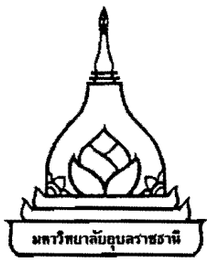


ศักยภาพของสมุนไพรไทยและสารสกัดสมุนไพรไทยในการใช้แทนยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

อดิเทพชัยย์การณ์ ภาชนะวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

POTENTIAL OF THAI HERBS AND THEIR EXTRACTS AS ALTERNATIVES TO ANTIBIOTICS FOR CONTROLLING *Streptococcus agalactiae* AND *Aeromonas hydrophila* INFECTIONS IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* Linn.)

ADITHEPCHAIKARN PACHANAWAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
MAJOR IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
YEAR 2012

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง ศักยภาพของสมุนไพรไทยและสารสกัดสมุนไพรไทยในการใช้แทนยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

ผู้วิจัย นายอดิเทพรัชย์การณ์ ภาชนะวรรณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... **อาจารย์ที่ปรึกษา**

(รองศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ)

..... **กรรมการ**

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิยม บุญพิคำ)

..... **กรรมการ**

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มชจร)

..... **กรรมการ**

(ดร.พิชญาภรณ์ สุวรรณกูฏ)

..... **คณบดี**

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2555

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สันศนีย์ ชวนะกุล ที่ได้ให้ความกรุณาใช้ห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาทดลองจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิยม บุญพิคำ และอาจารย์ ดร.พิชญาภรณ์ สุวรรณกูฏ ที่ได้สละเวลามาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิลุบล กิจอันเจริญ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Streptococcus agalactiae* และขอขอบคุณ อาจารย์ ว่าที่ ร.ต.หญิง ดร.เกศินี จันทรโสภณ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ชำนาญ แก้วมณี นักวิชาการประจำภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณ คุณประเสริฐ ศิริสม นักวิชาการประมงฟาร์มหนองขอน สาขาอุบลราชธานี และคุณประหยัด แก้วลา ผู้จัดการฝ่ายผลิตของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด มหาชน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ปลานิลแปลงเพศในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และภาควิชาเคมีที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณ ดร.โฉมยง ไชยอุบล ที่ได้ช่วยจัดพิมพ์และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณบุพการีอันเป็นที่รักและเคารพยิ่งของผู้เขียน คือ คุณแม่ประสพสุข ทิณรัตน์ ผู้ที่เป็นทั้งกำลังใจ แรงกาย แก่ผู้เขียน ขอขอบคุณ คุณอาดวงจันทร์ ภาชนะวรรณ คุณลุงอุไร ภาชนะวรรณ คุณพี่อรทัย ภาชนะวรรณ ที่ได้ให้กำลังใจ ตลอดจนญาติพี่น้องทุก ๆ คน ความรู้ ความดี ที่ผู้เขียนได้รับในครั้งนี้ผู้เขียนขออุทิศแด่ คุณพ่อสมัย ภาชนะวรรณ ผู้ล่วงลับไปแล้ว และที่สำคัญขอขอบคุณ ภรรยา คุณครูจริญญา ภาชนะวรรณ และลูกทั้ง 3 คน อันเป็นที่รักยิ่งของผู้เขียน ที่เป็นกำลังใจให้ผู้เขียนได้ต่อสู้ จนทำการศึกษาจนสำเร็จมาถึงทุกวันนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ร่วมเรียน ร่วมศึกษามาด้วยกันที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำด้วยดีมาโดยตลอด โดยเฉพาะอาจารย์ปริญญา มูลสิน อาจารย์ปนัดดา เพชรล้วน อาจารย์บงกชไพร ศรพรหม และขอขอบพระคุณทุก ๆ คน ที่ไม่อาจเอ่ยนามได้หมด ณ ที่นี้ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ถ้าหากวิทยานิพนธ์เล่มนี้เกิดผิดตกบกพร่องประการใด ผู้เขียนขออภัยมา ณ ที่โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณสำนักงานบริหารบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณงานบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนครพนม สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการที่ได้ให้ทุนในการศึกษาต่อเพื่อพัฒนาบุคลากร

(นายอดิเทพชัยย์การณ์ ภาชนะวรรณ)
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : ศักยภาพของสมุนไพรไทยและสารสกัดสมุนไพรในการใช้แทนยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

ผู้วิจัย : อดิเทพชัยย์การณ์ ภาชนะวรรณ

ชื่อปริญญา : ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ

ศัพท์สำคัญ : สมุนไพรไทย สารต้านจุลินทรีย์ ปลานิล *Streptococcus agalactiae* *Aeromonas hydrophila*

การใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคปลา โดยเกษตรกรอย่างไม่ระมัดระวังมักก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ เช่นการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค การปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในตัวปลา เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามในการหาสารชนิดอื่นมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคปลา โดยสมุนไพรเป็นสารที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากมีความปลอดภัย และหาง่าย ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของสมุนไพรไทยในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคปลา 2 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ทั้งในหลอดทดลอง และในตัวปลา สำหรับการทดสอบกับ *S. agalactiae* ได้นำสมุนไพรทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กะเม็ง ขมิ้นชัน กระเทียม ลูกใต้ใบ มังคุด มะระขี้นก น้ำนมราชสีห์ พริกขี้หนู ส้มเขียวหวาน และทับทิม มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เฮกเซน เมทานอล เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท และน้ำกลั่น จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* โดยวิธี swab paper disc และหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (minimal inhibitory concentration, MIC)ในการยับยั้ง *S. agalactiae* จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของพริกขี้หนู (*Capsicum frutescens*) ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำ *S. agalactiae* มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคในปลานิล โดยการฉีดเชื้อดังกล่าวเข้าทางช่องท้องของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) พบว่าปริมาณเชื้อที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนร้อยละ 50 (median lethal

dose, LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 2.4 x 10^5 CFU/ml และเมื่อนำอาหารที่มีส่วนผสมของพริกขี้หนูบดละเอียดในอัตราส่วน 9:1 (w/w) อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดด้วยเมทานอลของพริกขี้หนูในอัตราส่วน 19:1 (w/w) และอาหารที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ในอัตราส่วน 199:1 (w/w) มาเลี้ยงปลานิลที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ในปริมาณเท่ากับค่า LD_{50} พบว่าอัตราการรอดชีวิตของปลานิลติดเชื้อที่ได้รับอาหารที่ผสมสมุนไพรทั้งสองชนิด และอาหารที่ผสมยาปฏิชีวนะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่าอัตราการรอดชีวิตของปลาติดเชื้อที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมสมุนไพร สำหรับการทดสอบกับ *A. hydrophila* ได้นำสมุนไพรทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กระเทียม มังคุด มะระขี้นก ทับทิม ชุมเห็ดเทศ ข่า กานพลู กระชาย กะเพรา และตะไคร้ มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 อีเทอร์ และน้ำกลั่น จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยวิธี swab paper disc assays และหาค่า MIC จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ของใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำ *A. hydrophila* มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคในปลานิล โดยการฉีดเชื้อดังกล่าวเข้าทางช่องท้องของปลานิล พบว่าค่า LD_{50} มีค่าเท่ากับ 1.37 x 10^6 CFU/ml และเมื่อนำอาหารที่มีส่วนผสมของใบฝรั่งบดละเอียดในอัตราส่วน 4:1 (w/w) อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ของใบฝรั่ง ในอัตราส่วน 24:1 (w/w) และอาหารที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ในอัตราส่วน 199:1 (w/w) มาทำการเลี้ยงปลานิลที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ในปริมาณเท่ากับค่า LD_{50} พบว่าอัตราการรอดชีวิตของปลานิลติดเชื้อที่ได้รับอาหารที่ผสมสมุนไพรทั้งสองชนิด และอาหารที่ผสมยาปฏิชีวนะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่าอัตราการรอดชีวิตของปลาติดเชื้อที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมสมุนไพร การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรไทยมีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุมโรคปลาแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

ABSTRACT

TITLE : POTENTIAL OF THAI HERBS AND THEIR EXTRACTS AS ALTERNATIVES TO ANTIBIOTICS FOR CONTROLLING *Streptococcus agalactiae* AND *Aeromonas hydrophila* INFECTIONS IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* Linn.)

BY : ADITHEPCHAIKARN PACHANAWAN

DEGREE : DOCTOR OF PHILOSOPHY

MAJOR : BIOTECHNOLOGY

CHAIR : ASSOC. PROF. PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON, Ph.D.

KEYWORDS : THAI HERBS / ANTIMICROBIAL SUBSTANCE / NILE TILAPIA / *Streptococcus agalactiae* / *Aeromonas hydrophila*

Careless use of antibiotics to control fish diseases by farmers usually leads to a numbers of problems including antibiotic resistance of pathogens, contamination of antibiotics in environment and accumulation of antibiotics in fish. Therefore, there has been effort to find alternatives to replace antibiotics for controlling fish diseases. Herbs are the alternatives receiving much attention because of its safety and availability. The objectives of this study are to test the capability of Thai herbs in inhibiting two fish bacterial pathogens, *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila* both *in vitro* and in fish. For the tests with *S. agalactiae*, fourteen herbs including *Tinospora crispa*, *Centella asiatica*, *Psidium guajava*, *Andrographis paniculata*, *Eclipta prostrate*, *Curcuma longa*, *Allium sativum*, *Phyllanthus amarus*, *Garcinia mangostana*, *Momordica charantia*, *Euphobia hirta*, *Capsicum frutescens*, *Citrus reticulate* and *Punica granatum* were extracted with 5 different solvents which were hexane, methanol, 95% ethanol, ethyl acetate and distilled water. The extracts were then tested for the ability to inhibit growth of *S. agalactiae* by using swab paper disc method and subjected to minimal inhibitory concentration (MIC) determination. Results showed that the methanol extract of hot chili pepper (*Capsicum frutescens*) had the highest inhibitory ability with the MIC of 31.25 μg/ml. The pathogenicity of *S. agalactiae* was confirmed by intraperitoneal injection to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

S. agalactiae was confirmed by intraperitoneal injection to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the median lethal dose (LD_{50}) was found to be 2.4 x 10^5 CFU/ml. When fish diets supplemented with finely ground hot chili pepper at the ratio of 9:1 (w/w), with the methanol extract of hot chili pepper at the ratio of 19:1 (w/w) and with oxytetracycline at the ratio of 199:1 (w/w) were given to Nile tilapia infected with *S. agalactiae* at the dose of LD_{50}, the survival rates of the infected fish receiving all of the supplemented fish diets were similar, but higher than that of the infected fish receiving unsupplemented fish diets. For the tests with *A. hydrophila*, fourteen herbs including *T. crispa*, *C. asiatica*, *P. guajava*, *A. paniculata*, *A. sativum*, *G. mangostana*, *M. charantia*, *P. granatum*, *Cassia alata*, *Alpinia galangal*, *Eugenia caryophyllus*, *Boesenbergia pandurata*, *Ocimum sanctum* and *Cymbopogon citrates* were extracted with 3 different solvents which were 95% ethanol, ether and distilled water. The extracts were then tested for the ability to inhibit growth of *A. hydrophila* by using swab paper disc method and subjected to MIC determination. Results showed that the 95% ethanol extract of guava leaf (*Psidium guajava*) had the highest inhibitory ability with the MIC of 62.5 μg/ml. The pathogenicity of *A. hydrophila* was confirmed by intraperitoneal injection to Nile tilapia (*O. niloticus*) and the LD_{50} was found to be 1.37 x 10^6 CFU/ml. When fish diets supplemented with finely ground guava leaf at the ratio of 4:1 (w/w), with the 95% ethanol extract of guava leaf at the ratio of 24:1 (w/w) and with oxytetracycline at the ratio of 199:1 (w/w) were given to Nile tilapia infected with *A. hydrophila* at the dose of LD_{50}, the survival rates of the infected fish receiving all of the supplemented fish diets were similar, but higher than that of the infected fish receiving unsupplemented fish diets. This study shows that Thai herbs have potential to replace antibiotics for controlling fish diseases.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลักษณะทั่วไปและชีววิทยาของปลานิล	5
2.2 โรคของปลานิล	9
2.3 *Streptococcus agalactiae*	17
2.4 *Aeromonas hydrophila*	28
2.5 การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคของปลานิล	35
2.6 การใช้สมุนไพรในการควบคุมและรักษาโรค	36
2.7 ความสามารถของสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค	38
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	53
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 พืชสมุนไพร	58
3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร	61

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 เชื้อก่อโรคปลา อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	63
3.4 การทดลองสำหรับ *S. agalactiae*	63
3.5 การทดลองสำหรับ *A. hydrophila*	66
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	70
4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการทดลองสำหรับ *S. agalactiae*	71
4.2 ผลการทดลองสำหรับ *A. hydrophila*	78
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**85**
เอกสารอ้างอิง	**95**
ภาคผนวก	
ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	108
ข ข้อมูลประกอบผลการวิจัย	112
ค ผลงานวิชาการเผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ	117
ประวัติผู้วิจัย	**124**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษานี้	58
2	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทย	62
3	ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธี swab paper disc	71
4	ปริมาณของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*	73
5	อัตราการตายของปลานิลทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *S. agalactiae* เข้าสู่ร่างกาย (LD_{50}) ด้วยวิธี intraperitoneal injection ในสัปดาห์ที่สองของการรับเชื้อเข้าไป	76
6	ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยใช้วิธี swab paper disc	79
7	ปริมาณของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*	80
8	อัตราการตายของปลานิลทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เข้าสู่ร่างกาย (LD_{50}) ด้วยวิธี intraperitoneal injection ในสัปดาห์ที่สองของการรับเชื้อเข้าไป	83
9	ตัวทำละลายเฉพาะที่ใช้สกัดสารสำคัญ (active component) ออกจากพืชสมุนไพร	88
10	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี swab paper disc assay	113
11	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี swab paper disc assay	114
12	สารเคมีสำคัญที่พบในสมุนไพร 20 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค	115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)	5
2	ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ *S. agalactiae*	18
3	ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของ *S. agalactiae*	18
4	ลักษณะโคโลนีของ *S. agalactiae* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือดแกะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ด้วย CO_2 50%	20
5	ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะโคโลนีของ *A. hydrophila*	30
6	ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด และส่องผ่านของ *A. hydrophila*	30
7	สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษานี้	60
8	ผลการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ด้วยสารสกัดเมทานอลและสารสกัด 95% เอทานอลของพริกขี้หนู	72
9	กลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* แบบ bacteriostatic ด้วยสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู	75
10	ลักษณะภายนอกและภายในของปลานิลทดลองที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*	77
11	อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	78
12	กลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* แบบ bacteriostatic ด้วยสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง	81
13	ลักษณะภายนอกและภายในของปลานิลทดลองที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila*	82
14	อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ทั้ง 4 ชุดการทดลอง	84
15	สูตรโครงสร้างของ capsaicin สารต่อต้านจุลินทรีย์ในพริกขี้หนู	92

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) เป็นปลาน้ำจืดที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก จากการที่จำนวนผู้บริโภคปลานิลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี การเพาะเลี้ยงปลานิลในเชิงพาณิชย์จึงได้ถูกพัฒนาอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ได้ปริมาณ และคุณภาพตามที่ต้องการของผู้บริโภค ในปัจจุบันนี้มีการเพาะเลี้ยงปลานิลในเชิงพาณิชย์ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ประเทศอิสราเอล สหรัฐอเมริกา ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ กัมพูชา เวียดนาม อินโดนีเซีย และจีน เป็นต้น (Popma and Lovshin, 1995) รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงกันมากในจังหวัดสุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานี อุบลราชธานี มุกดาหาร นครพนม และกาฬสินธุ์

ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในการเพาะเลี้ยงปลานิล คือ การติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่งผลกระทบต่อทั้งผู้เลี้ยง และผู้บริโภค กล่าวคือ เมื่อมีการแพร่ระบาดของแบคทีเรียเกิดขึ้นกับปลานิล เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงมักประสบปัญหาการขาดทุน เนื่องจากการตายของปลาเป็นจำนวนมาก ส่วนผู้บริโภคก็มักประสบปัญหาในเรื่องราคาของปลาที่สูงขึ้น และอันตรายที่อาจเกิดจากแบคทีเรียที่อาจทำให้เกิดโรคในคนได้ด้วย แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคในปลานิลได้มีหลายสายพันธุ์ เช่น *Streptococcus* spp. ซึ่งทำให้เกิดโรค streptococcosis (Toranzo et al., 2004) *Vibrio* spp. ทำให้เกิดโรค vibriosis (Al-Harbi and Uddin, 2005) *Aeromonas* spp. ทำให้เกิดโรค motile aeromonas หรือ aeromonad septicemia (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2528; กรมประมง, 2545) *Flexibacter columnaris* ทำให้เกิดโรค columnaris (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2528; กรมประมง, 2545) เป็นต้น สำหรับการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย พบว่าประสบปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลานิลเช่นเดียวกัน โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย ได้แก่ *Streptococcus* spp. และ *Aeromonas* spp. เป็นต้น

Streptococcus agalactiae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มักพบเป็นคู่ หรือเป็นสาย สามารถเจริญได้ทั้งที่และไม่มีออกซิเจน โคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะโปร่งแสง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2528) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *S. agalactiae* หลายสายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดโรคได้ในปลานิล โดยเฉพาะโรค streptococcosis (นเรศ ช่วนยุก และคณะ, 2548) นอกจากนี้โรคนี้ยังพบการระบาด

ได้ทั้งในปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ปลาในฟาร์มเพาะเลี้ยง และยังพบการระบาดได้ในปลาเขตน้ำจืดน้ำกร่อย และน้ำเค็ม ความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นนั้น ได้สร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดของประเทศไทย เช่น ปลากะพงขาว และปลานิล เป็นต้น โดยการระบาดของโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ในฟาร์มเลี้ยงปลานิล สามารถพบได้ทั้งในภาคกลาง ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งสร้างความเสียหายต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิลเป็นจำนวนมาก

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น (short rod) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแส้ (flagellum) อยู่ที่ปลาย ด้านหนึ่งของเซลล์ แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ในน้ำจืดทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก เช่น น้ำทิ้ง จากแหล่งชุมชน และน้ำทะเลที่ระดับความเค็มไม่เกิน 10 ppt (part per thousand) โรคติดเชื้อ *A. hydrophila* เรียกว่า motile aeromonas septicemia (MAS) โรคนี้มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในปลาน้ำจืด นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังก่อให้เกิดโรคระบาดในสัตว์เลือดเย็นชนิดอื่น ๆ เช่น จระเข้ งู เต่า ตะพาบน้ำ และในสัตว์เลือดอุ่น เช่น วัว ควาย รวมทั้งมนุษย์ด้วย

ในปัจจุบันนี้การแก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลานิลที่นิยมทำกัน คือ การใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ ได้แก่ ampicillin, penicillin G, erythromycin, oxytetracycline, nalidixic acid, oxolinic acid, sulphamethoxazol, chloramphenicol และ nitrofurans แต่การใช้ยาปฏิชีวนะมักก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา เช่น หากใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน หรือใช้ในปริมาณที่มาก อาจทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย ซึ่งการดื้อยาดังกล่าวอาจแพร่จากแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ ทั้งยังส่งผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหาร ระบบนิเวศ และสิ่งแวดล้อม ในระยะยาวได้ ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะในการแก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลามีแนวโน้มที่จะถูกควบคุมอย่างเข้มงวด หรือถูกห้ามการใช้ในอนาคต ด้วยเหตุนี้การวิจัยเพื่อหาสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อนำมาใช้แก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลาจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก จากรายงานจำนวนมากที่แสดงถึงความสำเร็จของการใช้สมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคปลา และในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียในปลา ทำให้สมุนไพรเป็นสารที่น่าจะนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำสมุนไพรของไทยที่สามารถหาได้ทั่วไปในท้องตลาด ได้แก่ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กะเม็ง ขมิ้นชัน กระเทียม ลูกใต้ใบ มังคุด มะระขี้นก น้ำนมราชสีห์ พริกขี้หนู ส้มเขียวหวาน ทับทิม ชุมเห็ดเทศ ข่า กานพลู กระชาย กะเพรา และตะไคร้ มาใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ทั้งในหลอดทดลอง และในตัวปลา ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มีประโยชน์ต่อการ

พัฒนาวิธีการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลา โดยใช้สมุนไพรแทนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อทดสอบความสามารถของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ในหลอดทดลอง

1.2.2 เพื่อทดสอบความสามารถของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ในปลา

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดสมุนไพร กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ในปลา

1.2.4 เพื่อทดสอบความสามารถของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในหลอดทดลอง

