นั้นไม่สามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากหอยป่วยทุกตัว

2. การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ

จากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อพบว่าในหอยที่ป่วยรุนแรงปรากฏเซลล์แบคทีเรียในเนื้อเยื่อ มีการเข้ามาล้อมรอบเซลล์สิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด เส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลาย และเม็ดเลือดที่เข้ามาทำลายเชื้อแบคทีเรียก็มีการตายเช่นกัน เนื้อเยื่อเริ่มมีการตายขยายวงกว้างขึ้นเรื่อยๆ และกลายสภาพเป็นโพรงหนอง ซึ่งลักษณะทางพยาธิสภาพเหล่านี้เกิดขึ้นทั้งในหอยป่วยในบ่อเลี้ยงและในการทดลอง ส่วนในหอยที่ติดเชื้อไม่รุนแรงนั้นมีการล้อมรอบเซลล์สิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด เช่นกัน แม้จะไม่มีการพัฒนาเป็นโพรงหนอง ซึ่งลักษณะการทำลายเนื้อเยื่อในครั้งนี้เช่นเดียวกับรายงานของ Elston (1983a) พบว่าลักษณะการทำลายเนื้อเยื่อของเชื้อ *V. alginolyticus* ในหอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* โดยพบเซลล์แบคทีเรียในเนื้อเยื่อและมีการตายของเนื้อเยื่อที่แบคทีเรียเจริญไปถึง และการติดเชื้อส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่บริเวณกล้ามเนื้อเท้า ส่วน Pass และคณะ (1987) พบว่าลักษณะเนื้อเยื่อของหอยมุก *P. maxima* ที่ติดเชื้อ *V. harveyi* นั้น เยื่อบุผิวของผนังหุ้มลำตัวถูกทำลายและ มีการกักล้อมของ phagocytic cell ในขณะที่ลักษณะเนื้อเยื่อของหอยปกติจะไม่มีการกักล้อมรอบเซลล์ เนื้อเยื่อไม่มีการถูกทำลาย โดยเส้นใยกล้ามเนื้อเรียงตัวอยู่ตามปกติ เม็ดเลือดกระจายอยู่ทั่วไปและไม่ปรากฏการเกาะกลุ่ม

3. การศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่น

สำหรับการศึกษาเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยเป๋าฮื้อ พบว่าสามารถพบเชื้อวิบริโอได้ในหอยทุกตัวอย่างและทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา เช่นเดียวกับการรายงานของ Montilla และคณะ (1994) กล่าวว่า สามารถแยกเชื้อวิบริโอได้ในหอยทุกตัวอย่างจากทั้งหมด 271 ตัว ซึ่งมีทั้งหอยนางรม หอยตลับ และหอยแมลงภู่ บริเวณเหงือกของหอยเป๋าฮื้อส่วนใหญ่จะพบ Budding และ/หรือAppendaged bacteria ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพวกนี้โดยธรรมชาติจะอาศัยอยู่เป็นอิสระและยึดเกาะทั้งสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตเนื่องจากมี stalk สำหรับยึดเกาะ (Staley and Fuerst. 1984) แต่ไม่ปรากฏรายงานว่าเคยก่อโรคในสัตว์น้ำมาก่อน เพียงแต่สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากแผลบริเวณผิวลำตัวของปลาเทอร์บอทร่วมกับ *Alteromonas haloplanktis* (Austin. 1983) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ Buddingและ/หรือAppendaged bacteria ที่ยึดเกาะอยู่ที่เนื้อเยื่อเหงือกของหอยเป๋าฮื้อเป็นจำนวนมาก