1.2.5 เพื่อทดสอบความสามารถของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในปลา

1.2.6 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดสมุนไพร กับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในปลา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 การสกัดสารจากสมุนไพรไทย ซึ่งได้แก่ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กะเม็ง ขมิ้นชัน กระเทียม ลูกใต้ใบ มังคุด มะระขี้นก น้ำนมราชสีห์ พริกขี้หนู ส้มเขียวหวาน ทับทิม ชุมเห็ดเทศ ข่า กานพลู กระชาย กะเพรา และตะไคร้

1.3.2 การทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* โดยวิธี swab paper disc

1.3.3 การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* (minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดสมุนไพร

1.3.4 การตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* โดยสารสกัดสมุนไพร

1.3.5 การหาค่าปริมาณของ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนร้อยละ 50 (median lethal dose, LD_{50})

1.3.6 การทดสอบความสามารถของอาหารที่มีส่วนผสมของพริกขี้หนูบดละเอียด อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู และอาหารที่มีส่วนผสมของ oxytetracycline ในการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล

1.3.7 การทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยวิธี swab paper disc

1.3.8 การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* (minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดสมุนไพร

1.3.9 การตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยสารสกัดสมุนไพร

1.3.10 การหาค่าปริมาณของ *A. hydrophila* ที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนร้อยละ 50 (median lethal dose, LD_{50})

1.3.11 การทดสอบความสามารถของอาหารที่มีส่วนผสมของใบฝรั่งบดละเอียด อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดเอทานอล 95% ของใบฝรั่ง และอาหารที่มีส่วนผสมของ oxytetracycline ในการควบคุมโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้

1.4.1 ทราบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคปลา *S. agalactiae* และ *A. hydrophila*

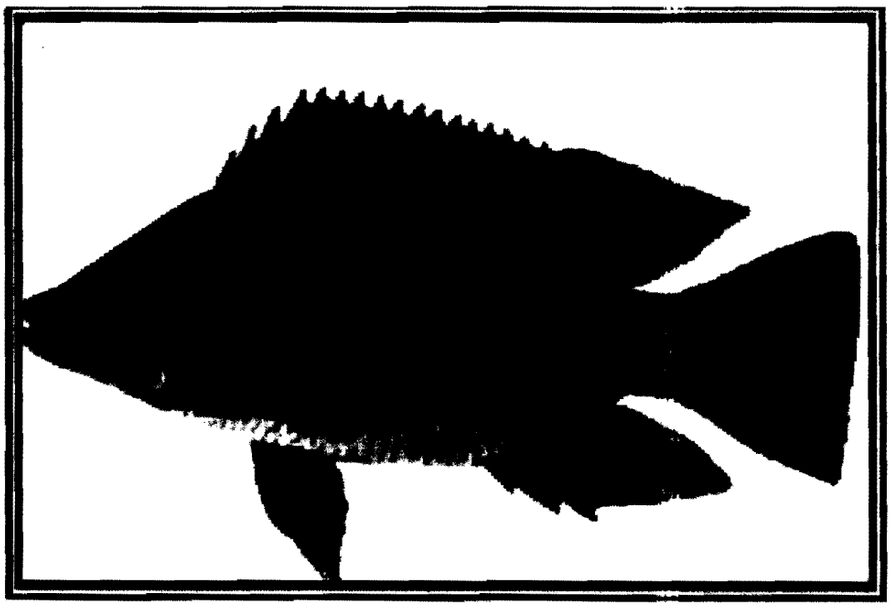
1.4.2 ทราบศักยภาพของสมุนไพรไทย และสารสกัดสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ในการใช้แทน ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคปลาที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* หน่วยงานที่คาดว่าจะนำผลงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานที่สนใจและ/หรือทำการวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมโรคของปลานิล เช่น ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะประมง ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ของสถาบันการศึกษาในระดับอุดมศึกษาต่าง ๆรวมทั้งสถาบันวิจัยต่าง ๆ เป็นต้น และผลการวิจัยในโครงการนี้สามารถช่วยลด หรือเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะในการ เลี้ยงปลานิล ซึ่งจะส่งผลดีต่อทั้งเกษตรกร ผู้บริโภค ผู้ประกอบการ และสิ่งแวดล้อมได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปและชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล มีชื่อสามัญว่า Nile tilapia มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* Linn. จัดอยู่ใน Family Cichlidae (ภาพที่ 1) มีการจัดจำแนกปลานิลตามลักษณะอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Order Actinopterygii
Class Perciformes
Family Cichlidae
Genus *Oreochromis*
Species *O. niloticus*



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) (กรมประมง, 2545)

ปลานิลมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา และลุ่มน้ำจอร์แดน สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ทะเลสาบ และแม่น้ำ พบว่ามีการกระจายตัวทางตอนบนของลุ่มแม่น้ำไนล์ในประเทศ ยูกานดา ซูดาน แทนแกนยิกา จากนั้นได้แพร่กระจายลงมาทางตอนกลาง และตะวันออกของทวีปแอฟริกา ในเขตสาธารณรัฐชาด และสาธารณรัฐไนเจอร์ นอกจากนี้ในช่วง 50 ปีที่ผ่านมาได้มีการนำพันธุ์ปลานิลมาเพาะเลี้ยง และกระจายออกไปยังเขตพื้นที่ต่าง ๆ โดยเฉพาะในเขตอบอุ่นและเขตร้อน เนื่องจากปลานิลมีความอดทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ขยายพันธุ์ได้ง่ายและมีลูกดก ดังนั้นความนิยมในการเลี้ยงปลานิลจึงได้แพร่หลายไปยังประเทศต่าง ๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งได้แก่ ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ อิสราเอล รวมทั้งประเทศไทย ปลานิลถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 โดยเจ้าฟ้าอากิฮิโต มกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช จำนวน 50 ตัว โดยระยะแรกได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยเลี้ยงในบ่อดินบริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต เนื่องจากคุณสมบัติของปลานิลเป็นปลาจำพวกกินพืช เลี้ยงง่าย มีรสดี ออกลูกดก เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ในระยะเวลา 1 ปี จะมีน้ำหนักประมาณครึ่งกิโลกรัม และมีความยาวประมาณ 1 ฟุต พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว จึงได้มีพระราชประสงค์ที่จะให้ปลานี้แพร่ขยายพันธุ์ อันจะเป็นประโยชน์แก่พสกนิกรของพระองค์สืบต่อไป ดังนั้น เมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2509 จึงทรงโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า "ปลานิล" (กรมการศึกษานอกโรงเรียน, 2541)

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ซึ่งเป็นปลาชนิดหนึ่งในสกุลเดียวกัน แต่แตกต่างกันในส่วนของสีลำตัว ซึ่งปลานิลจะมีลักษณะพิเศษ คือ จะมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลำตัวสั้นแบนข้าง ริมฝีปากบน และริมฝีปากล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว มีลายพาดขวางลำตัว 9-10 แถบ ครีบหลังติดต่อกันเป็นครีบเดียว ครีบหางตัดตรง ชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงตามแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่ก็พบว่าสามารถอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยได้ ด้วยคุณลักษณะของปลานิลที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ของแหล่งที่อยู่อาศัยได้เป็นอย่างดี ทำให้เราพบประชากรของปลานิลในสภาพสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทั้งในเขตน้ำจืด และน้ำกร่อย พบว่า ปลานิลอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มสูงถึง 20 ppt (part per thousand) และสามารถทนอยู่ได้ หรืออาศัยอยู่ได้ในช่วงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำตั้งแต่ 14-33 องศาเซลเซียส แต่ถ้าในสภาพของการเลี้ยงและฟาร์มเพาะเลี้ยงนั้น ในบางพื้นที่สามารถเพาะเลี้ยงปลานิลในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 7-40 องศาเซลเซียสได้ และยังพบอีกว่าปลานิลทนต่อสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ (dissolved oxygen, DO) น้อยกว่า 0.3 ppm (parts per million) ได้ เพราะฉะนั้นจากข้อมูลนี้ถ้าในการเพาะเลี้ยงเราควบคุมระดับออกซิเจนในน้ำตอนช่วงเช้าไม่ให้ต่ำกว่า 0.7 - 0.8 ppm จะทำให้ปลานิลเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น

ตามธรรมชาตินั้นปลานิลเป็นปลาที่กินได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivorous) รวมทั้งยังสามารถกรองกินแพลงก์ตอนที่ล่องลอยอยู่ในแหล่งน้ำได้เป็นอย่างดี (ภิรัตน์ มั่นใจอางค์, 2552)

การตรวจลักษณะเพศของปลานิล พบว่า ปลานิลตัวผู้ และตัวเมียมีลักษณะคล้ายกันมาก แต่จะสังเกตความแตกต่างระหว่างเพศได้โดยการดูช่องเพศที่อยู่ใกล้ ๆ กับช่องทวาร โดยตัวผู้จะมีติ่งเพศ (genital papilla) ยื่นยาวค่อนข้างแหลม ส่วนตัวเมียมีติ่งเพศค่อนข้างใหญ่ และกลมมน ปลานิลที่มีขนาดความยาว 10 เซนติเมตร ขึ้นไป จึงจะดูเพศได้ชัดเจน

การแพร่และขยายพันธุ์ปลานิล พบว่าปลานิลขยายพันธุ์ได้ตลอดปี ทั้งในบ่อเพาะเลี้ยง กระชังและในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ โดยในระยะเวลา 1 ปี ในธรรมชาติปลาตัวผู้ที่มีขนาดโตเต็มวัย และพร้อมผสมพันธุ์จะแยกตัวออกจากฝูง แล้วเริ่มสร้างรังบริเวณชานบ่อตื้น ๆ ซึ่งมีระดับน้ำประมาณ 30-50 เซนติเมตร โดยปลาจะปักหัวลงตั้งฉากกับพื้นดิน แล้วใช้ปากร่วมกับการเคลื่อนไหวของลำตัวเขี่ยดินตะกอนออก อมเอาดินตะกอน และเศษสิ่งของต่าง ๆ ในบริเวณนั้นไปทิ้งนอกรัง ทำอยู่เช่นนี้เรื่อยไปจนกว่าจะได้รังที่มีลักษณะเป็นหลุมตามขนาดที่ต้องการ (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2536) ถ้ามีปลาอื่นอยู่ในบริเวณนั้นปลานิลตัวผู้จะพยายามขับไล่ไป ปลานิลตัวผู้มักว่ายวนเวียนอยู่ในรัศมี 2-3 เมตร รอบ ๆ รัง โดยมีอาการแผ่ครีบหลัง อ้าปากกว้างอยู่ตลอดเวลา ซึ่งเป็นการเชิญชวนให้ตัวเมียเข้ามายังรังที่สร้างไว้ เมื่อปลานิลตัวผู้ และตัวเมียจับคู่กันได้แล้วจะว่ายน้ำเคียงคู่กันไป และจะผสมพันธุ์กัน โดยปลานิลตัวผู้ใช้บริเวณหน้าผากดุนที่ใต้ท้องของตัวเมีย เพื่อกระตุ้น และเร่งเร้าให้ตัวเมียวางไข่ ซึ่งโดยปกติแล้วปลานิลตัวเมียจะวางไข่ออกมาครั้งละ 10-12 ฟอง จากนั้นปลานิลตัวผู้ที่ว่ายน้ำเคียงคู่กันมาจะปล่อยน้ำเชื้อไปผสมกับไข่ ไข่ที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อแล้วจะถูกปลานิลตัวเมียอมไว้ในปากเพื่อความปลอดภัย และยังสามารถได้รับออกซิเจนในปริมาณสูง เนื่องจากเกิดการไหลเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา แล้วปลาตัวเมียจะว่ายออกจากรังไปยังบริเวณก้นบ่อที่ลึกกว่า โดยปกติแล้วแม่ปลานิลมักอมไข่ไว้ในปากเป็นเวลา 4 ถึง 5 วัน ไข่จะสามารถฟักเป็นตัวได้หมด ในการเพาะเลี้ยงปลานิล จะคัดปลานิลตัวที่มีความสมบูรณ์สามารถวางไข่ได้ 5-6 ครั้ง ปลานิลจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วเมื่อช่วงอายุ 3-4 เดือน แต่ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ควรใช้แม่ปลาที่มีน้ำหนักตัวไม่ต่ำกว่า 50 กรัม ส่วนพ่อปลานั้นควรมีน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 75 กรัม การเพาะพันธุ์ปลานิลในฟาร์มเพาะเลี้ยงนั้น จะนิยมใช้วิธีเลียนแบบธรรมชาติ คือ มีการจับคู่ของปลาเพื่อขุดหลุมสร้างรัง เมื่อตัวเมียวางไข่ในรังแล้วตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อมาผสม โดยปลาเพศเมียจะวางไข่แต่ละครั้งประมาณ 500-2,000 ฟอง ไข่ปลานิลเป็นไข่ประเภทจม ที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส ไข่จะสามารถฟักตัวได้หมดภายในเวลาเพียง 4 วัน (ภิรัตน์ มั่นใจอางค์, 2552)

ในประเทศไทยมีสายพันธุ์ปลานิลหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากทั้งการปรับปรุงพันธุ์โดยนักวิทยาศาสตร์ และการผสมข้ามพันธุ์กันในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ตัวอย่างได้แก่ ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 1 เป็นปลานิลที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากปลานิลสายพันธุ์แบบคัดเลือกภายในครอบครัว ซึ่งเริ่มดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 จนถึงปัจจุบัน ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 2 (GMT) เป็นปลานิลที่พัฒนาโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อช่วยในการเปลี่ยนโครโมโซมเพศในพ่อพันธุ์ให้มีโครโมโซมเพศเป็น YY (Super male) เมื่อนำมาผสมกับแม่พันธุ์ปกติ จะได้ลูกปลาเป็นเพศผู้เฉลี่ย 95.6% ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 เป็นปลานิลที่ได้จากการผสม และคัดเลือกพันธุ์จากปลา 7 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ อียิปต์ กานา เคนยา สิงคโปร์ เซเนกัล อิสราเอล และไต้หวัน พัฒนาโดยหน่วยงานของประเทศฟิลิปปินส์ต่อเนื่องประมาณ 5 รุ่น ทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว และมีอัตราการรอดสูง ปลานิลสายพันธุ์ ซี.พี. เป็นปลานิลที่มีการคัดเลือกพันธุ์โดยบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์จำกัด ทำให้ได้ปลาที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ดี สามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความเค็มสูงได้ ทำให้รสชาติเนื้อปลานั้นมีความใกล้เคียงกับเนื้อปลาทะเลเพราะไม่มีกลิ่นโคลนเหมือนกับปลานิลที่เลี้ยงในบ่อปลาทั่วไป ส่งผลให้มีราคาสูงกว่าปลานิลที่จำหน่ายตามท้องตลาด สายพันธุ์ปลานิลที่มีชื่อเรียกว่าปลาทับทิม เป็นปลานิลที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์โดยบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์เช่นกัน สามารถเลี้ยงในความเค็มสูงได้และความเค็มที่เหมาะสมคือช่วง 15-20 ppt มีโครงกระดูกเล็กทำให้มีเปอร์เซ็นต์ซากต่ำ เนื้อมีสีขาว มีอัตราการเจริญเติบโตดีในสภาพการเลี้ยงที่มีความหนาแน่นสูง เช่น การเลี้ยงในกระชัง นอกจากนี้ยังพบว่าปลานิลมีการผสมกันเอง และข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาติ โดยจะพบปลานิลมีสีเหลืองขาวส้มซึ่งเป็นการกลายพันธุ์จากปลานิลสีปกติ หรือเป็นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลานิลกับปลาหมอเทศ นอกจากจะมีสีภายนอกของลำตัวที่แตกต่างจากปลานิลธรรมดาแล้ว ภายในตัวปลาที่ผนังช่องท้องยังเป็นสีขาวเงินคล้ายผนังช่องท้องของปลากินเนื้อ และสีของปลาเป็นสีขาวชมพูคล้ายปลากะพงแดง ซึ่งเป็นที่นิยมรับประทานในต่างประเทศ มีชื่อเรียกเป็นที่รู้จักกันว่า "ปลานิลแดง" (กรมการศึกษานอกโรงเรียน, 2541)

รูปแบบการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยนั้น พบว่า มีความหลากหลายขึ้นกับความเหมาะสมของเกษตรกรแต่ละพื้นที่ มีทั้งการเลี้ยงในบ่อดิน ในกระชัง บ่อคอนกรีต และการเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา แต่ก็ยังพบว่ามีการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาอยู่บ้างเช่นกัน ปัจจุบันการเลี้ยงปลานิลในบ่อนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท ตามลักษณะของการเลี้ยง ดังนี้ (1) การเลี้ยงปลานิลแบบเดียว โดยปล่อยลูกปลาขนาดเท่ากันลงเลี้ยงพร้อมกัน แล้วจับทั้งบ่อ (2) การเลี้ยงปลานิลหลายรุ่นในบ่อเดียวกัน โดยใช้อวนจับคัดเฉพาะปลาขนาดใหญ่ที่ตลาด

ต้องการปล่อยให้ปลาขนาดเล็กเจริญเติบโตต่อไป (3) การเลี้ยงปลานิลร่วมกับปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาสวาย ปลาตะเพียน ปลาจีน เพื่อใช้ประโยชน์จากอาหาร หรือเลี้ยงร่วมกับปลากินเนื้อ เพื่อกำจัดลูกปลาที่ไม่ต้องการ และขณะเดียวกันก็จะได้ปลากินเนื้อเป็นผลพลอยได้ เช่น การเลี้ยงร่วมกับปลากราย และการเลี้ยงปลานิลร่วมกับปลาช่อน (4) การเลี้ยงปลานิลแบบแยกเพศ การเลี้ยงปลานิลเพศเดียวกันในบ่อเพื่อป้องกันการแพร่พันธุ์ ส่วนมากนิยมเลี้ยงปลาเพศผู้ซึ่งมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเพศเมีย ส่วนการให้อาหารปลานิลที่เพาะเลี้ยงในบ่อนั้น เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่กินอาหารได้ทุกชนิด จึงเป็นปลาที่ให้ผลผลิตสูง โดยเฉพาะพวกอาหารธรรมชาติที่อยู่ในบ่อ เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลง และแพลงก์ตอนที่อยู่ในบ่อ ตลอดจนสาหร่ายและแหน ถ้าต้องการให้ปลาโตเร็วควรให้อาหารสมทบ เช่น รำ ปลายข้าว กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากมะพร้าว แหนเป็ด และปลาป่น เป็นต้น การให้อาหารแต่ละครั้งนั้นไม่ควรให้ปริมาณมากจนเกินไป ควรกะให้มีปริมาณเพียงพอแก่ความต้องการของปลาเท่านั้น ส่วนมากปริมาณอาหารควรมีน้ำหนักประมาณร้อยละ 5 ของน้ำหนักปลาที่เลี้ยง ถ้าให้อาหารมากเกินไปปลาจะกินไม่หมด เสียค่าอาหารโดยเปล่าประโยชน์ และยังทำให้น้ำเพาะเลี้ยงเน่าเสียซึ่งนำมาด้วยเชื้อโรค แบคทีเรีย และเป็นอันตรายแก่ปลาได้ในที่สุด (กรมการศึกษานอกโรงเรียน, 2541)

การเพาะเลี้ยงปลานิลของประเทศไทย ในปัจจุบันนั้นส่วนใหญ่ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive farming) เพื่อเพิ่มผลผลิตปลาให้เพียงพอต่อการบริโภคทั้งภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ ดังนั้นผลสืบเนื่องจากการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่มีอัตราการปล่อยปลาแบบหนาแน่นมีการให้อาหารอย่างเต็มที่เพื่อให้ผลผลิตที่สูงที่สุดในพื้นที่อันจำกัด ล้วนแล้วแต่มีผลทำให้สภาพแวดล้อมภายในบ่อเสื่อมโทรมลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ตัวปลาอ่อนแอ มีระบบภูมิคุ้มกันโรคลดลง และปลาเกิดโรคในที่สุด ดังนั้นการรู้เท่าทันโรคของปลา ข้อเท็จจริง และสาเหตุของการเกิดโรคของปลานิลนั้น จะทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสามารถหาวิธีป้องกัน และควบคุมโรคได้ทันท่วงที และลดความเสียหายจากการตายที่เกิดขึ้นได้ เกษตรกรมีรายได้เพียงพอให้แก่ครอบครัว ประเทศชาติก็จะมีการพัฒนาได้ต่อไป

2.2 โรคของปลานิล

โรคที่เกิดกับปลานิลมีสาเหตุได้หลายประการ เช่น ความหนาแน่นของปลานิลที่มากเกินไปในบ่อเลี้ยง ความสกปรกของน้ำในบ่อเลี้ยง การให้อาหารปลาที่มากเกินไปจนเกิดการสะสมของอาหารที่เหลือในบ่อเลี้ยง อาหารปลาที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียมาก่อน หรือปลาที่ป่วย หรือติดเชื้อในบ่อเพาะเลี้ยง และจากน้ำเลี้ยง เป็นต้น นอกจากนี้จุลินทรีย์ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่งในการก่อให้เกิดโรคกับปลานิล ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้มีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว การตรวจ

และวินิจฉัยโรคปลานั้นทำได้ คือ ต้องมีการศึกษา และตรวจสอบในบ่อหรือฟาร์ม สำรวจการระบาดของโรค และการเก็บตัวอย่างปลาป่วยมาเพื่อศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคระบาด และการตายในห้องปฏิบัติการ ควรตรวจสอบเป็นระยะทุกช่วงก่อน และหลังการระบาดของโรค ควรมีการดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้ (ปณรัตน์ ผาดี, 2552)

(1) การหาข้อมูลเบื้องต้นประกอบการวินิจฉัยของโรคระบาด เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับการตาย ได้แก่ วัน เวลา จำนวนปลาที่ตายในแต่ละวัน ลักษณะอาการของโรค ได้แก่ มีการตายแบบเฉียบพลัน หรือเรื้อรัง ลักษณะอาการทั่วไปของปลาที่ป่วย เช่น การว่ายน้ำ การทรงตัว ลักษณะอาการภายนอกของปลาป่วย เช่น บาดแผล การตกเลือด หรืออาการอื่น ๆ ที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า เช่น สีผิว เหงือก หรือสิ่งแปลกปลอมที่มาเกาะ และลักษณะอาการภายในของปลาป่วย สังเกตโดยการผ่าตัดเปิดช่องท้อง เช่น ตับ ไต หรืออวัยวะภายในอื่น ๆ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำระหว่างการเกิดโรค ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความขุ่น หรือใสของน้ำ ความเป็นกรดด่างของน้ำ ปริมาณแอมโมเนียในน้ำ ค่าความกระด้างและด่างของน้ำ หรือก๊าซพิษ และสารพิษต่าง ๆ วิธีการเลี้ยง ได้แก่ สถานที่ใช้เลี้ยง อัตราการเปลี่ยนถ่ายน้ำ อัตราการปล่อย หรือความหนาแน่นของปลา การให้อาหาร และการใช้ยาและสารเคมีในช่วงที่ผ่านมา

(2) การเก็บตัวอย่าง และวินิจฉัยโรคในภาคสนาม สามารถดำเนินการได้ดังนี้ ทำการชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวปลา สังเกตลักษณะภายนอกตามลำตัว และเหงือกปลา ตัดซี่เหงือก และครีบ หรือใช้ cover slip ขูดเมือกที่ผิวตัวเพื่อตรวจหาปรสิตโดยส่องกล้องจุลทรรศน์ เก็บตัวอย่างเลือดใกล้ ๆ กับบริเวณครีบหาง โดยใช้เข็ม และกระบอกฉีดยา เพื่อทำ blood smear และย้อมด้วยสี giemsa การแยกเชื้อนั้นทำได้โดยตัดเนื้อเยื่อจากแผลมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract agar (GYA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ส่วนการแยกเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถแยกได้จากเหงือก หรือครีบ หากพบอาการเหงือก หรือครีบกร่อน ทำได้โดยตัด หรือเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงใน cytophaga agar การแยกเชื้อแบคทีเรียจากแผลหลุม หรือแผลบวม โดยการเปิดปากแผลแล้วใช้ loop เผาไฟเขี่ยบริเวณแผล แล้วนำไปเขี่ย (streak) ลงบน brain heart infusion agar (BHIA) หรือ tryptic soy agar (TSA) ทำการผ่าตัดเพื่อเปิดช่องท้องเพื่อสำรวจอวัยวะภายใน โดยใช้เครื่องมือผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำการตรวจหาปรสิตภายใน แยกเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราจากระบบทางเดินอาหาร ตับ ไต หรือม้ามจากนั้นเตรียม spleen stamp smear บนสไลด์แก้วแล้วย้อมด้วยสี giemsa เพื่อตรวจหาแบคทีเรีย ทำการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อโดยแช่ใน 10% phosphate buffer formalin (PBF) และแอลกอฮอล์ 75% สำหรับการตรวจสภาพทางพยาธิวิทยา และเทคนิค PCR ตามลำดับ

ในประเทศไทยชนิดของเชื้อโรคที่มักพบในปลาน้ำจืด คือ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และปรสิต ซึ่งรายละเอียดของเชื้อโรคที่เกิดได้กับปลานิลของเชื้อโรคแต่ละชนิด ทั้งการตรวจ และการวินิจฉัยเชื้อ การแยกเชื้อ จากปลาป่วยนั้นสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.2.1 โรคของปลานิลที่เกิดจากเชื้อรา

เชื้อราที่สามารถทำให้เกิดโรคกับปลานิลได้ เช่น เชื้อราในกลุ่ม *Achlya* sp. และกลุ่ม *Aphanomyces* sp. เป็นต้น โดยเชื้อราเหล่านี้มักทำให้ปลาเป็นแผล ซึ่งมีลักษณะอาการ คือ บริเวณแผลจะมีเส้นสีขาวคล้ายขนขึ้นฟูเป็นกระจุก นอกจากนี้ปลาที่ติดเชื้อราเหล่านี้มักพบว่ามีอัตราการกินอาหารได้น้อยลงกว่าปกติมาก

การก่อโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราของปลาน้ำจืด โดยทั่วไปแล้วมักไม่ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรง และเฉียบพลัน เชื้อราส่วนใหญ่ เช่น เชื้อราในสกุล *Achlya* มักไม่ใช่สาเหตุหลักในการก่อโรค (saprophyte) อย่างไรก็ตามเชื้อราในสกุล *Aphanomyces* และ *Saprolegnia* นั้นอาจพบเป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรค epizootic ulcerative syndrome (EUS) และ saprolegniasis ในปลาเขตร้อน และเขตหนาว ตามลำดับ การติดเชื้อราโดยมากจะมองเห็นด้วยตาเปล่า โดยพบลักษณะเป็นกระจุกสีขาวคล้ายปุยฝ้ายเกาะที่ลำตัวปลา หรือหากเชื้อราฝังตัวในเนื้อเยื่อปลา ก็อาจตรวจสอบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ การแยกเชื้อราจากปลาป่วยสามารถทำได้โดยการตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อ เช่น ผิวหนัง และอวัยวะภายในด้วยใบมีด หรือกรรไกรผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้ววางลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYA หรือ glucose peptone yeast extract agar (GPYA) เติมยาปฏิชีวนะลงบนชิ้นเนื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังจากที่เชื้อราเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงทำการตัดส่วนปลายของเส้นใยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออันใหม่เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยการทำ single spore culture จากนั้นจึงทำการจำแนกชนิดของเชื้อรานั้น ๆ ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้พื้นฐานการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียเป็นหลัก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้แล้ว ส่วนในการศึกษาหาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรานั้น สามารถทำได้โดยการทำ artificial infection ในเชื้อราชั้นต่ำ ทำได้โดยการฉีด หรือแช่ zoospore ของเชื้อรา เช่น *Achlya* sp., *Aphanomyces* sp. และ *Saprolegnia* sp. (ปณรัตน์ ผาดี, 2552)

2.2.2 โรคของปลานิลที่เกิดจากปรสิตหรือโปรโตซัว

โปรโตซัวที่มักก่อให้เกิดโรคกับปลานิล มักเป็นโปรโตซัวที่อยู่ภายนอกร่างกายของปลานิลและมักทำให้เกิดโรคกับลูกปลามากกว่าปลาขนาดใหญ่ โดยโปรโตซัวดังกล่าวจะไปเกาะ ที่บริเวณเหงือก ผิวหนัง และครีบของปลานิล ทำให้ปลานิลเกิดการระคายเคือง และเกิดบาดแผลขึ้น นอกจากนี้โปรโตซัวที่เกาะบริเวณเหงือกอาจมีผลต่อระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซ ซึ่งอาจทำให้ปลานิลเกิดปัญหาขาดออกซิเจนได้ โปรโตซัวที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับปลานิล เช่น *Trichodina* sp., *Chilodonella* sp., *Ichthyophthirius multifilis*, *Epistylis* sp., *Scyphidia* sp., *Apiosoma* sp. และ *Ichthyobodo* sp.

การแยกเชื้อปรสิต โดยเฉพาะปรสิตภายนอก ควรดำเนินการในภาคสนามหากเป็นไปได้ เพราะปรสิตอาจหลุดออกจากตัวปลาระหว่างการขนส่ง หรือทันทีที่ปลาตาย ปรสิตชนิด Copepods เช่น *Lernea* sp. และ *Argulus* sp. สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ส่วนในกรณีของโรคจุดขาวที่เกิดจาก *Ichthyophthirius* sp. หรือปรสิตอื่น ๆ เช่น *Oodenium* sp., *Trichodina* sp., *Chilodonella* sp. หรือ *Gyrodactylus* sp. นั้น สามารถตรวจสอบได้โดยใช้กระจกปิดสไลด์ขูดตามลำตัวซึ่งมีเมือก แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในกรณีการตรวจสอบที่เหงือก สามารถใช้กรรไกรตัดซี่เหงือกปลาวางบนสไลด์แก้ว และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์ การจำแนกชนิดของเชื้อปรสิต สามารถทำได้โดยการศึกษาโครงสร้าง และรูปร่างของเซลล์ของเชื้อแต่ละชนิด การเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากปรสิตนั้น ความรุนแรงของโรคจะขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของเชื้อ หากได้รับตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อปรสิต จะเป็นการดีหากทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารเคมีพร้อม ๆ กับการศึกษาผลข้างเคียงต่อปลาโดยการแช่ปลาป่วยในสารเคมี (ในความเข้มข้นที่เหมาะสม) เป็นเวลาหลาย ๆ ครั้ง แล้วตรวจสอบปริมาณของปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในขณะเดียวกันต้องสังเกตลักษณะอาการของปลาด้วย โดยทั่วไปปรสิตมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อน และแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ซึ่งหากเรารู้ว่าระยะใดในช่วงชีวิตของเชื้อที่ทำหน้าที่เป็นปรสิต ก็จะทำให้การป้องกัน และการรักษา ทำได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการศึกษาวงจรชีวิตของปรสิตจึงมีความจำเป็นสำหรับการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของปรสิตนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เพราะส่วนใหญ่ยังไม่สามารถเพาะ หรือเลี้ยงปรสิตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ยกเว้นปรสิตชนิด *Tetrahymena* sp. ดังนั้นการศึกษาทางพยาธิสภาพของปลา หรือการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตรวจสอบหาสาเหตุของ การเกิดโรค เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และแม่นยำ (ปณรัตน์ ผาดี, 2552)

2.2.3 โรคของปลานิลที่เกิดจากแบคทีเรีย

โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้ปลาป่วย และตายมากที่สุด มีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคระบาดในปลานิลในฟาร์มเพาะเลี้ยง ได้แก่ *Vibrio anguillalum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flexibacter* sp., *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* เป็นต้น แต่เชื้อแบคทีเรียที่มักก่อโรคในปลานิล คือ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ซึ่งเป็นโรคแบบเรื้อรังทำให้เกิดการอักเสบ และเกิดบาดแผลตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายปลา (inflammatory and granulamatous lesions) เชื้อจะกระจายไปสู่ปลาตัวอื่นได้โดยการสัมผัสโดยตรง หรือปะปนกับสิ่งขับถ่ายของปลา สร้างความเสียหายมากให้แก่ทั้งปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม (สุปราณี พึ่งแพง, 2550) การแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาป่วย สามารถแยกได้จากแผลเหงือก หรืออวัยวะภายในของปลา เช่น ตับ ไต หรือม้าม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA), brain heart infusion agar (BHIA) และ cytophaga agar (CA) เป็นต้น (ปณรัตน์ ผาดี, 2552)

2.2.3.1 โรคของปลานิลที่เกิดจาก *Vibrio anguillalum*

Vibrio anguillalum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งตรง หรือโค้ง มี flagellum 1 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรค vibriosis กับปลาได้หลายชนิด ปลาที่ติดเชื้อ *V. anguillalum* จะมีลักษณะภายนอกคล้าย ๆ กับปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น ๆ คือ ที่โคนครีบ ในปาก ช่องของขากรรไกรล่าง แผ่นปิดเหงือก และรอบ ๆ ทวารจะมีสีแดง บริเวณใต้ผิวหนัง และกล้ามเนื้อที่มีการติดเชื้อจะเกิดการอักเสบและกลายเป็นหนอง ส่วนลักษณะภายในของปลาที่ติดเชื้อ *V. anguillalum* จะมีจุดเลือดในเยื่อบุช่องท้อง และอวัยวะภายใน ลำไส้จะมีสีแดง และเต็มไปด้วยของเหลว กล้ามเนื้อจะมีจุดเลือดเล็ก ๆ จนถึงแผลขนาดใหญ่

2.2.3.2 โรคของปลานิลที่เกิดจาก *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง มี flagellum สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20-35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรค pseudomonas septicemia กับปลานิล โดยปกติปลาสามารถรับแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายได้ทางปาก ทางผิวหนัง และทางเหงือกที่มีบาดแผล จากนั้นแบคทีเรียจะเข้าสู่กระแสเลือด และสร้างสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ ของปลา ปลาที่ติดเชื้อ *P. fluorescens* จะมีอาการดังนี้ รอบ ๆ ทวารหนักจะมีสีแดง ภายในลำไส้มีของเหลวปนเลือด มีการตกเลือดที่เยื่อบุช่องท้องและอวัยวะภายใน โรคนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคไปยังปลาอื่นได้โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคจะปะปนอยู่ในอุจจาระของปลาที่เป็นโรค

2.2.3.3 โรคของปลานิลที่เกิดจาก *Flexibacter* sp.

Flexibacter sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคตัวด่างกับปลานิล โดยโรคตัวด่างที่เกิดขึ้นกับปลานิลที่เลี้ยงในน้ำจืดมักเกิดจาก *F. columnaris* ส่วนโรคตัวด่างที่เกิดขึ้นกับปลานิลที่เลี้ยงในน้ำกร่อยมักเกิดจาก *F. maritimus* โรคดังกล่าวมักพบในช่วงที่อากาศมีการเปลี่ยนแปลงกะทันหัน ในช่วงอากาศเย็น ในช่วงฝนตกหนัก และหลังจากการขนย้ายปลา ปลาที่พบว่ามีอาการตัวด่างมักตายในเวลาอันรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง หากไม่ได้รับการรักษา

2.2.3.4 โรคของปลานิลที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas* spp.

Aeromonas spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น มีทั้งที่เป็นกลุ่มแอโรบิก และแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ มีรูปร่างคล้ายสมาชิกในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซีเดิมจีนัส *Aeromonas* จัดอยู่ใน Family Vibrionaceae ร่วมกับจีนัส *Vibrio*, *Photobacterium* และ *Plesiomonas* เนื่องจากมีคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีหลายอย่างคล้ายกับกลุ่มของ enterobacteriaceae ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดย *Aeromonas* จะให้ผล oxidase เป็นบวก กลุ่มที่อาศัยอยู่อิสระในน้ำจืด หรือน้ำกร่อย บางครั้งพบอยู่ในสัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ หรือปลา และพบในดิน หรือในอาหาร การติดเชื้อในคนมีหลายแบบ อาจเกี่ยวข้องกับโรคท้องร่วง บางครั้งทำให้เกิดการติดเชื้อที่บาดแผล หรือฉวยโอกาสติดเชื้อในคนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ การติดเชื้อในคนเกิดขึ้นหลังจากสัมผัสกับน้ำ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการกินปลาน้ำจืด หรือสัตว์น้ำ โรคท้องร่วงที่เกิดในเด็กมักเกิดรุนแรง แต่ถ้าเป็นในผู้ใหญ่จะมีอาการเรื้อรังกว่า ภายในจีนัส *Aeromonas* สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophillic) ตั้งแต่ 22-28 องศาเซลเซียส ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *A. salmonicida* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในปลา แต่ยังไม่พบว่ามีความเกี่ยวข้องต่อการก่อโรคในคน กลุ่มที่ 2 สามารถเจริญได้ในที่ช่วงอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส (mesophilic) มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ และเป็นสาเหตุหลักของการก่อโรคในปลา ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. caviae* และ *A. sobira* สามารถจำแนกชนิดของทั้งสามสปีชีส์ด้วยสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน และในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกกลุ่มภายในจีนัสนี้โดยใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization ร่วมกับวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลอื่น ๆ และการปรับปรุงแบบแผนการทดสอบด้านฟีโนไทป์ (รัดชนก ศิริคะรินทร์, 2553)

1) โรคของปลานิลที่เกิดจาก *Aeromonas salmonicida*

Aeromonas salmonicida เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่งสั้นจนถึงกลม ไม่สร้างสปอร์ และไม่เคลื่อนที่ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรค furunculosis กับปลานิล โดยปลานิลที่เป็นโรค furunculosis จะไม่กินอาหาร มีการเคลื่อนที่ช้าลง และเมื่อมีอาการรุนแรงขึ้นก็มักมารวมกันอยู่อย่างหนาแน่นที่บริเวณขอบบ่อ หรือที่กักขัง อาการภายนอกที่

สามารถพบได้ในปลานิลที่เป็นโรค furunculosis คือสีของลำตัวมักเข้มขึ้น โคนครีบ แผ่นปิดเหงือก และบริเวณรอบ ๆ ทวารมีสีแดง ส่วนอาการภายในที่สามารถพบได้ในปลานิลที่เป็นโรค furunculosis คือ มีจุดเลือดในตับ มีการตายของเนื้อเยื่อบริเวณไต อาจมีน้ำเลือด และอาหารที่ย่อยแล้วบางส่วนในลำไส้ โรคนี้สามารถถ่ายทอดจากปลาตัวหนึ่งไปยังปลาอีกตัวหนึ่งได้ โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคจะปะปนอยู่ในอุจจาระของปลาที่เป็นโรค และสัตว์อื่น ๆ เช่น สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ก็สามารถเป็นแหล่งแพร่เชื้อโรคดังกล่าวได้ โดยสัตว์เหล่านี้จะไม่แสดงอาการ แต่จะมีแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอยู่ในลำไส้ หรืออวัยวะภายในเพื่อรอโอกาสในการแพร่ระบาดต่อไป โรค furunculosis สามารถทำให้ปลามีอัตราการตายได้สูงถึง 85% โดยเฉพาะเมื่อโรคดังกล่าวเกิดกับปลาที่มีขนาดเล็ก และมีความอ่อนแอต่อโรค (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2528)

2) โรคของปลานิลที่เกิดจาก *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นตรง มี flagellum 1 เส้น สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรค motile aeromonas กับปลานิล โดยการเกิดโรคดังกล่าวมักเกี่ยวข้องกับความเครียดของปลา ปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้ปลานิลเกิดความเครียดนั้น จะส่งผลทำให้ปลานิลติดเชื้อ *A. hydrophila* ได้ง่าย ตัวอย่างเช่น การขนย้ายปลาจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง การเลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไปในบ่อเลี้ยง และความสกปรกของน้ำในบ่อเลี้ยง เป็นต้น ปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* อาจแสดงอาการของโรคเกิดขึ้นแบบเฉียบพลันภายใน 1-2 วัน หลังจากที่มีการติดเชื้อ หรืออาจไม่แสดงอาการ จนกว่าปลาจะอ่อนแอ ปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* มักมีอาการดังต่อไปนี้ ตกเลือดในอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น ลำไส้ และเยื่อบุช่องท้อง บวมน้ำ (dropsy) มีแผลตามลำตัว เกล็ดตั้งพอง ตาโปน และมักตายในที่สุด นอกจากนี้แล้วเชื้อ *A. hydrophila* ที่พบในปลายังสามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ด้วย โดยเฉพาะโรคท้องร่วง (diarrhea) (ประสิทธิ์ อัศวโภคี, 2526) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับปลานิล ปลาเศรษฐกิจ และสัตว์น้ำอื่นๆ เช่น กบ กุ้ง ปลาบึก ปลาไหล ปลาเทราท์ และปลาสวยงาม เป็นต้น สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและปลาเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก

2.2.3.5 โรคของปลานิลที่เกิดจาก *Streptococcus* sp.

Streptococcus sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มักพบเป็นคู่ หรือเป็นสาย โคโลนีโปร่งแสง และสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรค streptococcus septicemia (streptococcosis) กับปลานิล โดยปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus* sp.