ไม่ได้มีการผลิตสารพิษที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นหรือทำลายเนื้อเยื่อเหงือกหอย แต่น่าจะอาศัยอยู่ในลักษณะเป็นปาราสิตภายนอก สำหรับในลำไส้มีปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าอวัยวะอื่นมาก (หากไม่ปรียบเทียบกับ Budding และ/หรือAppendaged bacteriaในบริเวณเหงือก) คือ มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง $2 \times 10^{4}$-$3.18 \times 10^{6}$ cfu/กรัม ในขณะที่ Sawabe และคณะ (1995) พบปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหาร (gut) หอยเป๋าฮื้อ *H. discus hannai* ในธรรมชาติ ทางตอนเหนือของประเทศญี่ปุ่นอยู่ระหว่าง $10^{6}$-$10^{9}$ cfu/กรัม อาจเนื่องจากในธรรมชาติหอยกินสาหร่ายหลายชนิดและหากินตามโขดหิน แต่ในโรงเพาะฟักหอยกินอาหารเพียงชนิดเดียว คือ สาหร่ายผมนาง และได้ผ่านการทำความสะอาดเป็นอย่างดีแล้ว ประกอบกับน้ำในโรงเพาะฟักเป็นน้ำสะอาดที่ได้ผ่านการบำบัดแล้ว ปริมาณเชื้อจึงมีน้อย ซึ่งเชื้อที่พบในทางเดินอาหารของหอยในธรรมชาติที่กล่าวมาส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส เคลื่อนที่ไม่ได้ (ไม่ได้แยกชนิด) และพบเชื้อวิบริโอ 14.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่จะพบเชื้อวิบริโอซึ่งมีปริมาณสูงถึง 58 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นเป็นพวก *Alcaligenes* และ *Pseudomonas* สำหรับ *Pseudomonas* และวิบริโอนั้น เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปในหอยต่างๆ เช่นการรายงานของ Lodeiros และคณะ (1987) พบว่าแบคทีเรียที่พบในเนื้อเยื่อพ่อแม่พันธุ์และลูกหอยวัยอ่อนที่โรงเพาะฟักบริเวณชายฝั่งของประเทศสเปนส่วนใหญ่เป็น *Pseudomonas* ส่วน Colwell และ Spark (1967) กล่าวว่าแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในหอยนางรม *C. gigas* คือ กลุ่ม *Pseudomonas. Vibrio. Achromobactor* และ *Flavobacterium* ซึ่งทั้งวิบริโอและ *Pseudomonas* มักเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ชอบฉวยโอกาสก่อโรคได้เสมอเมื่อหอยเจ้าบ้านอ่อนแอ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบแบคทีเรียที่ก่อโรคในหอยปกติ

4. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

ในการศึกษาครั้งนี้โดยส่วนใหญ่แล้วเชื้อจะมีความไวต่อยาซัลฟาฯ ร่วมกับไตรเมทโทปริม. ออกโซลินิก แอซิด. คลอแรมเฟนนิคอล และ นอร์ฟล็อกซาซิน ซึ่งจากการใช้ยาซัลฟาฯ ร่วมกับไตรเมทโทปริมในการควบคุมโรคในแหล่งเลี้ยงจริงที่ฟาร์มเอกชน อำเภอยะหริ่ง พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยทำให้ปริมาณการตายของหอยเป๋าฮื้อลดลง (กฤษฎา. ข้อมูลส่วนตัว) สำหรับยาคลอแรมเฟนนิคอลนั้นเป็นยาที่ห้ามมิให้ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค แต่สำหรับในสัตว์น้ำที่มิใช่เพื่อการบริโภค เช่น เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ น่าจะสามารถนำยาคลอแรมเฟนนิคอลมาใช้ในการควบคุมโรคในโรงเพาะฟักได้หากไม่มีทางเลือกอื่น ซึ่งจากการใช้ยาต้านจุลชีพในการควบคุมโรคที่ผ่านมาสามารถที่จะควบคุมอย่างได้ผลดังรายงานต่างๆ เช่น Tubiash และคณะ (1965) พบว่าเชื้อที่มีความไวต่อยา 4 ชนิด คือ คลอแรมเฟนนิคอล. โพลีไมซิน บี (polymycin B). อิริโทรไมซิน