จะมีอาการดังนี้ เสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำ ตาขุ่น ตาโปน อาจมีการตกเลือดในตาร่วมด้วย ตกเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือก และโคนครีบ เป็นแผลที่บริเวณลำตัว ท้องบวมน้ำ มีจุดเลือดบริเวณด้านท้อง รอบ ๆ ทวารหนักมีสีแดง ไตบวม มีเลือดคลั่งในตับ และมีการอักเสบของกล้ามเนื้อ (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2528; Inglis et al., 1993)

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* จะอาศัยคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียความสามารถในการสร้างเอนไซม์ haemolysin มีคุณสมบัติย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มเบื้องต้น โดยดูจากรูปแบบการย่อยเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่รอบ ๆ โคโลนีของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ดังนี้

(1) Alpha-haemolytic เป็นกลุ่มที่มีลักษณะการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่สามารถทำให้รงควัตถุ haemoglobin หลุดจากเซลล์เม็ดเลือดได้ ซึ่งสังเกตได้จากโซนสีเขียวเกิดรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

(2) Beta-haemolytic เป็นกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ haemolysin ย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้ haemoglobin หลุดออกจากตัวเซลล์ ทำให้เกิดโซนใสขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

(3) Non-haemolytic (Gramma-haemolytic) เป็นกลุ่มที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง ทำให้ไม่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ

ส่วนการแบ่งกลุ่มตามวิธีของ Lancefield จะเป็นวิธีการแบ่งกลุ่มที่อาศัยวิธีทางซีรั่มวิทยา โดยจะดูความแตกต่างของ lipoprotien ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ซึ่งปรากฏอยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยสามารถแบ่งเชื้อตามคุณลักษณะของแอนติเจนออกได้เป็น 20 กลุ่ม ตั้งแต่กลุ่ม A-H และ K-V อย่างไรก็ตามพบว่าการแบ่งกลุ่มตามวิธีดังกล่าวจะมีความไม่แน่นอนมากนัก เนื่องจากเชื้อบางชนิดสามารถถูกจัดอยู่ได้หลายกลุ่ม และในแต่ละกลุ่มอาจประกอบด้วยเชื้อ *Streptococcus* หลายชนิด ซึ่งมีเพียงกลุ่ม B เท่านั้นที่ประกอบด้วยเชื้อ *S. agalactiae* เพียงชนิดเดียว ส่วนเชื้อในกลุ่มอื่น ๆ ยกตัวอย่าง เช่น กลุ่ม A ได้แก่ เชื้อ *S. pyogenes* ก่อโรคในคนโดยเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อบริเวณคอหอย ไวต่อการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม bacitracin ซึ่งใช้วินิจฉัยเชื้อกลุ่มนี้ กลุ่ม B มีเพียงเชื้อ *S. agalactiae* ชนิดเดียวเท่านั้น เป็นเชื้อที่ก่อโรคทั้งในคน และสัตว์ มีคุณสมบัติต้านต่อการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม bacitracin กลุ่ม C ได้แก่ เชื้อ *S. equi* (sub. *equi*), *S. phocae*, *S. dysgalactiae* (sub. *equisimilis*) พบก่อโรคในสัตว์หลายชนิด เช่น วัว ม้า กลุ่ม D ได้แก่ เชื้อ *S. faecalis* ครอบคลุมเชื้อสกุล *Enterococcus* เป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเค็ม 6.5% NaCl และมีความต้านทาน ต่อยา penicillin G พบได้ในทางเดินอาหารของคน มักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ ถุงน้ำดี และระบบหมุนเวียนโลหิต กลุ่ม E ได้แก่ เชื้อ *S. porcinuss* เป็นเชื้อที่ก่อโรคทั้งในคน และสัตว์ เช่น สุกร กลุ่ม F, G, H และ K-U เชื้อ

Streptococcus ในกลุ่มเหล่านี้ก่อโรคในคน เช่น *S. canis* กลุ่ม N ได้แก่ เชื้อ *S. lactis* เป็นสาเหตุการบูดเสียของน้ำนม ส่วนเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มในระบบ Lancefield ได้ เช่น *S. iniae* และ *S. didelphis* (ภิรัตน์ มั่นใจอางค์, 2552)

2.3 *Streptococcus agalactiae*

2.3.1 ประวัติการค้นพบของเชื้อ

ชื่อเต็มของเชื้อนี้ คือ Lancefield group B beta streptococci ซึ่งถูกแบ่งเป็นกลุ่มตามวิธีการของ Lancefield หรือมีชื่อว่า group B streptococcus (GBS) (Joyce et al., 2009) โดยวิธีการของ Lancefield จะเป็นวิธีการแบ่งกลุ่มที่อาศัยวิธีทางซีรั่มวิทยา โดยจะดูความแตกต่างของ lipoprotein ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนซึ่งปรากฏอยู่บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีเพียงกลุ่ม B เท่านั้น คือ แบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่มีลักษณะเช่นนี้ ครั้งหนึ่งเชื่อว่าเชื้อนี้ก่อโรคได้เฉพาะในสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อในวัว หรือโค โดยก่อให้เกิดอาการเต้านมอักเสบที่รุนแรง เชื้อนี้ต้านทานต่อการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม bacitracin (ภิรัตน์ มั่นใจอางค์, 2552) พบว่า เชื้อนี้มีการระบาดหนักในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดด้วยเช่นกัน ได้แก่ ปลานิล ปลากะพงขาว เป็นต้น (นเรศ ซ่วนยุก และคณะ, 2548)

2.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

S. agalactiae จัดอยู่ใน Group B streptococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) (ภาพที่ 2) เซลล์แบ่งตัวตั้งฉากกับแกนยาวของสาย ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มักพบอยู่เป็นคู่ หรือเป็นสาย (ภาพที่ 3) สามารถเจริญได้ในสภาพทั้งที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน โคโลนีของแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษะโปร่งแสง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2528)

(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *S. agalactiae* (ก) กำลังขยาย 100 เท่า (ข) กำลังขยาย 1000 เท่า (The Journal of Undergraduate Biological Studies, 2011)

ภาพที่ 3 ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของ *S. agalactiae* (Institut Pasteur, 2011)

2.3.3 การจัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน

Kingdom Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Lactobacillales

Family Streptococcaceae

Genus *Streptococcus*

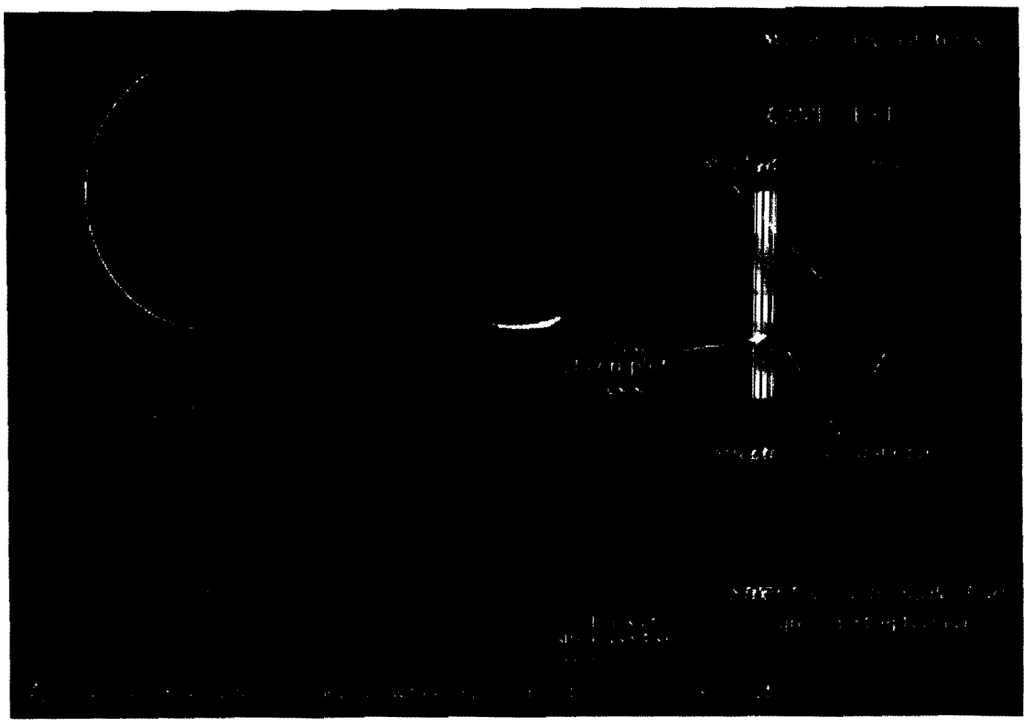
Species *S. agalactiae*

Binomial name: *Streptococcus agalactiae* Lehmann and Neumannn (1896) (Wikipedia, 2011)

2.3.4 การเพาะเชื้อ

เชื้อ *S. agalactiae* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก จึงต้องมีการเติมส่วนของเลือด ซีรั่ม หรือน้ำไขสันหลังลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar (BHIA) (Kitao, 1982), Todd-Hewitt broth agar (THBA), nutrient agar และ horse meat infusion agar (HMIA) โดยมีการเติมเลือด (blood agar) ร่วมกับการเติมยาปฏิชีวนะ oxolinic acid 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร colistin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสามารถเพาะเชื้อนี้ได้ในอาหารเหลว ซึ่งมักเจริญได้เป็นดิโพลคอกไค หรือเป็นเส้นสายโซ่สั้น ๆ ผิดกับ streptococci group A, C และ G ที่เป็นสายยาว มีบีตาฮีโมไลซิสที่เกิดจากฮีโมไลซินที่ต่างจากของ streptococci group A ซึ่งฮีโมไลซินนี้มีสมบัติคล้ายของสเตรปโตไลซินเอส (SLS) มากกว่าสเตรปโตไลซินโอ (SLO) ตรงที่จะไม่ขับสารออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง โคโลนีจะมีขนาดใหญ่และเป็นเมือกเยิ้มบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4) ส่วนใหญ่จะสร้างรงควัตถุสีเหลือง แดง หรือส้ม รงควัตถุคาโรทีนอยด์จะเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ และการสร้างรงควัตถุจะถูกยับยั้งถ้าเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

ในอาหารผสมเลือดแกะจะให้บีตาฮีโมไลซิส โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) เชื้อสามารถไฮโดรไลซ์โซเดียมฮิพพูเลท (sodium hippurate) และไม่ไวต่อยาบาซิตราซิน ส่วนใหญ่เจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 6.5% มีส่วนน้อยที่เจริญในน้ำดี 50% ไม่ไฮโดรไลซ์เอสคูลิน มีส่วนน้อยที่ไวต่อยาบาซิตราซิน เชื้อพวกนี้สร้าง DNase ฮิพพูริเคส (hippuricase) นิวรามินิเดส (neuraminidase) และไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase)



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของ *S. agalactiae* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเลือดแกะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ด้วย CO_2 50% (Microbiologyinpictures, 2011)

2.3.5 โครงสร้างแอนติเจน

S. agalactiae มี group-specific carbohydrate ที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคซามิน (D-glucosamine), ดี-กาแลกโทส (D-galactose) กลูซิทอล (glucitol)และแอล-แรมโนส (L-rhamnose) มีแคปซูล-ซีโรทัยป์ (capsular serotype) อย่างน้อย 5 ชนิด คือ Ia Ib Ic II และ III หรือมี IV V VI VII และ VIII (Christian, 2011)

ปัจจุบันมีรายงานการวิจัย พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* สามารถสร้างสาร glutathinone (GSH, γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) ซึ่งเป็นสารที่สร้างจาก γ-glutamylcysteinyl synthetase (γ -GCS) และ glutathione synthetase (GS) โดยสาร glutathinone นี้เป็นลักษณะเด่นอันดับแรกของสารประกอบกลุ่ม non-protien thiol compound ของเซลล์สิ่งมีชีวิต ในเซลล์แบคทีเรียสารนี้จะมีความสำคัญ และมีบทบาทหลายประการในขบวนการเมตาโบลิซึม เช่น การสร้างสารต่อต้านจำพวก reactive oxygen toxicity (Kuniko et al., 2007)

2.3.6 การเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในสิ่งมีชีวิต

2.3.6.1 การก่อโรคในคน

เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง และทำให้เกิดพิษในเลือด หรือในเนื้อเยื่อเด็กแรกเกิด (neonatal sepsis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กแรกเกิด แบคทีเรีย Group B streptococci มักพบเสมอที่ฟาริงซ์ (pharynx) ทางเดินอาหาร และช่องคลอด ประมาณ 15-20% ของหญิงตั้งครรภ์อาจเป็นพาหะนำเชื้อนี้ และอาจถ่ายทอดเชื้อนี้ไปยังทารกได้ โดยอาจติดเชื้อขณะคลอด หรือก่อนคลอด (early-onset disease) และติดเชื้อหลังคลอด (late-onset disease) ทำให้ทารกเกิดภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteremia) และเกิดปอดบวม หรือเยื่อหุ้มสมอง และไขสันหลังอักเสบได้ นอกจากนี้เชื้อนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง ทำให้เยื่อบุหัวใจอักเสบ โลหิตเป็นพิษในเด็กแรกเกิด เยื่อหุ้มสมอง และไขสันหลังอักเสบ หูอักเสบ ข้ออักเสบ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544) พบว่าการติดเชื้อ *S. agalactiae* เกิดขึ้นบ่อยที่สุดภายหลังการคลอดซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของภาวะติดเชื้อรุนแรงในทารกแรกเกิด การติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส Group B พบได้ทั่วไป ผู้ที่ได้รับเชื้อบางรายไม่เกิดอาการผิดปกติแต่อย่างใด ตัวเชื้อเองพบได้ในลำไส้ ช่องคลอด กระเพาะปัสสาวะ และลำคอ ร้อยละ 25 ของหญิงตั้งครรภ์ จะพบเชื้อสเตรปโตคอคคัส Group B ในช่องคลอดและทวารหนัก ผู้ที่ได้รับเชื้อแต่ไม่เกิดโรคจัดเป็นพาหะ โรคติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส Group B ไม่ใช่โรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ระยะหลัง ๆ เริ่มมีรายงานทางการแพทย์มากขึ้นเกี่ยวกับการติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส Group B ในผู้ป่วยที่ไม่ใช่หญิงมีครรภ์ โดยเฉพาะในผู้สูงอายุที่มีโรคประจำตัว

แบคทีเรียชนิดนี้จะมีปฏิกิริยาต่อกลุ่มยาเพนนิซิลลิน (penicillin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) และมีรายงานว่ามีปฏิกิริยาต่อ เซฟาโซลิน (cefazolin) อีริโทรมัยซิน (erythromycin) คลินดามัยซิน (clindamycin) ด้วยเช่นกัน แต่กลุ่มยาเพนนิซิลลินถือว่าเป็นทางเลือกอันดับแรกของแพทย์ที่จะนำมา ใช้บำบัดให้กับผู้ป่วย แต่ก็ยังไม่มีการรายงานชัดเจนว่ายาเพนนิซิลลินนั้นจะให้ผลดีในด้านต่าง ๆ ของการรักษาดีกว่ายาปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ (Christian, 2011)

อาการในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้อย่างรุนแรง (invasive disease) พบว่า เชื้อ *S. agalactiae* จะกระจายเข้าสู่กระแสเลือด อาจทำให้เกิดภาวะปอดติดเชื้อ กระดูก และข้อติดเชื้อ ในบางรายอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบประสาทได้ มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะเกิดภาวะลิ้นหัวใจอักเสบ ผิวหนังติดเชื้อ และยังพบว่ามีการติดเชื้อนี้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคมะเร็ง และผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี (HIV)

การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ยาปฏิชีวนะที่แพทย์ใช้สำหรับรักษา และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* แพทย์จะพิจารณาใช้ยาในกลุ่มเพนนิซิลลินเป็นหลัก โดยให้

การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เป็นยาฉีด และใช้เวลารักษาเป็นเวลาเท่าใดนั้นขึ้นกับความรุนแรงของการติดเชื้อ ปกติจะใช้เวลาที่ 2 สัปดาห์ เชื้อรุนแรงอาจใช้เวลา 4-6 สัปดาห์ และอาจต้องให้ยามากกว่าปกติ 2-3 เท่า (วรวุฒิ เจริญศิริ, 2554)

2.3.6.2 การก่อโรคในโคนม

เชื้อ *S. agalactiae* ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้นั้นไม่ใช่สายพันธุ์เดียวกันกับที่ก่อให้เกิดโรคในคน เพราะฉะนั้นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมนั้นจะไม่สามารถแพร่ระบาดสู่คนได้ (American Association of Bovine Practitioner, 2011) โรคเต้านมอักเสบในโคนมนั้นมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นส่วนมาก แต่อาจเกิดจากเชื้อรา หรือยีสต์ก็ได้ ซึ่งโคสามารถติดเชื้อแบคทีเรียได้จาก 2 แหล่ง คือ จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และจากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวโค เช่น อุจจาระ พื้นคอก มือผู้รีด เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียที่พบในสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวโค ได้แก่ *Streptococcus* spp., *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas pseudomallei* ส่วนเชื้อที่พบเฉพาะที่ตัวโคได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *S. agalactiae* เมื่อเชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้นพร้อมกับมีแรงมากระแทกที่เต้านม จะทำให้รูหัวนมโคเปิด เชื้อก็จะเข้าสู่ภายในเต้านมได้ จากนั้นเชื้อจะไปทำลายเนื้อเยื่อของเต้านมโดยการเกาะยึดเนื้อเยื่อ เมื่อเซลล์เต้านมอักเสบ เม็ดเลือดขาวจากเส้นเลือดก็พรั่งพรูเข้าสู่เต้านมเพื่อทำลายเชื้อตัวนั้น โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจึงตรวจพบปริมาณเม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ (บ้านวัวดี, 2554) เชื้อ *S. agalactiae* นั้นสามารถมีชีวิตอยู่ และขยายพันธุ์ได้เฉพาะในบริเวณเต้านมโค ในสิ่งแวดล้อมภายนอกนั้นอาจจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระยะสั้นมากเพียงไม่กี่วันเท่านั้น (American Association of Bovine Practitioner, 2011) มีการแพร่ระบาดของเชื้อจากโคที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ไปสู่โคที่ไม่มีเชื้อได้ในระหว่างการใช้เครื่องรีดนม โคจากตัวหนึ่งไปสู่ตัวหนึ่ง มือคนรีดนม หรือถุงมือที่ใช้รีดนม ดังนั้นอุปกรณ์ทำความสะอาดหัวนมโค เช่น ผ้าขนหนู หรืออุปกรณ์ที่นำมาใช้ร่วมกับโคหลาย ๆ ตัว ในฟาร์ม ควรเปลี่ยนทุกครั้ง และหรือใช้อุปกรณ์เหล่านี้เฉพาะโคตัวนั้น ๆ หรือมีการล้างทำความสะอาดมือ หรือเครื่องมือทุกครั้งสำหรับการใช้ในโคแต่ละตัว (Mike, 2005)

อาการของโรคเต้านมอักเสบในโคนม ที่เกิดจากทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา นั้นจะมีการอักเสบของส่วนต่าง ๆ ของเต้านม เช่น กระเปาะสร้างนม ท่อน้ำนม ท่อรวมน้ำนม หรือโพรงหัวนม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเต้านม น้ำนม และส่วนประกอบของน้ำนม โคจะแสดงอาการของเต้านมอักเสบ ซึ่งมี 2 ลักษณะอาการที่สำคัญ คือ

(1) เต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเต้านมและน้ำนม โคยเต้านมอาจมีลักษณะบวมแข็งเท่านั้น หรือในรายที่เป็นรุนแรงมากอาจถึงกับเต้านม

แตกก็มี ส่วนลักษณะน้ำนมอาจพบตั้งแต่น้ำนมเป็นสีเหลืองเข้มข้นจนถึงเป็นน้ำใสมีหนองปนเลือด เต้านมอักเสบแบบนี้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

(1.1) เต้านมอักเสบชนิดรุนแรง เต้านมอักเสบชนิดนี้ แม่โคจะแสดงอาการป่วยร่วมด้วย เช่น มีไข้ เบื่ออาหาร หายใจหอบ และท้องเสีย

(1.2) เต้านมอักเสบชนิดไม่รุนแรง เต้านมอักเสบชนิดนี้ แม่โคจะกินอาหารได้ตามปกติ อาจพบมีไข้เล็กน้อย

(1.3) เต้านมอักเสบชนิดเรื้อรัง เต้านมอักเสบชนิดนี้ พบการเปลี่ยนแปลงของเต้านมได้เล็กน้อย หรืออาจพบแต่เพียงน้ำนมเปลี่ยนแปลงให้เห็นก็ได้ มักจะเป็น ๆ หาย ๆ เมื่อคลำดูจะพบก้อนแข็งอยู่ภายในเต้านม