(erythromycin) และ นีโอไมซิน (neomycin) เมื่อนำคลอแรมเฟนนิคอล 50 มก./ลิตร มาใช้ในการฆ่าเชื้อสามารถที่จะป้องกันการเกิดโรคในโรงเพาะฟักได้ ส่วน Lodeiros และคณะ (1987) พบว่า เชื้อที่มีความไวต่อยาคลอแรมเฟนนิคอลและไนโตรฟูแรนโตอีนนั้น เมื่อเลือกใช้คลอแรมเฟนนิคอล 50 มก./ลิตร สามารถควบคุมการตายของลูกหอยวัยอ่อน และใช้ควบคุมในถังพ่อแม่พันธุ์เพื่อป้องกันการติดเชื้อระหว่างวางไข่ได้ โดยใช้ควบคุมมิให้ปริมาณวิบริโอสูงกว่า $10^3$ cfu/ml ส่วน Quanhzhen และ Youlu (1995) พบว่ายา 3 ชนิด คือ คลอแรมเฟนนิคอลปริมาณ 0.5-5 กรัม/ลูกบาศก์เมตร. เทอราไมซิน (terramycin) 1-10 กรัม/ ลูกบาศก์เมตร และ ไซโปรฟล็อกซาซิน ไฮโดรคลอไรด์ (ciprofloxacin HCl)0.25-0.5 กรัม/ลูกบาศก์เมตร เมื่อใช้แช่ในถังลูกหอยวัยอ่อน 48 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียและควบคุมการก่อโรคได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ยาต้านจุลชีพเป็นวิธีการที่ใช้ในการควบคุมโรคอย่างได้ผลมาเป็นระยะเวลานาน แต่อย่างไรก็ตามต้องขึ้นอยู่บนพื้นฐานในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพเพื่อให้การรักษาโรคได้ผลสูงสุด เพราะเชื้อจะมีความไวต่อยาแต่ละชนิดแตกต่างกัน และบางชนิดเมื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นเวลานานอาจจะไม่ได้ผลเท่าที่ควร จะเห็นได้ว่าเชื้อบางชนิดมีการดื้อต่อยาออกซีเตตราซัยคลิน อาจเนื่องจากมีการใช้ยาชนิดนี้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาเป็นเวลานาน จึงทำให้เชื้อในสิ่งแวดล้อมเกิดการดื้อต่อยา เช่นเดียวกับการรายงานของ DiSalvo และคณะ (1978) กล่าวว่า ในการควบคุมโรคในลูกหอยวัยอ่อนในโรงเพาะฟักหอยนางรม *C. gigas* โดยใช้ยาเพนนิซิลลิน จี 50 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถลดปริมาณการตายของลูกหอยวัยอ่อนได้ แต่ต่อมาพบว่าเชื้อ *V. anguillarum* สามารถดื้อต่อยาชนิดนี้เมื่อใช้ไปเป็นระยะเวลานานๆ

5. ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ

สาเหตุการก่อโรคในครั้งนี้อาจเนื่องจากมีปริมาณเชื้อวิบริโอสูงเกินไป ประกอบกับ pH น้ำค่อนข้างสูงซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่ง Jeffries (1982) กล่าวว่า ในโรงเพาะฟักที่มีปริมาณเชื้อวิบริโอสูงเกินไปมักจะก่อโรคได้เสมอ แต่หากรักษาระดับปริมาณวิบริโอมิให้เกินกว่า $10^3$ cfu/มิลลิลิตร ได้ทุกขั้นตอนสามารถที่จะลดปัญหาการก่อโรคได้ ซึ่งในทุกแหล่งเลี้ยงพบว่ามีปริมาณเชื้อวิบริโอสูงกว่า $10^3$ cfu/มิลลิลิตร ทั้งสิ้น ซึ่ง Elston (1983a) กล่าวว่า การตายของหอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* ที่เลี้ยงแบบหนาแน่นสัมพันธ์กับความเครียดและการมีเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อวิบริโอ ความเครียดอาจเกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปเมื่อมีการถ่ายเทน้ำไม่เพียงพอ ซึ่ง Elston (1983b) กล่าวว่าในการติดตามปริมาณออกซิเจนในบ่อเลี้ยงหอย เมื่อทดลองให้หอยสัมผัสกับออกซิเจนปริมาณ 10-15.6 มก./ ลิตร ใน 3 ชั่วโมงแรกพบว่าหอยไม่สามารถเกาะได้ และเมื่อวางหงายก็ไม่สามารถพลิกตัวกลับได้ เท้าและอีพิโปเดียมบวม ที่ 41 ชั่วโมงหอยหลายตัวพยายามหนี

ออกไปจากตู้ทดลอง อาจเนื่องจากออกซิเจนแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง หอยทุกตัวติดเชื้อ *V. alginolyticus* ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้พบว่าหอยป่วยในแหล่งเลี้ยงและหอยป่วยจากการทดลองมักจะมีพฤติกรรมชอบขึ้นมาเกาะที่ผิวน้ำ แต่ไม่อาจจสรุปได้ว่าปริมาณออกซิเจนจะเป็นสาเหตุความเครียด และส่งผลให้หอยมีพฤติกรรมดังกล่าวหรือไม่ เนื่องจากไม่ปรากฏรายงานการศึกษาสภาวะออกซิเจนที่เหมาะสมในบ่อเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ

ช่องทางการติดเชื้อของหอยที่เป็นโรคในครั้งนี้เป็นไปได้ 3 กรณี คือ กรณีที่ 1 เมื่อหอย อ่อนแอและเกิดความเครียด เชื้อเข้าสู่ร่างกายก็เพิ่มปริมาณมากขึ้น ซึ่งเชื้อที่ก่อโรคอาจจะมีการเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารแล้วเจาะผนังเข้าไปในกระแสเลือด เพราะสามารถตรวจพบเชื้อที่ก่อโรคทั้งในเลือดและทางเดินอาหาร กรณีที่ 2 คือ เชื้อที่เพิ่มปริมาณมากขึ้นอาจจะเกาะที่ผิวกล้ามเนื้อเท้า แล้วปล่อยสารพิษออกมาย่อยทำลายเนื้อเยื่อเท้าก่อให้เกิดแผลแล้วเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่ง Elston (1983a) กล่าวว่าสาเหตุการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในหอยเป๋าฮื้อ *H. rufescens* นั้น อาจเนื่องจากเชื้อนี้เข้าไปทางผิวกล้ามเนื้อเท้าทำให้เกิดแผลบวมแล้วเข้าไปในกระแสเลือด เพราะปรากฏเชื้อแบคทีเรียที่ผิวกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป๋าอื้อป่วย หรือเชื้ออาจจะเข้ามาทางทางเดินอาหารแล้วก่อให้เกิดแผลเข้าไปในระบบเลือด นอกจากนี้ Elston และ Leiborite (1980) อ้างโดย McHenery และ Birkbeck (1986) พบว่าในการทดลองให้เชื้อที่ก่อโรค ลักษณะการก่อโรค คือ แบคทีเรียมาเกาะที่เพอริโอ สตราคัมและรุกรานผนังหุ้มลำตัวและเนื้อเยื่ออ่อนอื่นๆ แล้วเกิดเป็นแผลนำไปสู่การตายในที่สุด ซึ่งการก่อให้เกิดโรคของเชื้อวิบริโออาจเนื่องจากมีการปล่อยสารพิษออกมานอกเซลล์ เพราะมีรายงานการสร้างสารพิษของเชื้อวิบริโอที่ก่อโรคหลายชนิด เช่น Nottage และ Birkbeck (1986) พบว่า เชื้อวิบริโอหลายชนิด เช่น *V. anguillarum, V. odalli, V. tubiashii, Vibrio sp. V. alginolyticus* สร้างสารพิษและเป็นพิษต่อลูกหอยวัยอ่อนหอยนางรมทั้งสิ้น และมีรายงานว่า *V. anguillarum* สามารถสร้างสารพิษยับยั้งการว่ายน้ำของลูกหอยวัยอ่อนหอยต่างๆ เช่น *O. edulis* (DiSalvo *et al*., 1978 : Jeffries, 1982) และ Anguiano และคณะ (1998) พบว่า *V. alginolyticus* สามารถก่อโรคแก่ลูกหอยระยะวัยอ่อนและลูกหอยวัยอ่อนระยะสุดท้าย (post larva) ของหอยเป๋าฮื้อ red abalone โดยการทดลองให้เชื้อแก่ลูกหอยระยะว่ายน้ำและลูกหอยวัยอ่อนระยะสุดท้ายอายุ 4 วัน พบว่าปริมาณเชื้อที่มากกว่า $10^3$ cell/มิลลิลิตร ทำให้ลูกหอยเกิดการตายเป็นอย่างมากภายใน 24 ชั่วโมง ส่วน Brown และ Roland (1984) รายงานว่ามีการผลิตสารพิษของ *V. anguillarum* ซึ่งมีผลกระทบต่อลูกหอยนางรมวัยอ่อน นอกจากนี้ Nottage และ Birckbeck (1987) พบว่า *V. alginolyticus* ผลิตโปรตีนที่ทำลายเนื้อเยื่อเหงือกของหอย *M. edulis* ทำให้แยกเป็นเสี่ยงๆ ไม่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน และกรณีสุดท้าย คือ เชื้อที่ก่อโรคอาจจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในตัวหอยเองที่เป็นพวกฉวยโอกาสเมื่อหอยอ่อนแอ ซึ่ง Colwell และ Sparks(1967) กล่าวว่า แบคทีเรียที่ก่อโรคโดยทั่วไปอาจมาจากสิ่งแวดล้อมหรือมาจากตัวสัตว์เองที่เป็นพวกฉวยโอกาส