(2) เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเต้านม และน้ำนมให้เห็น การอักเสบแบบนี้พบได้ 8-10 เท่า ของการอักเสบแบบแสดงอาการ และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คุณภาพน้ำนมเสื่อม เนื่องจากปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และเม็ดเลือดขาวในน้ำนมสูง สามารถตรวจได้โดยใช้น้ำยา california mastitis test (CMT) หาปริมาณเม็ดเลือดขาวในน้ำนม

อาการของโคที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบนั้นจะแสดงอาการคือ เต้านมบวม น้ำนมที่บีบออกมานั้นมีสี และลักษณะผิดจากปกติ เชื้อ *S. agalactiae* ที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบได้นั้น ปริมาณเชื้อมากน้อยเพียงใดในโคนมที่มีอาการของโรคนั้น จะสามารถตรวจสอบปริมาณของเชื้อได้ โดยการสังเกตว่ามีก้อนเชื้ออยู่ในถังบรรจุนมหรือใช้วิธีนับโซมาติกเซลล์ของแบคทีเรีย somatic cell counts (SCC) ซึ่งจะพบว่ามีปริมาณเชื้อมากกว่า 400,000 เซลล์/มิลลิลิตร หรือถ้านับแบบสุ่ม occasional counts จะมีปริมาณสูงถึง 700,000 เซลล์/มิลลิลิตร หรือมากกว่า (Mike, 2005)

การรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนม ต้องใช้ยาปฏิชีวนะเป็นส่วนมาก เพราะสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดก็สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ เพื่อจะได้ใช้ยาให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* จะรักษาโดยใช้ยาเพนนิซิลลิน การรักษาเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ เต้านมอักเสบที่แสดงอาการไม่รุนแรง พบเฉพาะการเปลี่ยนแปลงลักษณะน้ำนม และเต้านมบวมเล็กน้อย ส่วนโคไม่แสดงอาการป่วยร่วมด้วย ลักษณะเช่นนี้ใช้ยาสอดเต้าสำเร็จรูปของบริษัทต่าง ๆ เช่น คล๊อกซาเจล 200 (cloxagell 200), เจนทริเยน (gentreyen), แอมปิโอแฟค (ampiofax), ลีโอเยลโล (leoyellow), กานามัยซิน (kanamycin) หรืออีริโทรมัยซิน (erythromycin) สอดเต้าวันละ 1-2 ครั้ง

เป็นเวลา 2-3 วัน ก็ได้ผลดี แต่ถ้าเป็นเต้านมอักเสบแบบรุนแรง แม่โคแสดงอาการป่วยร่วมด้วย เช่น ซึม ไข้สูง เบื่ออาหาร หายใจหอบ ถ้าพบลักษณะเช่นนี้จะต้องรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ หรือซัลฟาฉีดเข้ากล้าม หรือเข้าเส้นเลือดร่วมกับการให้น้ำเกลือ แอนติฮีสตามิน ยาลดการอักเสบ อ๊อกซีโตซิน แต่ก่อนรักษาควรเก็บน้ำนมส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเพื่อหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าเชื้อนั้นก่อน การให้อ๊อกซีโตซินก่อนรีดนมจะช่วยให้เต้านมปล่อยน้ำนมออกมาหมด และการให้ยาคอร์ติโคสเตอรอยด์แก่แม่โคท้องแก่อาจทำให้เกิดการแท้งลูกได้ วิธีรักษาโดยการสอดยาเข้าเต้านมนั้นก่อนสอดยาเข้าเต้านมหัวนมจะต้องสะอาดและแห้ง ทำความสะอาดหัวนมโดยเฉพาะรูเปิดด้วยแอลกอฮอล์ 70% และแต่ละเต้าควรใช้สำลีคนละชิ้น การสอดยาไม่ควรสอดหัวฉีดเข้าไปในหัวนมจนสุด เพราะจะไปทำอันตรายต่อสารเคราตินที่รูเปิดหัวนมได้ เมื่อสอดยาหมดแล้วควรคลึงเต้านมด้วยเพื่อให้ยากระจายออกไปทั่วทั้งเต้า ส่วนการรักษาเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ เต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการจะมีประมาณ 8-10 เท่า ของแบบแสดงอาการ ถ้าพบว่าน้ำนมภายในฟาร์มไม่ผ่านการตรวจรับของศูนย์รวมนม และปริมาณเม็ดเลือดขาวภายในน้ำนมสูง จะต้องทำการตรวจหาเชื้อจากแม่โคทุก ๆ ตัว และทุกเต้า เมื่อพบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ต้องรักษาทันที เพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อออกไปสู่แม่โคตัวอื่น ๆ

2.3.6.3 การก่อโรคในปลา

โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสในปลา สร้างความสูญเสียต่อการผลิตปลาน้ำจืด และปลาน้ำเค็มจำนวนมาก อาจเกิดซ้ำในบริเวณที่เคยเกิด หรือเกิดขึ้นในบริเวณที่ไม่เคยมีโรค หากขาดการจัดการฟาร์ม และระบบมั่นคงทางชีวภาพ (biosecurity system) พบเชื้อสเตรปโตคอคคัสที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคในปลานิล คือ *S. agalactiae* และ *S. iniae* นอกจากนี้องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties, OIE) ระบุว่าเชื้อ *S. iniae* สามารถก่อให้เกิดโรคจากสัตว์สู่คนได้ (zoonosis) การระบาดของเชื้อโรคในปลาพบได้ในปลาทุกขนาด และอาจเกิดจากรูปแบบการจัดการฟาร์ม โดยฟาร์มที่มีการเปลี่ยนแปลงการจัดการอย่างรวดเร็ว ความหนาแน่นในการเลี้ยงปลาสูง การจับปลา หรือการขนย้ายปลาที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดบาดแผลตามตัว รวมทั้งคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ ปริมาณแอมโมเนีย หรือไนไตร์ตสูง ทำให้ปลาเกิดความเครียดส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลา การติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายปลาเกิดจากการกินปลาป่วย หรือปลาตายที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นอาหาร หรือติดเชื้อผ่านทางบาดแผลบริเวณผิวหนัง และเยื่อบุอวัยวะต่าง ๆ (สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553) คุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบได้ (systemic infection) เช่น

(1) แอนติเจนที่ผิวเซลล์ (surface antigens) ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสเกาะพื้นผิวเซลล์ของปลา ช่วยปกป้องการถูกทำลายจากเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลา ช่วยให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวน และกระจายผ่านทางน้ำเหลือง และเลือด (septicemia) ไปยังอวัยวะเป้าหมายของปลา ได้แก่ ตับ ไต ม้าม และสมอง เป็นต้น

(2) การสร้างสารพิษ สารพิษหลักของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ได้แก่ ฮีโมไลซิน หรือสเตรปโตไลซิน (streptolysin) แบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ streptolysin S และ streptolysin O สารพิษทั้งสองชนิดนี้ทำให้เกิดการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่สมบูรณ์บน blood agar โดย streptolysin S ทำให้เกิดการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ส่วนพื้นผิวของ blood agar (surface hemolysis) ส่วน streptolysin O ทำให้เกิดการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ส่วนลึกของ blood agar (deep hemolysis) ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สารพิษชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ และเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาว ตับ และหัวใจ

(3) การผลิตเอนไซม์ เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส ส่วนใหญ่สามารถย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ก้อนไฟบริน (fibrin) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นต้น ทำให้เชื้อโรคสามารถแทรกผ่านเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายได้ง่าย โดยเฉพาะในกรณีที่เกิดบาดแผลบริเวณผิวหนัง หรือเยื่อบุของอวัยวะต่าง ๆ

อาการปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มักพบอาการในปลาขนาดใหญ่มากกว่า 300 กรัม อาการป่วยที่เด่นชัดมี 2 รูปแบบ คือ

(1) อาการป่วยแบบเฉียบพลัน ปลาจะว่ายน้ำผิดปกติ ไม่มีทิศทาง สูญเสียการทรงตัว บางตัวอาจแสดงอาการควงสว่าน ลักษณะภายนอกที่เด่นชัด คือ ท้องขยายใหญ่ ตาโปน กระจกตาขุ่น หรืออาจมีเลือดออกบริเวณลูกตา มีเลือดคั่งบริเวณโคนครีบ แผ่นปิดเหงือก ผิวหนัง และรอบรูทวาร ลักษณะอาการภายในที่เด่นชัด คือ มีของเหลวลักษณะใส หนืด หรือปนเลือดในช่องท้อง ตับขยายใหญ่มีสีซีดลง ม้ามขยายใหญ่ แต่ลูกปลาอาจไม่พบลักษณะผิดปกติดังกล่าว

(2) อาการป่วยแบบเรื้อรัง ปลาที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจพบลอยตัวอยู่บริเวณผิวน้ำ มีสีลำตัวเข้มขึ้นในปลานิลดำ หรือซีดลงในปลานิลแดง อาจพบรอยโรคภายนอก เช่น ตุ่มหนองบริเวณครอดหาง หรือใต้คาง และรอยโรคภายใน เช่น การอักเสบของเยื่อบุช่องท้องแบบไฟบริน การอักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจ ปลากินอาหารลดลง อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ทำให้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น สภาพซากไม่สมบูรณ์ มีตำหนิ ส่งผลให้เนื้อปลานิลไม่ได้มาตรฐาน (สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2553)ส่วนที่มีการระบาด และก่อโรคในปลานิลแดงนั้น พบว่า เชื้อเมื่อแพร่ระบาดเข้าสู่ตัวปลา จะทำให้ตับ ม้าม และไตบวม และเกิดช่องว่างภายใน โดยโคโลนีของ

เชื้อแบคทีเรียจะเข้าโอบล้อมท่อลำเลียงเลือดในทันที เยื่อหุ้มสมองจะหนาบวมขึ้น เพราะมีน้ำเหลืองเกิดขึ้นมากมาย ซึ่งเกิดขึ้นกับในส่วนของลำไส้ได้เช่นกัน (Zamri-Saad et al., 2010)

จากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า *S. agalactiae* หลายสายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดโรคได้ในปลานิล และปลาชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะโรค streptococcosis (นเรศ ช่วนยุก และคณะ, 2548) ซึ่งเป็นโรคที่ระบาดได้ทั้งในปลาธรรมชาติ และปลาในฟาร์มเพาะเลี้ยง พบระบาดทั้งในเขตน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม สร้างความเสียหายรุนแรงต่อการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจหลายชนิด ในประเทศไทยเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว และปลานิล ซึ่งมีการระบาดในเขตภาคกลาง และภาคใต้ (ภิรัตน์ มั่นใจอางค์, 2552) และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มีการระบาดหนักในตัวอ่อนของปลานิลแดงที่เลี้ยงในฟาร์มเสแลงกอร์ ประเทศมาเลเซีย (Abuseliana et al., 2011) การชันสูตรโรคสเตรปโตคอคคัสในปลานิลทางห้องปฏิบัติการ สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2553) ได้กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรคสเตรปโตคอคคัสในปลานิลทางห้องปฏิบัติการ ด้วยการชันสูตรซากร่วมกับวิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว (rapid staining test) การตรวจตัวอย่างด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา (histopathological method) วิธีจุลชีววิทยา (microbiological method) และวิธี polymerase chain reaction (PCR) วัตถุประสงค์เพื่อคัดกรอง และยืนยันโรคในปลาป่วย หรือปลาที่ติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการ หรือรอยโรค (carrier fish) และการเฝ้าระวังโรค ทำให้การควบคุมโรคภายในฟาร์มเป็นไปอย่างรวดเร็ว ลดความสูญเสียในการผลิต และการแพร่กระจายเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม วิธีการชันสูตรแต่ละวิธีมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีการชันสูตรโรคสเตรปโตคอคคัสนั้นขึ้นกับวัตถุประสงค์และชนิดตัวอย่างที่เก็บ เช่น ปลานิลป่วยที่แสดงรอยโรคสามารถชันสูตรโรคได้โดยวิธีจุลชีววิทยา ลูกปลานิลในโรงเพาะฟัก หรือปลานิลที่สงสัยว่าติดเชื้อสามารถชันสูตรโรคได้โดยใช้วิธีจุลชีววิทยาหรือวิธี PCR การตรวจรับรองปลานิลที่จะนำเข้ามาในราชอาณาจักรให้ใช้วิธี PCR

การแก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลานิลที่นิยมทำกันอยู่ในปัจจุบัน คือ การใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เช่น ampicillin, penicillin G, erythromycin, oxytetracycline, nalidixic acid, oxolinic acid, sulphamethoxazol, chloramphenical และ nitrofurans แต่การใช้ยาปฏิชีวนะมักก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา เช่น หากใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน หรือใช้ในปริมาณที่มาก อาจทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งการดื้อยาดังกล่าวอาจแพร่จากแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะในการแก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลามีแนวโน้มที่จะถูกควบคุมอย่างเข้มงวด หรือถูกห้ามการใช้ในอนาคต ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อนำมาใช้แก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียของปลาจึงทำกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

มีการศึกษา และผลงานวิจัยหลายเรื่อง ที่เกี่ยวข้องกับวิธีทางเลือกในการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลาโดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะ งานวิจัยของ ภิรัตน์ มั่นใจอางค์ (2552) เป็นการทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล เนื่องจากการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะนั้น ประสบปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ทำให้การรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร ปัจจุบันจึงหันความสนใจมาใช้วัคซีนเพื่อเสริมสร้างสุขภาพของสัตว์น้ำให้มีความต้านทานโรคเพิ่มสูงขึ้น และลดความเสี่ยงของการเกิดโรคระบาดระหว่างการเพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดี ซึ่งวิธีนี้เหมาะสมกับรูปแบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนาในปัจจุบัน ดังนั้นการพัฒนารูปแบบ และวิธีการให้วัคซีนจึงต้องมีประสิทธิภาพที่จะสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคในช่วงระยะเวลาของการเลี้ยงปลาได้ การเตรียมวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* โดยจะเก็บตัวอย่างเชื้อจากปลานิลที่แสดงอาการของโรค โดยแยกเชื้อจากอวัยวะ ตับ ม้าม ไต และสมอง ด้วยวิธีปลอดเชื้อลงบนอาหาร brain heart infusion agar (BHIA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ย้อมสีแกรม และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 Strep (Biomerieux) เขี่ยโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้ลงในอาหาร Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ปริมาตร 500 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปั่นล้างอาหารเลี้ยงออก และปั่นล้างตะกอนเชื้อแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที รอบละ 15 นาที ทั้งหมด 3 รอบ ทำการเติมฟอร์มาลินลงในสารละลายแบคทีเรียโดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจยืนยันการตายของแบคทีเรีย โดยเขี่ยสารละลายแบคทีเรียที่ได้ลงบนอาหาร BHI agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร จะทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรีย ให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียในสารละลายประมาณ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร โดยการวัดค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.15 ที่ช่วงความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร สารละลายแบคทีเรียที่ได้ คือ วัคซีนที่จะนำมาใช้

สุปราณี พึ่งแพง (2550) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาต่อการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาที่ทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ได้ คือ เชื้อ *Bacillus licheniformis* และ *B. subtilis* เมื่อนำแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ภายใต้สภาพห้องทดลอง โดยการแช่เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10^5, 10^6 และ 10^7 CFU/ml ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml นาน 14 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* รหัส B-1 ทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถลดอัตราการตายสะสมที่

14 วัน ของการทดลองเป็น 15.33 ± 2.93, 13.67 ± 2.62 และ 8.33 ± 2.77% ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ *B. licheniformis* รหัส B-1 มีอัตราการตายสะสมสูงถึง 61.67 ± 2.58 เปอร์เซ็นต์

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์ ทินวรรธน์ ศรีสุข และวรวิทย์ วัชชวัลคุ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อ *S. agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล ซึ่งได้เตรียมวัคซีนจากเชื้อ *S. agalactiae* ด้วยวิธี formalin-killed ให้วัคซีนแก่ปลาโดยฉีดเข้าทางช่องท้องที่ระดับความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 CFU/ml ตามลำดับ เพื่อทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดเชื้อด้วย *S. agalactiae* เข้าช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml เท่านั้นที่มีระยะการปลอดเหตุการณ์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ระดับ antibody ต่อเชื้อ *S. agalactiae* ของปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีนมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรคของวัคซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) สรุปได้ว่าวัคซีนที่เตรียมขึ้นสามารถใช้ป้องกันโรค streptococcosis ที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลอย่างได้ผล เมื่อให้วัคซีนแก่ปลาโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ml

ภัทริดา โปฏก และคณะ (2554) ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ในปลานิล โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. licheniformis, B. pumilus* และ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*A. hydrophila* ABRCA1 และ *S. agalactiae* ABRCS1) ในปลานิล โดยวิธี cross streak method พบว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ABRCA1 ส่วนเชื้อ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญครอบครองโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS1 ในอาหารเหลว ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันคือ 10^5 CFU/ml การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิด มีคุณสมบัติที่ดีในการนำไปใช้ลดปริมาณเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงปลานิลได้

2.4 *Aeromonas hydrophila*

2.4.1 ประวัติการค้นพบของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila เป็นหนึ่งในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค motile aeromonas และโรคนี้มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในปลาน้ำจืด เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแรกที่ทำให้เกิดโรคระบาดในปลา ในสัตว์เลือดเย็นชนิดอื่น ๆ เช่น จระเข้ งู เต่า ตะพาบน้ำ และสัตว์เลือดอุ่น เช่น วัว ควาย รวมทั้งมนุษย์ด้วย ความรุนแรงของเชื้อจะแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่ ดังนั้นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จึงมีชื่อพ้องกันหลาย

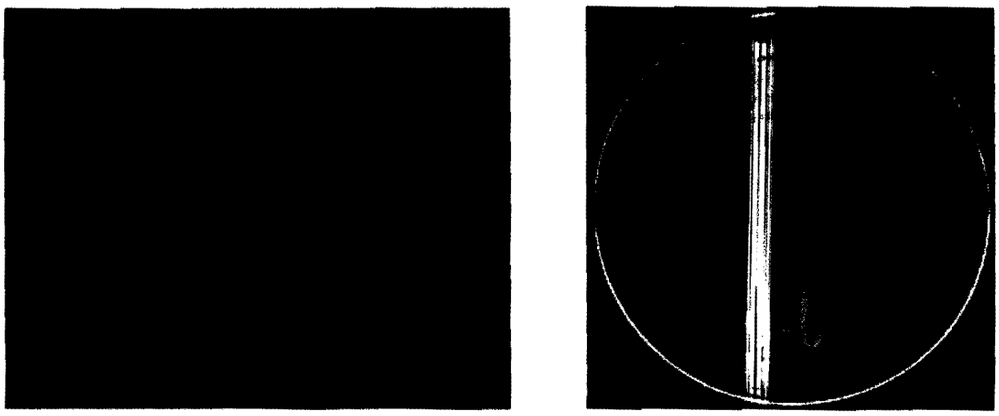
ชื่อ ซึ่งเรียกตามอาการของปลา หรือสัตว์ป่วย เช่น โรคขาแดง (red leg) ในกบ ส่วนถิ่นที่อยู่อาศัยของเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในน้ำจืดทั่วไป โดยเฉพาะในแหล่งน้ำที่มีปริมาณอินทรีย์สารสูง เช่น น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน เป็นต้น เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีแหล่งที่อยู่อาศัยในแหล่งน้ำ จึงพบว่ามีการแพร่ของเชื้อได้ในสัตว์เลี้ยงของชุมชน เช่น ปลา หอย เป็ด ไก่ และสัตว์จำพวกเนื้อ ซึ่งก่อเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร มีการตรวจพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญได้ในอาหารของเราได้ขณะเก็บไว้ในตู้เย็น (Daskalove, 2006)

2.4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นตรง (short rod) ขนาดความกว้างประมาณ 0.7-0.8 ไมครอน ขนาดความยาวประมาณ 1.0-1.5 ไมครอน (ภาพที่ 5 ก) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแส้ (flagellum) อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 6) และมีแส้เพียงเส้นเดียวเท่านั้น

ลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม ผิวเรียบ ตรงกลาง โค้งนูน สีขาวนวล มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ บางครั้งพบเป็นสายสั้น ๆ (ภาพที่ 5 ข) เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เป็น chemoorganotroph จึงใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหาร และพลังงาน เนื่องจากเป็น facultative anaerobes จึงสามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีในที่ซึ่งมีปริมาณอินทรีย์สารสูง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เจริญได้ในช่วงความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5-9.0 ในสภาวะปกติเชื้อจะ มีลักษณะโคโลนีคล้ายของแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบที่อยู่ในลำไส้ (enteric gram negative rod) และเกิดโซนย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolysis zone) ขนาดใหญ่ในอาหารผสมเลือด เชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่นำมาจากตัวอย่างของอุจจาระ เมื่อนำมาเลี้ยงจะเจริญได้ในอาหารที่สามารถบอกความแตกต่าง (differential media) ได้ โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบจากลำไส้เล็ก *A. hydrophila* จะต่างจากแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบในลำไส้ ตรงที่มีปฏิกิริยาออกซิเดสเป็นบวก และมีโพลาร์แฟลกเจลลา มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำเสีย จัดเป็น normal microbial flora หรือ opportunistic pathogen ในสัตว์น้ำและสัตว์เลือดเย็นอื่น ๆ เช่น กบ เต่า และตะพาบน้ำ เป็นต้น แบคทีเรีย *A. hydrophila* นั้นไวต่อยาเตตราซัยคลิน (tetracycline) อะมิโน-ไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เซฟาแมนโดล (cefamandole) เจนตาไมซิน (gentamicin) ไตรเมโธพริม (trimethoprim) ซัลฟาเมธอกซาโซล (sulfamethoxazole) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) แต่ดื้อยาเพนิซิลลิน (penicillin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) เซฟาโลทิน (cephalothin) และคาร์เบนิซิลลิน (carbenicillin) การตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จากปลา

ป่วยทำได้โดยการเขี่ยเชื้อจากแผล เหงือก ตับ ไต และเลือด ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และจำแนกเชื้อด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)



(ก) (ข)

ภาพที่ 5 ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะโคโลนีของ *A. hydrophila* (Wikipedia, 2011)

(ก) เซลล์แบคทีเรีย *A. hydrophila* กำลังขยาย 100 เท่า

(ข) ลักษณะโคโลนีของ *A. hydrophila* ที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อ

(ก) (ข)

ภาพที่ 6 ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด และส่องผ่านของ *A. hydrophila*

(ก) เซลล์แบคทีเรีย *A. hydrophila* ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

(Microbe Wiki, 2011)

(ข) เซลล์แบคทีเรีย *A. hydrophila* ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM)

(Sciencephotolibrary, 2011)

2.4.3 การจัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน

Kingdom Bacteria

Phylum Proteobacteria

Class Gammaproteobacteria

Order Aeromonadales

Family Aeromonadaceae

Genus *Aeromonas*

Species *A. hydrophila*

Binomial name: *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901), Stanier, 1943

Species: *Aeromonas hydrophila* subsp. *decolorationis Aeromonas hydrophila* subsp.*dhakensis*

Aeromonas hydrophila subsp. *hydrophila*

Synonyms:*Bacillus hydrophilus fuscus* Sanarelli 1871

Bacillus hydrophilus Chester 1901

Proteus hydrophilus (Chester 1901) Bergey et al. 1923

Bacterium hydrophilum (Chester 1901) Weldin and Levine 1923

Pseudomonas hydrophila (Chester 1901) Breed et al. 1948 (Wikipedia, 2011)

2.4.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Aeromonas* spp.

มีการศึกษาทั้งด้วยลักษณะ และสมบัติทางชีวเคมี การศึกษาด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา และการศึกษาด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ในที่นี้จะขอกล่าวรายละเอียดถึงการศึกษาเชื้อด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งหาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือ antibody ที่สร้างมาจากเซลล์พลาสมา ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจาก B-cells เซลล์เดียว จึงทำให้ทุกโมเลกุลของ antibody เหล่านี้มีสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของ antigen และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางชีวภาพของ antibody ชนิดนั้น เนื่องจาก antigen แต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่าง ๆ ของ B-cells หรือ B-lymphocytes จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้าง antibody หลายชนิดปะปนอยู่ในซีรั่ม antibody แต่ละชนิดที่จำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปที่รวมอยู่ด้วยกันในซีรั่ม เรียกว่า polyclonal antibody ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กัน

ในปี 2552 มีงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการผลิต monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว monoclonal antibody AH129 มีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* จำนวน 8 ไอโซเลต และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot blot indirect immunoperoxidase assay พบว่า monoclonal antibody มีความไวต่อการตรวจหาเชื้อ *A. hydrophila* ที่เจือจางมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 CFU/ml monoclonal antibody กลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อของแบคทีเรีย *A. hydrophila* โดยวิธี immunohistochemistry ได้ (กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล, 2552)

2.4.5 การก่อโรคและการแพร่ระบาด

2.4.5.1 ก่อโรคในคน

เชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สามารถพบ และแยกได้จากผู้ป่วยโรคท้องร่วง มีความเกี่ยวข้องในการติดเชื้อแทรกซ้อน เกิดบาดแผลที่ผิวหนังและอักเสบ (cellulitis) พบในผู้ป่วยเบาหวาน และมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น โรคเท้าเหม็นซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ จะเห็นเป็นรูพรุนเล็ก ๆ ที่เท้า บางครั้งเห็นเป็นแอ่งเว้าแหว่งตื้น ๆ ที่ฝ่าเท้า มีน้ำเหลืองซึม และเท้ามีกลิ่นเหม็นมาก เวลาถอดถุงเท้า นอกจากได้กลิ่นเหม็นแล้ว ยังรู้สึกว่าถุงเท้าติดกับฝ่าเท้า แบคทีเรียชนิดนี้ อาจทำให้เกิดการอักเสบลุกลามทั้งเท้า และขาจนถึงขั้นเสียชีวิต เชื้อ *A. hydrophila* นั้นเกี่ยวกับการก่อโรคท้องร่วงโรคทางเดินอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยเด็ก (6 เดือน ถึง 5 ปี) ที่มีปัญหาเรื่องภูมิคุ้มกันบกพร่อง และการเจริญเติบโตผิดปกติ และในผู้ป่วยสูงอายุ ยังพบว่าเป็นชนิดที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในปลา (ประวิตร พิศาลบุตร, 2554)

การรักษานั้นดูตามอาการ และระดับความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย โดยแพทย์จะมีการรักษาด้วยการให้ยาปฏิชีวนะ (Wikipedia, 2011) การศึกษาพบผู้ป่วยชายอายุ 24 ปี มีประวัติการเกิดโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง โดยมีอาการท้องร่วง ไม่สบาย น้ำหนักลด มีการดูดซึมได้น้อย จากนั้นได้นำเชื้อไปตรวจในห้องปฏิบัติการ พบว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* แพทย์จึงต้องรักษาตามอาการด้วยการให้กลุ่มยา ciprofloxacin (Emel et al., 2007)

2.4.5.2 ก่อโรคในสัตว์

เชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ก่อให้เกิดโรคได้ในสัตว์ เช่น แกะ มีการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงแกะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในช่องคลอดของแกะ แล้วมีผลทำให้แกะมีอัตราการแท้งเพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้นจึงได้มีการทดสอบ ป้องกัน รักษา โดยการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยให้ยาในระยะตั้งครรภ์ของแกะด้วย penicillin G, erythromycin และ gentamycin แต่พบว่าแบคทีเรียมีรูปแบบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ กลุ่มยาปฏิชีวนะที่ให้ผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในแกะได้ดีที่สุดคือ amoxicillin และ enrofloxacin (Ziya et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถก่อเกิดโรคในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์

น้ำ เนื่องจากเชื้อนี้จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ตัวอย่างการก่อโรคในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น ในกบก่อให้เกิดโรคขาแดง ส่วนในสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ พบการแพร่ระบาดของโรคในกุ้ง และปลา รวมทั้งปลาเศรษฐกิจที่เป็นอาหาร และปลาสวยงาม ได้แก่ โรค hemorrhagic septicemia ที่เกิดกับปลาเขตร้อนทั่ว ๆ ไป

2.4.5.3 ก่อโรคในปลา

โดยปกติแล้วเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดปัญหากับปลา แต่เมื่อใดที่ปลาเกิดความเครียด (stress) เนื่องจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง แบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำให้ปลาเกิดโรคได้ สภาวะแวดล้อมที่สำคัญ คือ อุณหภูมิ ปลามักจะเกิดโรคเมื่ออุณหภูมิต่ำ หรือความแตกต่างของอุณหภูมิน้ำในรอบวันมีช่วงกว้างทำให้ปลาปรับตัวไม่ทัน และมีการสร้างภูมิคุ้มกันอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าปกติ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำเป็นเวลานาน ๆ ในน้ำมีปริมาณแอมโมเนีย มากเกินไป มีการเพาะเลี้ยงปลาในอัตราหนาแน่น การเกิดบาดแผล เชื้อสามารถเข้าทางปาก เหงือก บาดแผล และเข้าสู่กระแสเลือด สิ่งดังกล่าวเหล่านี้เป็นสาเหตุโน้มนำทำให้ปลาเกิดความเครียด และอ่อนแอ จึงเป็นการเปิดโอกาสให้เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้ โรค motile aeromonas disease เป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* ซึ่งมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทุกประเทศที่มีการเลี้ยงปลา และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบาดในปลา ความรุนแรงของเชื้อจะแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่ (รัตชนก ศิริคะรินทร์, 2553) การก่อโรคในปลานั้นเป็นการติดเชื้อในระบบภายในตัวปลา (systemic infection) เมื่อปลาได้รับเชื้อจะมีอาการตั้งของของเหลวภายในช่องท้อง จนเกิดอาการบวม และไตทำงานผิดปกติจนไม่สามารถขับของเหลวออกสู่ร่างกายได้

ในประเทศไทยมีรายงานว่า โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้ทำความเสียหายให้แก่ผู้ที่เลี้ยงปลามากที่สุด และทำให้ปลาหลายชนิดเกิดโรค ตัวอย่าง เช่น โรคโคนครีบหูบวมในปลาดุกด้าน ปลาดุกด้านที่เป็นโรคนี้บนลำตัวจะมีแผลเล็ก ๆ ลึกลงไปใต้ผิวหนัง บริเวณแผลมีเลือดซึมออกมา โดยเฉพาะแผลที่บริเวณโคนครีบหู ซึ่งจะมีอาการบวม และมีแผลใหญ่กว่าที่บริเวณอื่น ๆ เหงือกมีสีซีด ปลาป่วยส่วนมากมีอาการท้องมาน (ascites) เมื่อผ่าออกดูพบว่ามีน้ำขุ่นสีเหลืองซีด ไตส่วนหน้า (anterior kidney) และไตส่วนหลัง (posterior kidney) บวม ลำไส้ และอวัยวะภายในรวมทั้งผนังช่องท้องมีอาการตกเลือด (hemorrhage) รวมทั้งม้ามจะมีลักษณะบวมใหญ่กว่าปกติ (spleenomegaly) และพบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจำนวนมากที่ไต ปลาดุกอุยที่ติดเชื้อนี้มีอาการเช่นเดียวกันกับปลาดุกด้าน ปลาบู่ที่ติดเชื้อนี้จะมีอาการเป็นแผลหลุมลึกตามตัว มีน้ำเหลืองในช่องท้อง ตับซีดขาว ไตบวม ตาขุ่น ตาโปน ตกเลือดเป็นจุดเล็ก ๆ ตามตัว และโคนครีบเป็นแผลเน่าขนาดต่าง ๆ ตามลำตัว และข้างแก้ม พบเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ในบริเวณ

ตับ และไต โรค red sore disease ในปลา Pike (*Esox lucius*) และปลา Bass โดยปลาจะมีอาการ คือ เกล็ดตั้งพอง มีเลือดออกในกล้ามเนื้อ และในตับ โรคปากแดง (red mouth disease) ในปลา Rainbow Trout จะทำให้เกิด bacteria septicemia โดยแบคทีเรียจะแพร่ไปยังอวัยวะส่วนต่าง ๆ โดยไปตามกระแสเลือด โรค red-pest symptoms พบว่าปลาที่เกิดโรคบริเวณด้านท้องปลามักมีสีแดง และมีเลือดคั่ง (dermal hyperemia) และโรค fresh water eel discase พบในปลาไหล มีการตกเลือดเป็นจุดเล็ก ๆ (petchialhemorrhagic) บริเวณท้องของตัวปลาไหล และก่อโรคในการเพาะเลี้ยงปลาบึก ในบ่ออนุบาลลูกปลาบึก ซึ่งเชื้อนี้จะติดมาจากอาหารเลี้ยงลูกปลาบึก คือ ไรแดง และอาร์ทีเมีย หรือน้ำที่ใช้เลี้ยง (ทีมงานรักบ้านเกิด, 2554)

อาการโดยทั่วไปของโรค motile aeromonas แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

(1) อาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน (acute) ปลาจะตายอย่างรวดเร็วมากโดยไม่ปรากฏอาการภายนอกให้เห็น หรือมีอาการเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อวัยวะภายในมีเลือดคั่ง (congestion) บริเวณลำไส้ ส่วนปลายนั้นพบว่ามีการตกเลือด (hemorrhage) และผนังบุช่องท้อง และกล้ามเนื้อตกเลือดเป็นจุดเล็ก ๆ (petechial hemorrhage) การระบาดของโรคเกิดขึ้นภายใน 1 หรือ 2 วัน เนื่องจากความเครียดที่เกิดจากการขนส่ง การที่ปลาอยู่รวมกันอย่างหนาแน่นและการที่อุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้น

(2) อาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน และมีอาการบวมน้ำ (dropsy) ตัวปลาจะเป็นแผลพอง(blister) มีฝี (abscesses) เกล็ดตั้งพอง ตาโปน (exophthalmia) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นผลมาจากสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ปลาจะตายภายใน 1-2 วัน หลังจากมีอาการดังกล่าว

(3) อาการเรื้อรังแบบมีแผลลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อ (chroniculcerous)ระยะแรกแผลจะตื้นมีขนาดเล็กต่อมาจะขยายใหญ่ขึ้น และลึกลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ ปลาที่รอดตายจากอาการดังกล่าวส่วนมากจะมีแผลเป็นสีดำเห็นได้ชัด

(4) ปลาไม่แสดงอาการของโรค (latent form) ไม่สามารถเห็นอาการทั้งภายนอก และภายใน แต่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากอวัยวะภายใน และเยื่อบุช่องท้อง เป็นต้น ปลาเหล่านี้มักจะสร้างภูมิคุ้มกันเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สายพันธุ์นั้น ๆ และเป็นพาหะของโรค

การป้องกันและรักษาโรค motile aeromonas มีดังนี้

(1) ใช้ยาออกซี่เตตราซัยคลิน (oxytetracycline) หรือเทอรามัยซิน (terramycin) ผสมอาหาร ในอัตราส่วน 55 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อเป็นเวลา 10 วัน

(2) ใช้ยาคลอโรมัยซีติน (chloromycetin) ผสมอาหารในอัตราเช่นเดียวกับ oxytetracycline หรือฟิวราเนส (furanace) ผสมอาหารในอัตราส่วน 0.5-1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลานาน 10-14 วัน

(3) ใช้ยาซัลฟาเมอราซีน (sulfamerazine) ผสมอาหารในอัตราส่วน 100-200 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน และให้สังเกตอาการปลาที่ดีขึ้นเป็นลำดับ

สำหรับการเพาะเลี้ยงปลาตู้นั้น เมื่อปลาเกิดโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย *A. hydrophila* จะทำการรักษาได้โดยใช้ยาเอลบาจุ (elbachu) 10% (granule) คือ ยาอาบที่มีส่วนผสมของ sodium nifrustyrenate ซึ่งเป็นยาป้องกันกำจัดแบคทีเรียที่รุนแรงสำหรับเชื้อ *A. hydrophila* และ *Flexibacter columnaris* ซึ่งเป็นสาเหตุการป่วย และเป็นโรคของปลาที่เลี้ยงในตู้ ยานี้เป็นยาละลายที่มีความสามารถในการดูดซึมเร็ว และสูง ทำให้เห็นผลการรักษาที่ดีมาก (นรสิงห์ เพ็ญประไพร, 2545)

2.5 การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคของปลานิล

ในปัจจุบันผู้เลี้ยงปลานิลนิยมใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะ ในการควบคุมโรคที่เกิดกับปลานิล โดยสารเคมีที่นิยมใช้ เช่น ฟอร์มาลิน ด่างทับทิม และสารประกอบไอโอดีน เป็นต้น ส่วนยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ เช่น ยาในกลุ่มควิโนโลน ยาในกลุ่มซัลฟา และเตตราซัยคลิน เป็นต้น

โดยปกติผู้เลี้ยงปลานิลนิยมใช้สารเคมีเพื่อฆ่าเชื้อโรคในน้ำ ก่อนที่จะนำปลาไปปล่อยลงน้ำ และเพื่อรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา และโปรโตซัว รวมทั้งใช้ในการควบคุมปริมาณของแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเลี้ยง การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคของปลานิลมีข้อด้อยหลายประการ เช่น สารเคมีบางชนิดมีผลเสียต่อระบบนิเวศของบ่อเลี้ยงปลา สารเคมีบางชนิดมีพิษต่อปลา และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในน้ำ สารเคมีบางชนิดอาจตกค้างในปลา และมีผลเสียต่อผู้บริโภค เป็นต้น ผู้เลี้ยงปลานิลนิยมใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายทั้งในการควบคุมการระบาดของโรค และการรักษาโรคของปลานิล เนื่องจากยาปฏิชีวนะถูกผลิตออกมาให้มีการใช้ที่สะดวก เช่น สามารถละลายน้ำได้ดี และสามารถผสมกับอาหารให้ปลากิน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคของปลานิลได้รับการต่อต้านจากหลาย ๆ หน่วยงานทั้งภายในประเทศ และต่างประเทศ ทั้งนี้เนื่องจากยาปฏิชีวนะหลายชนิดมีผลกระทบในทางลบต่อสิ่งแวดล้อม และผู้บริโภคอย่างมาก การใช้ยาปฏิชีวนะที่เกินขนาดอาจส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการดื้อยา คุณสมบัติดังกล่าวสามารถถ่ายทอดระหว่างจุลินทรีย์ได้ ซึ่งหากคุณสมบัติการดื้อยาถูกถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในคน หรือสิ่งมีชีวิตอื่นก็จะทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการควบคุมโรคในคน และสิ่งมีชีวิตอื่นที่ทำได้ยาก ยาปฏิชีวนะบางชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ในคน และสัตว์ได้ เช่น nitrofurans สามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคน และสัตว์ได้ หากมีการบริโภคเข้าไปสะสมในร่างกายในปริมาณมาก และ chloramphenicol สามารถทำให้ผู้บริโภคเป็นโรคมะเร็งในเม็ดเลือด และทำให้ขาดภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคโลหิตจาง และโรคเลือดไหลไม่หยุดได้ด้วย (ลิลา เรืองแป้น, 2545) ด้วยเหตุที่ยาปฏิชีวนะมีผลเสียอย่างมากต่อทั้งสิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะในการ

ควบคุมโรคของปลานิลจึงถูกควบคุมอย่างเข้มงวด และมีแนวโน้มที่จะถูกห้ามใช้ในอนาคต ดังนั้น การหาสารที่ปลอดภัยต่อทั้งสิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคของปลานิลจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก

2.6 การใช้สมุนไพรในการควบคุมและรักษาโรค

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติ ที่มีประวัติควบคู่มากับชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษยชาติมาช้านาน โดยใช้บำบัดโรคด้วยการลองผิดลองถูก หากพืชสมุนไพรชนิดใดให้ประโยชน์ด้านการรักษาโรค ก็จะจดจำถ่ายทอดสืบต่อกันไป ทำให้เกิดเป็นยากลางบ้านใช้กันในชุมชนเล็ก ๆ หรือเป็นยาแผนโบราณ ใช้กันในชุมชนใหญ่ ๆ สมุนไพรตามพระราชบัญญัติยา หมายถึง ยาจากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งไม่ได้มีการผสม ปรุง หรือแปรสภาพ ในปัจจุบันสารสกัดสมุนไพรได้จากพืชเป็นส่วนใหญ่ และสารสกัดที่ยอมรับในเภสัชกรรมก็ล้วนแต่ได้มาจากพืชทั้งสิ้น ซึ่งประเทศไทยของเราเป็นประเทศหนึ่งที่มีป่าเขตร้อน มีความหลากหลายทางทรัพยากรชีวภาพสูง (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) ดังนั้นจึงมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่สืบทอดกันมาช้านาน เช่น การใช้ใบฝรั่งในการรักษาโรคท้องร่วง การใช้ใบกระเพราในการรักษาโรคท้องร่วง วัณโรค ท้องอืดและการใช้บอระเพ็ดในการรักษาโรคไข้จับสั่น แผลฝีหนอง เป็นต้น (นันทวัน บุณยประภัศร, 2535) ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วผู้ใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมักไม่ทราบกลไกที่แท้จริงของสมุนไพรในการรักษาโรค แต่เมื่อวิทยาการทางวิทยาศาสตร์ และทางการแพทย์ก้าวหน้าขึ้น จึงได้มีผู้สนใจศึกษากลไกการรักษาโรคของสมุนไพรต่าง ๆ ซึ่งจากการศึกษา พบว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio chlorelae, Vibrio parahaemolyticus, Escherichia coli* และ *Salmonella typhi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคน (มาลิน จุลศิริ และคณะ, 2529; จริยา สินเติมสุข และคณะ, 2532) สารสกัดจากมะระขี้นกสามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดแผลฝีหนอง (อรุณี สาระยา และคณะ, 2528) สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Streptococcus* sp. และ*P. aeruginosa* และเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงได้ (ทิพวัลย์ เลี้ยงบุญเลิศชัย และสุมาลี เหลืองสกุล, 2531) สำหรับในสัตว์น้ำมีการใช้สมุนไพรป้องกันปลาเป็นโรคโดยภูมิปัญญาท้องถิ่น ในกรณีปลาเป็นแผลตามตัวจะใช้สมุนไพร ดังนี้ ปูนขาว 2-3 ถุง ใบสะเดา ใบแค ต้นสบู่ดำ เครือตดหมา นำสมุนไพรทั้งหมดมาอย่างละมัด แล้วโยนลงไปในบ่อปลา จะทำให้สารต่าง ๆ ในสมุนไพรละลายในน้ำ (จำรัส เซ็นนิล, 2554) บำบัดโรคปลาเป็นแผล ได้ผลดี

นอกจากนี้กลุ่มผู้เลี้ยงปลา และกบในบ่อซีเมนต์จะใช้น้ำหมักรางจืด โดยนำรางจืด 1 ขีด หมักร่วมกับกากน้ำตาล 1 กิโลกรัม โดยต้องทุบรางจืดให้แตกก่อนหมัก หมักทิ้งไว้ 21 วัน จะได้น้ำหมักรางจืด จากนั้นนำมาสาดใส่บ่อเลี้ยงกบหรือปลา เพื่อกันโรคระบาด และสร้างภูมิคุ้มกันด้วย ซึ่งเป็นข้อมูลจากเกษตรกลุ่มคนรักบ้านเกิด (ทีมงานรักบ้านเกิด, 2554)

การใช้สมุนไพรในการควบคุมโรค และส่งเสริมสุขภาพของสัตว์เลี้ยงนั้นเป็นการนำภูมิปัญญาชาวบ้านพร้อมทั้งนำความรู้จากการวิจัยมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรหลายชนิดไปใช้ในการควบคุมโรค และส่งเสริมสุขภาพของสัตว์เลี้ยง เช่นการนำฟ้าทะลายโจรมาใช้แทนคลอเตตราซัยคลิน (chlortetracycline) ในการเร่งอัตราการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ (กุศล คำเพราะ และวรรณพร คำเพราะ, 2538) และการนำฟ้าทะลายโจร และใบฝรั่งมาเสริมในอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่กระทง ซึ่งพบว่าสมุนไพรดังกล่าวสามารถทำให้ไก่กระทงมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น โดยไม่ต้องมีการเพิ่มปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยง นอกจากนี้ยังทำให้ไก่ตัวผู้มีไขมันในช่องท้องลดลง (สุธา วัฒนสิทธิ์ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล และอรุณพร อิฐรัตน์, 2548) เป็นต้น จากการวิจัยเกี่ยวกับการหาสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของสัตว์น้ำ พบว่า สารสกัดจากขมิ้นชัน ใบฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร มะระขี้นก กะเม็ง ก้างปลาเครือ และลูกใต้ใบ สายพันธุ์ *Phyllanthus debelis* และ *Phyllanthus urinaria* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญของกุ้งกุลาดำ (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2548; สถาพร ดิเรกบุษราคม และคณะ, 2539)

การใช้สมุนไพรเพื่อลด และทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรนั้นมีข้อดีหลายประการ คือ (พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร, 2553)

(1) สมุนไพรเกือบทุกชนิดสามารถหาได้ตามธรรมชาติ หรือปลูกได้เอง ประหยัดค่าใช้จ่ายทำให้เกษตรกรพึ่งพาตนเองได้

(2) สมุนไพรส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่า ปลอดภัยจากการที่มีการใช้รักษาโรคในคนหรือสัตว์ต่าง ๆ มาเป็นเวลานาน

(3) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่าสามารถใช้ป้องกันโรค และรักษาโรคในคน และสัตว์ต่าง ๆ ได้

(4) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ (antimicrobial activity) เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส

(5) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาได้

(6) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่า มีความสามารถในการลดความเครียดได้ ซึ่งการลดความเครียดในปลาจะช่วยทำให้ปลามีการเจริญเติบโตได้ดี และมีโอกาสติดเชื้อน้อยลง

(7) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่า มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immuno-stimulation)

2.7 ความสามารถของสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรหลายชนิด มาทำการศึกษาความสามารถในการควบคุมโรค และ เพื่อหาสารออกฤทธิ์ของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ด้วยเหตุที่สมุนไพรที่มีการศึกษามาแล้วมีเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะสมุนไพรที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งมีอยู่ 20 ชนิด คือ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กะเม็ง ขมิ้นชัน กระเทียม ลูกใต้ใบ มังคุด มะระขี้นก น้ำนมราชสีห์ พริกขี้หนู ส้มเขียวหวาน ทับทิม ชุมเห็ดเทศ ข่า กานพลู กระชาย กะเพรา และตะไคร้ ข้อมูล รายละเอียด และสรรพคุณของสมุนไพรทั้งหมดดังกล่าวได้จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (สุนทรี สิงหบุตร, 2554)

2.7.1 บอระเพ็ด

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tinospora crispa* (Linn.) Miers ex Hook.f. & Thomson ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ ตัวเจตมูลยาน เถาหัวด้วน (สระบุรี) หางหนู (สระบุรี, อุบลราชธานี) จุ่งจิง เครือเขาฮอ (ภาคเหนือ) และเจตมูลหนาม (หนองคาย)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้อื่น เถากลมมีขนาดใหญ่เป็นปุ่มปม สีเทาอมดำ มีรสขม เปลือกลอกออกได้ ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปหัวใจ ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบ สีเขียว ก้านใบยาว 8-10 เซนติเมตร ดอก ออกตามซอกใบ ดอกแยกเพศอยู่คนละช่อ ดอกสีเขียวอมเหลือง มีขนาดเล็กมาก ผล รูปทรงค่อนข้างกลม สีเหลือง หรือสีแดง

สรรพคุณ ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ เช่น ราก ต้น ใบ ดอก ผล ส่วนทั้ง 5 เถาสด ราก ใช้แก้ไข้เหนือ ไข้สันนิบาต แก้ไข้พิษ ไข้จับสั่น ดับพิษร้อน ถอนพิษไข้ เจริญอาหาร ต้น ใช้แก้ไข้ แก้ไข้พิษ แก้ไข้กาฬ แก้ไข้เหนือ บำรุงกำลัง บำรุงธาตุ แก้อาการแทรกซ้อน ขณะที่เป็นไข้ทรพิษ แก้ไข้เพื่อโลหิต แก้เลือดพิการ แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้สะอึก แก้พิษฝีดาษ เป็นยาขมเจริญอาหาร เป็นยาอายุวัฒนะ ใบ แก้ไข้ แก้ไข้พิษ แก้ไข้กาฬ แก้ไข้จับสั่น ขับพยาธิ แก้ปวดฝี บำรุงธาตุ ยาลดความร้อน ทำให้ผิวพรรณผ่องใส หน้าตาสดชื่น รักษาโรคผิวหนัง ผดผื่นคันตามร่างกายช่วยให้เสียงไพเราะ แก้โลหิตตั้งในสมอง เป็นยาอายุวัฒนะ ดอก ฆ่าพยาธิในท้อง ในฟัน ในหู ผล แก้เสมหะเป็น

พิษ แก้ไข้พิษ แก้สะอึก และสมุฏฐานกำเริบ ส่วนทั้ง 5 บำบัดรักษาโรค ดังนี้ เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ปวดเมื่อย แก้ไข้ปวดศีรษะ รักษาฟัน รักษาโรคริดสีดวงทวาร ช่วยให้เจริญอาหาร แก้ฝีมดลูก ฝีมุตกิต แก้ร้อนใน รักษาโรคเบาหวาน ลดความร้อน แก้ตีพิการ แก้เสมหะ เลือดลม และแก้ไข้จับสั่น

สารเคมี มีสารพวกแคลคาลอยด์หลายชนิด เช่น picroretine, berberine นอกจากนี้ยังประกอบด้วย colonbin, tintotuberide, N-trans-feruloyltyramine, N-cisferuloytyramine, phytosterol และ methylpentose

2.7.2 บัวบก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* Urban ชื่อสามัญ asiatic pennywort และ tiger herbal ชื่อประจำถิ่น ผักแว่น และผักหนอก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน ชอบที่ชื้นแฉะแตกรากฝอยตามข้อ ไหลที่แผ่ไปจะงอกใบจากข้อชูขึ้น 3-5 ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไตเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร ขอบใบหยัก ก้านใบยาว ดอก ช่อ ออกที่ซอกใบ ขนาดเล็ก 2-3 ดอก กลีบดอกสีม่วง ผล เป็นผลแห้ง แตกได้ ส่วนที่นำมาใช้ คือ ใบ ทั้งต้นสด และเมล็ด

สรรพคุณ ใบ มีสาร asiaticoside ทำยาทาแก้แผลโรคเรื้อน ทั้งต้นสด เป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า รักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก หรือมีการขอกช้ำจากการกระแทก แก้พิษงูกัด ปวดศีรษะข้างเดียว ขับปัสสาวะ แก้เจ็บคอ เป็นยาห้ามเลือด ใส่แผลสด แก้โรคผิวหนังลดความดัน แก้ช้ำใน เมล็ด แก้บิด แก้ไข้ และปวดศีรษะ

สารเคมี สารสกัดจากใบบัวบกประกอบด้วย madecassoside asiatic acid, asiaticoside, centelloside, centellic acid brahminoside และ brahmic acid

2.7.3 ฝรั่ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psidium guajava* Linn. ชื่อสามัญ guava ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ จุ่มโป่ (สุราษฎร์ธานี) ชมพู่ (ปัตตานี) มะก้วย (เชียงใหม่) มะก้วยกา มะมั่น (เหนือ) มะกา (แม่ฮ่องสอน) มะจีน (ตาก) ยามู ย่าหมู (ใต้) สีดา (นครพนม) และปั๊กเกี้ย (จีนแต้จิ๋ว)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ต้น ขนาดกลาง สูง 3-5 เมตร ผิวเปลือกต้นเรียบเกลี้ยง กิ่งอ่อนเป็นสี่เหลี่ยม ใบ หนา หยาบ ใต้ท้องใบเป็นริ้ว เห็นเส้นใบชัดเจน ขนขึ้นนวลบาง ใบยาวประมาณ 10 เซนติเมตร กว้างประมาณ 6 เซนติเมตร ดอกช่อ ช่อหนึ่งมีดอกย่อย 3-5 ดอก ดอกเล็ก สีขาวอมเขียวอ่อน กลีบเลี้ยงแข็ง ผล รูปทรงกลม รูปไข่ หรือรูปรี ผิวเกลี้ยง สีเขียว เนื้อในขาว รสหวาน กรอบ ผลสุกสีเหลือง-เขียว มีเมล็ดเล็ก ๆ แข็งอยู่ภายใน ส่วนที่นำมาใช้ ได้แก่ ใบเพสลาดผลอ่อนสด ผลสุก เปลือกต้นสด ๆ และราก

สรรพคุณ ฝรั่งมีสารแทนนิน (tannin) อยู่มาก สารนี้มีฤทธิ์ฝาดสมาน น้ำมันหอมระเหยในใบฝรั่ง สารแทนนินในฝรั่งยังยับยั้งการลุกลามของเชื้อโรค ช่วยสมานท้องและลำไส้ โดยช่วยลดอาการอักเสบของกระเพาะลำไส้ ช่วยลดอาการคลื่นไส้อาเจียน และยังช่วยอาการเกร็งตัวของลำไส้ ทำให้อาการปวดท้องบรรเทาลงได้ แก้ปวดเบ่ง ใบ แก้ท้องเสีย ท้องร่วง ท้องเดิน (ที่ไม่ใช่บิด หรืออหิวาตกโรค) เป็นยาห้ามเลือด ใส่แผลสด ใช้ใบ 2-3 ใบ เคี้ยวระงับกลิ่นปาก แก้ฝี เป็นยาล้างแผลคูดหนอง และถอนพิษบาดแผล แก้เหงือกบวม แก้พิษเรื้อรัง แก้ปวดเนื่องจากเลือบขบ และแก้แพ้ยุงผลอ่อน แก้ท้องเสีย ท้องร่วง ท้องเดิน ระงับกลิ่นปาก แก้บิดมูกเลือด มีไวตามินซีมาก แก้โรคเลือดออกตามไรฟัน (ลักปิดลักเปิด) บำรุงเหงือกและฟัน บำรุงผิวพรรณ ผลสุก มีสารเพ็กติน (pectin) อยู่มาก ใช้รับประทานเป็นยาระบายได้ ราก แก้น้ำเหลืองเสีย เป็นฝี แผลพุพอง และแก้เลือดกำเดาไหล

สารเคมี ใบ มีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งประกอบด้วย caryophyllene cineol, นอกจากนี้ยังมี tannin, sesquiter penoids และ triterpenoid compounds ผล มี fixed oil 6% volatile oil 0.365%, tannin 8-15%, beta-sitosterol, quercetin, vitamin C (330 mg %) และ arabinose มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น สารสกัดจากใบฝรั่งด้วย acetone และ hexane สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pyogenes* สารสกัดจากใบฝรั่งด้วย methanol สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *S. pneumoniae* สารสกัดจากใบฝรั่งด้วย alcohol และน้ำ รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* (Caceres et al., 1993)

2.7.4 ฟ้าทะลายโจร

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees ชื่อสามัญ kariyat และ the creat ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ หญ้ากันงู (สงขลา) น้ำลายพังพอน ฟ้าละลายโจร (กรุงเทพ) ฟ้าสาง (พนัสนิคม) เขยตายยายคลุม สามสิบดี (ร้อยเอ็ด) เมฆทะลาย (ยะลา) และฟ้าสะท้าน (พัทลุง) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุก สูง 30-70 เซนติเมตร ทุกส่วนมีรสขม ใบสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยว แผ่นใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ดอก ช่อ ออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ ดอกย่อย กลีบดอกสีขาว โคนกลีบติดกัน ปลายแยก 2 ปาก ปากบนมี 3 กลีบ มีเส้นสีม่วงแดงพาดอยู่ ปากล่างมี 2 กลีบ ผล เป็นฝัก เมื่อแก่เป็นสีน้ำตาล แตกได้ ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก ส่วนที่ใช้เป็นยาจะใช้ทั้งต้น ใบสด ใบแห้ง ใบจะเก็บมาใช้เมื่อต้นมีอายุได้ 3-5 เดือน

สรรพคุณ มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ lactone โดยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และระบบหายใจ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่ม

ประสิทธิภาพของเม็ดเลือดขาวในการกลืนทำลาย (คณิต สุวรรณบริรักษ์ และชัยโย ชัยชาญทิพยุทธิ์, 2534; ธิดารัตน์ ปลื้มใจ, 2534) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มประสิทธิภาพของเม็ดเลือดขาวในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ยับยั้งเชื้อไวรัส ยับยั้งและทำลายเซลล์มะเร็ง ทำให้การย่อยอาหารดีขึ้น ลดไข้ ลดการอักเสบ และระงับอาการท้องเสีย

สารเคมี ใบฟ้าทะลายโจร มีสารเคมีที่สำคัญในการออกฤทธิ์ คือ สารกลุ่ม lactone ได้แก่ andrographolide, neo-andrographolide และ 14-deoxy-andrographolide

2.7.5 กะเม็ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eclopta prostrata* Linn. ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ กะเม็งตัวเมีย กะเม็ง (ภาคกลาง) ย่อมเกี่ยว (ภาคเหนือ) และบั้งก็เช้า (ประเทศจีน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พรรณไม้ล้มลุก ที่มีลำต้นตั้งตรง มีความสูงประมาณ 4-32 นิ้ว ลักษณะลำต้นมีขน หรือบางต้นก็ค่อนข้างเกลี้ยง ลำต้นมีกิ่งก้านแตก ที่โคนต้น ใบมีลักษณะเป็นรูปรี หรือรูปหอก ปลายใบแหลมเรียว โคนใบสอบแคบ ริมขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ผิวเนื้อใบเกลี้ยง ขนาดของใบกว้างประมาณ 0.5-2.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 3-10 เซนติเมตร ก้านใบไม่มี ดอกออกเป็นกระจุก ลักษณะของดอกมีกลีบดอกสีขาว ดอกวงในโคนดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ส่วนปลายจะหยักเป็น 4 แฉก ดอกในวงนอกเป็นรูปรางน้ำ ยาวประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ปลายดอกหยักเป็น 2 แฉก ก้านดอกเรียวยาว ยาวประมาณ 2.0-4.5 เซนติเมตร ผลมีลักษณะเป็นรูปลูกข่าง มีสีดำ ปลายมีระยางค์เป็นเกล็ดยาวประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ขนาดของผลกว้างประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3.0-3.5 มิลลิเมตร ส่วนที่นำไปใช้ คือ ลำต้น ใบ ดอก และราก

สรรพคุณ โดยลำต้น ใช้เป็นยาฝาดสมาน บำรุงอวัยวะเพศ แก้ตกขาว โรคมะเร็ง คอตีบ ปัสสาวะเป็นโลหิต ไอเป็นโลหิต อุจจาระเป็นโลหิต อาเจียนเป็นโลหิต โรคลำไส้อักเสบ บำรุงไต วิธีใช้ คือ การนำมาต้มเอาน้ำดื่ม หรือนำลำต้นมาตำให้ละเอียดคั้นเอาน้ำผสมกับน้ำหอม ใช้สูดดม แก้โรคดีซ่าน และแก้ไข้หวัด เมื่อนำมาผสมกับพริกไทย และน้ำผึ้งแล้วปั้นเป็นกลอนเล็ก ๆ ใช้เป็นยาบำรุงร่างกายให้แข็งแรง แก้ปวดเมื่อย ใบ นำใบสดมาตำให้ละเอียดแล้วคั้นเอาน้ำมาผสมกับน้ำมันมะพร้าว ใช้ใส่ผมดก ดำเป็นมัน และยังแก้ผมหงอกก่อนวัย เมื่อนำมาผสมกับน้ำผึ้งกิน แก้โรคหวัด น้ำมูกไหลใช้กับทารก ตำเอากากมาพอกแผล แผลห้ามโลหิต แก้โรคหนังกลากเกลื้อนจากเชื้อรา ดอกและใบ ใช้ต้ม และนำมาทา บริเวณเหงือก หรือฟันที่ปวด ราก ใช้ต้มเอาน้ำกิน แก้โรคเลือดจาง ท้องร่วง โรคบิด หอบหืด หลอดลมอักเสบ ตับอักเสบ อาการแน่นหน้าอก และรักษาโรคเกี่ยวกับตา(สมุนไพรไทยภูมิปัญญาไทยอนุรักษ์ไว้เพื่อคนไทยทั้งชาติ, 2554)

สารเคมี coumestan derivative wedelolactone มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5-lipoxygenase ส่วนสารที่มีฤทธิ์ต้านฮีสตามีนยังไม่พบรายงาน

2.7.6 ขมิ้นชัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma longa* Linn. ชื่อสามัญ turmuric ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ ขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) และขี้มิ้น หมิ้น (ภาคใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุก อายุหลายปี สูง 30-90 เซนติเมตร เหง้าใต้ดินรูปไข่มีแขนงรูปทรงกระบอกแตกออกด้านข้าง 2 ด้าน ตรงกันข้าม เนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ ใบเดี่ยวโดยจะแทงออกมาจากเหง้าแล้วเรียงเป็นวงซ้อนทับกันเป็นรูปใบหอก ขนาดกว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร ดอกช่อแทงออกจากเหง้าแทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบรูปทรงกระบอก กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ใบประดับสีเขียวอ่อน หรือสีนวล บานครั้งละ 3-4 ดอก ผลรูปกลมมี 3 พู ส่วนที่นำมาใช้ คือ เหง้าแก่สด และแห้ง

สรรพคุณ เป็นยาภายในโดยเป็นยาแก้ท้องอืด ท้องร่วง และโรคกระเพาะ ถ้าเป็นยาภายนอก ใช้ทาแก้ผื่นคัน โรคผิวหนัง พุพอง ยารักษาซันนะตุและหนังศีรษะเป็นเม็ดผื่นคัน

สารเคมี โดยราก และเหง้า มี tumerone, zingerene bissboline, zingiberene, (+) - sabinene, alpha-phellandrene, curcumone และ curcumin มีสารออกฤทธิ์คือ Curcumin ซึ่งสามารถยับยั้งการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหาร ระงับอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ รวมทั้งยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดโดยการไปขัดขวางกระบวนการผลิตเอนไซม์ β-lactamase ของจุลินทรีย์ (Kumar et al., 2001)

2.7.7 กระเทียม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Allium sativum* Linn. ชื่อสามัญ garlic ชื่อประจำถิ่น กระเทียมขาว หอมขาว (อุดรธานี) กระเทียมจีน (กรุงเทพ, กลาง) เทียม หัวเทียม (ใต้) ปะเซ้วา (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) และหอมเทียม (เหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กระเทียมเป็นไม้ล้มลุก สูง 30-60 เซนติเมตร มีกลิ่นแรง มีหัวใต้ดินแบบ tunic bulb ลักษณะกลมแป้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร มีแผ่นเยื่อสีขาวหรือสีม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ 3-4 ชั้น ซึ่งลอกออกได้ แต่ละหัวมี 6-10 กลีบ กลีบเกิดจากตาซอกใบของใบอ่อน ลำต้นลดรูปลงไปมาก ใบเดี่ยว (simple leaf) ขึ้นมาจากดิน เรียงซ้อนสลับ แบนเป็นแถบแคบ กว้าง 0.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 30-60 เซนติเมตร ปลายแหลมแบบ acute ขอบเรียบและพับทบเป็นสันตลอดความยาวของใบ โคนแผ่เป็นแผ่นและเชื่อมติดกันเป็นวงหุ้มรอบใบที่อ่อนกว่าและก้านช่อดอกทำให้เกิดเป็นลำต้นเทียม ปลายใบสีเขียวและสีจะค่อย ๆ จางลงจนกระทั่งถึงโคนใบ ส่วนที่หุ้มหัวอยู่มีสีขาว หรือขาวอมเขียว ช่อดอกแบบช่อซี่ร่ม (umbel) ประกอบด้วยตะเกียงรูปไข่เล็ก ๆ

จำนวนมากอยู่ปะปนกับดอกขนาดเล็กซึ่งมีจำนวนน้อย มีใบประดับใหญ่ 1 ใบ ยาว 7.5-10 เซนติเมตร ลักษณะบางใส แห้ง เป็นจะงอยแหลมหุ้มช่อดอกขณะที่ยังตูมอยู่ แต่เมื่อช่อดอกบานใบประดับจะเปิดอ้าออกและห้อยลงรองรับช่อดอกไว้ ก้านช่อดอกเป็นก้านโคด เรียบ รูปทรงกระบอก ตัน ยาว 40-60 เซนติเมตร ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบรวม 6 กลีบ แยกจากกันหรือติดกันที่โคน รูปใบหอกปลายแหลม ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร สีขาวหรือขาวอมชมพู เกสรเพศผู้ 6 อัน ติดที่โคนกลีบรวม อับเรณูและก้านเกสรเพศเมียยื่นขึ้นมาสูงกว่าส่วนอื่น ๆ ของดอก รังไข่ 3 ช่อง แต่ละช่องมีโอวูล 1-2 เม็ด ผลเล็กเป็นกระเปาะสั้น รูปไข่หรือค่อนข้างกลม มี 3 พู เมล็ดเล็ก สีดำ

สรรพคุณ รักษาโรคบิดป้องกันมะเร็ง ระงับกลิ่นปาก ลดระดับไขมันคอเลสเตอรอล และน้ำตาลในเลือด ขับพิษ และสารอันตรายที่ปนเปื้อนในเม็ดเลือด มีกลิ่นที่ฉุนจึงสามารถไล่ยุงได้ดี และสามารถใช้ขับลมได้ด้วยเช่นกัน

สารเคมี มีน้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.1-0.4% ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ allicin, ajoene, alliin, diallyl disulfide, allyl disulfide นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ช่วยย่อยอาหารได้แก่ alliinase, allinlyase และ pectinesterase รวมทั้งวิตามินบีหนึ่งด้วย กระเทียมมักนำมาใช้รักษาอาการท้องอืดท้องเฟ้อ ซึ่งเป็นผลจากสาระสำคัญต่าง ๆ ในน้ำมันหอมระเหย allin และ diallyl disulfide ที่พบในกระเทียมสามารถช่วยต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยมีกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร prostaglandin ตามธรรมชาติ (รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคณะ, 2545)

2.7.8 ลูกใต้ใบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Phyllanthus amarus* Schum&Thonn. ชื่อสามัญ egg woman ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ มะขามป้อมดิน หญ้าใต้ดิน และหญ้าใต้ดินขาว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ล้มลุก สูง 10-60 เซนติเมตร ทุกส่วนมีรสขม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียว มีใบย่อย 23-25 ใบ ใบย่อยรูปขอบขนานแกมไข่กลับ ปลายใบมนกว้างโคนใบมนแคบ ขนาดประมาณ 0.40x1.00 เซนติเมตร ก้านใบสั้นมากและมีหูใบสีขาวนวลรูปสามเหลี่ยมปลายแหลมเกาะติด 2 อัน ดอกแยกเพศ เพศเมียมักอยู่ส่วนโคน เพศผู้มักอยู่ส่วนปลายก้านใบ ดอกขนาดเล็กสีขาว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.08 เซนติเมตร ผลทรงกลมผิวเรียบสีเขียวอ่อนนวล ขนาดประมาณ 0.15 เซนติเมตร เกาะติดอยู่ที่ใต้โคนใบย่อย เมื่อแก่จะแตกเป็น 6 พู แต่ละพูจะมี 1 เมล็ด เมล็ดสีน้ำตาลรูปเสี้ยว 1/6 ของทรงกลม ขนาดประมาณ 0.10 เซนติเมตร ส่วนที่ใช้คือใช้ทั้งต้นสด

สรรพคุณ ใช้เป็นยาแก้ไข้ ลดความร้อน และขับปัสสาวะ

สารเคมี potassium, phyllanthin และ hypophyllanthin

2.7.9 มังคุด

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia mangostana* Linn. ชื่อสามัญ mangosteen

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ต้น สูง 10-12 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่ หรือรูปวงรีแกมขอบขนาน กว้าง 6-11 เซนติเมตร ยาว 15-25 เซนติเมตร เนื้อใบหนา และค่อนข้างเหนียว คล้ายหนัง หลังใบสีเขียวเข้ม เป็นมัน ท้องใบสีอ่อน ดอกเดี่ยวหรือเป็นคู่ ออกที่ซอกใบ ใกล้ปลายกิ่ง สมบูรณ์เพศ หรือแยกเพศ กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง กลีบดอกสีแดง ฉ่ำน้ำ ผลเป็นผลสด ค่อนข้างกลม ส่วนที่นำมาใช้ คือ เปลือกผลแห้ง

สรรพคุณ รักษาโรคท้องเสียเรื้อรัง และโรคลำไส้ ยาแก้ท้องร่วง ท้องเดิน ยาแก้บิด (ปวดเบ่งและมีมูก และอาจมีเลือดด้วย) เป็นยาคุมธาตุ เป็นยารักษาน้ำกัดเท้า รักษาบาดแผล รสฝาดสมานแผล ใช้ชะล้างบาดแผล แก้แผลเปื่อย แผลเป็นหนอง ยาฟอกแผลลาย และแผลพุพอง

สารเคมี ในเปลือกมังคุด มีสารสำคัญ 4 ชนิด ประกอบด้วย แทนนิน (tannin) คาเทชินส์ (catechin) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และแซนโทน (xanthone) สารเหล่านี้ล้วนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทรงพลัง และมีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารแซนโทน (xanthone) นอกจากนี้ยังมี chrysanthemin, garcinone A, garcinone B, gartanin, mangostin และ kolanone

2.7.10 มะระขี้นก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Momordica charantia* Linn. ชื่อสามัญ bitter cucumber และ balsum pear ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ ผักไห่ มะไห่ มะนอย มะห่วย ผักไซ (เหนือ) สุพะซู สุพะเด (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) มะร้อยรู (กลาง) ผักเหย (สงขลา) ผักไห (นครศรีธรรมราช) ระ (ใต้) ผักสะไล ผักไส่ (อีสาน) โกควยเกี๋ยะ โควกวย (จีน) และมะระเล็ก มะระขี้นก (ทั่วไป)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้เลื้อยพันต้นไม้อื่น มีมือเกาะ ลำต้นเป็นเหลี่ยมมีขนปกคลุม ใบเดี่ยว ออกสลับลักษณะคล้ายใบแตงโมแต่เล็กกว่า มีสีเขียวทั้งใบ ขอบใบหยัก เว้าลึก มี 5-7 หยัก ปลายใบแหลม ออกดอกเดี่ยวตามง่ามใบ สีเหลืองอ่อน มี 5 กลีบ เกสรมีสีเหลืองแก่ถึงส้ม กลีบดอกบาง ช้ำง่าย ผลเดี่ยว รูปกระสวย ผิวขรุขระ มีปุ่มขึ้นออกมา ผลอ่อนมีสีเขียว ผลสุกมีสีเหลืองถึงส้ม ผลแก่แตกอ้าออก เมล็ดสุกมีสีแดงสด รูปร่างกลมแบน ส่วนที่นำมาใช้ คือ ราก เถา ใบ ดอก ผล และเมล็ด ใช้สด หรือตากแห้งเก็บไว้ใช้ ผลอาจเก็บมาหั่นเป็นท่อน ๆ ตากแห้งเก็บไว้ใช้

สรรพคุณ ผลแห้งรักษาโรคหิด ผล รสขม เย็นจัด ใช้แก้ร้อน ร้อนในกระหายน้ำ ทำให้ตาสว่าง แก้บิด ตาบวมแดง แผลบวมเป็นหนอง ฝีอักเสบ เมล็ด รสขม ชุ่ม ไม่มีพิษ แก้วัวถูกพิษใช้คั้นเอาน้ำให้กิน เป็นยากระตุ้นความรู้สึกทางเพศ เพิ่มพูนลมปราณ บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง ใบ แก้โรคกระเพาะ บิด แผลฝีบวมอักเสบ ขับพยาธิ ดอก มีรสขม เย็นจัด ใช้แก้บิด รากมีรสขม เย็น

จัดใช้แก้ร้อน แก้พิษ บิดถ่ายเป็นเลือด แผลฝีบวมอักเสบ และปวดฟัน เถา รสขม เย็นจัด ใช้แก้ร้อน แก้พิษ บิด ฝีอักเสบ และปวดฟัน

สารเคมี ผล มี charanthin (b-Sitosterol b-D-glucoside กับ 5, 25 stigmastadien 3b-ol-b-D- Glucoside), serotonin และ amino acids เช่น glutamic acid, alanine, b-alanine phenylalanine, proline, a-aminobutyric acid, citrulline และ galacturonic acid เมล็ด มีความชื้น 8.6% เถ้า 21.8% cellulose 19.5% เถ้าที่ละลายน้ำ 16.4% ไขมัน 31.0 % (ประกอบด้วย butyric acid 1.8% palmitic acid 2.8%, stearic acid 21.7% oleic acid 30%, a - elaeostearic acid 43.7%, momordicine และ protein) ใบสด มี momordicine

2.7.11 น้ำนมราชสีห์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Euphorbia hirta* Linn. ชื่อสามัญ garden spurge ชื่อประจำถิ่น ผักโขมแดง (ภาคกลาง) หญ้าน้ำหมึก (ภาคเหนือ) หญ้าหลังอึ่ง และเงี่ยว (แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก ลำต้นมีขนสีน้ำตาลปนเหลือง ใบเรียงตรงข้าม ใบเดี่ยว รูปรี ปลายใบแหลม โคนใบสอบเบี้ยวเล็กน้อย ขอบใบหยักฟันเลื่อย ผิวใบมีขนทั้งสองด้าน ดอกช่อออกตามซอกใบ ดอกแยกเพศ ไม่มีกลีบดอกและกลีบเลี้ยง ใบประดับเป็นรูปถ้วยสีเขียว เกสรตัวผู้มี 5 อัน เกสรตัวเมียมี 1 อัน รังไข่รูปกลมแกมสามเหลี่ยม มีท่อรังไข่ 3 อัน ผลแห้งแตกได้ 3 พู ผลกลม ส่วนที่นำมาใช้ คือ ใช้ทั้งต้น เก็บในฤดูร้อนล้างให้สะอาดตากแห้งเก็บเอาไว้ใช้ หรือใช้สด

สรรพคุณ ทั้งต้น รสฉุน เปรี้ยว เย็นจัด ใช้ดับร้อน แก้พิษ ขับน้ำนม แก้ชื้น ผดผื่นคัน ลำไส้อักเสบเฉียบพลัน บิดจากแบคทีเรีย หนองใน ปัสสาวะเป็นเลือด ฝีในปอด ฝีที่เต้านม ฝีพิษ บวมแดง ขาเป็นกลาก เน่าเปื่อย ยาง ใช้กัดหูด และตาปลา

สารเคมี ภายในลำต้นจะมีสาร quercetin triacontane เป็นสารจำพวก linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, phytosterolin, phytosterol, euphorterol, phenolic และอัลคาลอยด์ xanthorhamine

2.7.12 พริก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Capsicum frutescens* Linn. ชื่อสามัญ chilli padi, bird's eye chilli, bird chilli หรือ Thai pepper

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลำต้นตั้งตรงสูงประมาณ 1-2.5 ฟุต กิ่งจะเจริญจากลำต้นเพียง 1 กิ่ง แล้วแตกออกเป็น 2, 4, 8 และเป็น 16 ไปเรื่อย ๆ ถ้าต้นพริกสมบูรณ์จะมีกิ่งแตกขึ้นจาก ลำตันที่ระดับดินหลายกิ่ง จนดูคล้ายกับว่ามีหลายต้นอยู่รวมที่เดียวกัน ลำต้น และกิ่งระยะแรกเป็นไม้เนื้ออ่อน แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นกิ่งจะแข็งมากขึ้น แต่เปราะหักง่ายพริกเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เป็น

แบบใบเดี่ยว มีลักษณะแบนเรียบเป็นมัน มีขนาดแตกต่างกันไปในพริกหวาน มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ในพริกขี้หนูทั่วไปมีใบขนาดเล็ก ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือ มีเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน โดยปกติเป็นดอกเดี่ยวแต่อาจพบมีหลายดอกเกิดตรงจุดเดียวกันได้ ดอกเกิดตรงข้อตรงมุมที่เกิดใบ หรือกิ่งก้านดอกอาจจะตรง หรือโค้ง ดอกประกอบด้วยกลีบรองดอก 5 พู กลีบดอกสีขาว 5 กลีบบางพันธุ์อาจเป็นสีม่วง มีเกสรตัวผู้ 5 ชั้น เกสรตัวผู้มีสีน้ำเงินแยกตัวเป็นกระเปาะเล็กๆ ยาวๆ เกสรตัวเมียชูสูงขึ้นไปเหนือเกสรตัวผู้ ปลายเกสรตัวเมียมีรูปร่างเหมือนกระบองหัวมน รังไข่มี 3 พู ผลมีทั้งผลเดียว และผลกลุ่ม มีลักษณะเป็นกระเปาะมีฐานขั้วตอสั้น และหนา ปกติผลอ่อนจะรีขึ้นเมื่อแก่ พันธุ์ที่มีลักษณะขั้วผลอ่อนก็จะให้ผลน้อยลง บางพันธุ์ผลอ่อนมีทั้งเหลืองอ่อน สีเขียวอ่อนเขียวเข้ม และสีม่วง ผลสุกอาจจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ส้มเหลือง น้ำตาล ขาวนวล หรือสีม่วง ผลพริกมีความเผ็ดต่างกันไป บางพันธุ์เผ็ดจัด บางพันธุ์ไม่เผ็ดเลย หรือเผ็ดน้อย พริกขี้หนู มีลักษณะเป็นไม้ต้น ความสูง 30-120 เซนติเมตร ใบมีลักษณะแบน และเรียบมัน ผลมีขนาดเล็กเรียวยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร เมื่อดิบผลมีสีเขียวเข้ม เมื่อสุกจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีแดง มีรสเผ็ดจัด

สรรพคุณ พริกมีวิตามินซีสูง เป็นแหล่งของกรด ascorbic ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยขยายเส้นโลหิตในลำไส้ และกระเพาะอาหารเพื่อให้ดูดซึมอาหารดีขึ้น ช่วยเจริญอาหารบำรุงธาตุ ขับเหงื่อ ขับลม ขับเสมหะ แก้อาเจียน แก้หิด กลากเกลื้อน และสามารถลดความดันโลหิตได้ เพราะทำให้หลอดเลือดอ่อนตัว และช่วยให้ระบบการไหลเวียนของเลือดเป็นไปได้ดี ช่วยร่างกายขับถ่ายของเสีย และนำธาตุอาหารไปยังเนื้อเยื่อของร่างกาย สำหรับพริกขี้หนูสดและพริกชี้ฟ้าของไทย มีปริมาณวิตามิน ซี 87.0-90 มิลลิกรัม/100 กรัม นอกจากนี้พริกยังมีสารเบต้า-แคโรทีน หรือวิตามินเอสูง (พริกขี้หนูสด 140.77 RE) พริกยังมีสารสำคัญอีก 2 ชนิด ได้แก่ capsaicin และ oleoresin โดยเฉพาะสาร capsaicin ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และผลิตภัณฑ์รักษาโรค ในอเมริกามีผลิตภัณฑ์จำหน่ายในชื่อ cayenne สำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะอาหาร สาร capsaicin ยังมีคุณสมบัติทำให้เกิดรสเผ็ด ลดความเจ็บปวดของกล้ามเนื้อ หัวไหล่ แขน บั้นเอว และส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และมีผลิตภัณฑ์จำหน่ายทั้งชนิดเป็นโลชั่น และครีม (thaxtra-P capsaicin) แต่การใช้ในปริมาณที่มากเกินไป อาจมีผลกระทบต่ออาการหยุดชะงักการทำงานของกล้ามเนื้อได้เช่นกัน เพื่อความปลอดภัย USFDA ได้กำหนดให้ใช้สาร capsaicin ได้ ที่ความเข้มข้น 0.75 % สำหรับเป็นยารักษาโรค นอกจากนี้พริกขี้หนู นำมารักษาอาการบวม ฟกช้ำ ให้ใช้พริกขี้หนูที่แก่จัดเป็นสีแดง แล้วตากแห้ง นำมาบดเป็นผงให้ให้ละเอียด แล้วเทลงในวาสลินที่เคี่ยวจนเหลว กวนให้เข้ากัน แล้วนำไปเคี่ยวอีกจนได้กลิ่นพริก ใช้สำหรับทาถู รักษาอาการเคล็ด ถูกชน ฟกช้ำดำเขียว และอาการปวดตามข้อ ให้ทาตรงบริเวณที่เป็นวันละครั้ง หรือสองวันต่อครั้ง และสามารถรักษาอาการปวดตามเอวและน่อง โดยใช้ผงพริกขี้หนู และวาสลิน หรือเมล็ด วาสลิน และแป้ง เติมเหล้าเหลืองจำนวน

พอประมาณ แล้วคนให้เป็นครีม ก่อนที่จะใช้ให้ทาลงบนกระดาษแก้วปิดบริเวณที่ปวด ใช้พลาสเตอร์ปิดโดยรอบ จะมีอาการทำให้เหงื่อออก การเคลื่อนไหวคล่องแคล่วขึ้น และรู้สึกหายปวด จากการตรวจสอบพบว่า ตามบริเวณที่พอกยาจะมีความรู้สึกร้อน และการไหลเวียนของโลหิตเพิ่มขึ้น

สารเคมี ในพริกนั้นมีสารที่สำคัญคือ capsaicin นอกจากนั้นยังมีสารอื่น ๆ ที่ให้ความเผ็ดอีก คือ dihydrocapsaicin nordihydrocapsaicin homodihydrocapsaicin และ homocapsaicin

2.7.13 ส้มเขียวหวาน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus reticulata* Blanco ชื่อสามัญ tangerine ชื่อประจำถิ่น ส้มแก้วเกลี้ยง ส้มจันทบูร ส้มแป้นกระดาน ส้มแสงทอง ส้มแป้นเกลี้ยง ส้มจุก หรือ ส้มบางมด และส้มรังสิต เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 8 เมตร ใบเป็นใบประกอบลดรูป มีใบย่อยใบเดียวเรียงสลับ ใบย่อยเป็นรูปไข่ กว้างประมาณ 3-4 เซนติเมตร ยาว 5-8 เซนติเมตร ปลายใบแหลมมีสีเขียวเป็นมัน มีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไป ก้านใบมีครีบเล็ก ๆ ดอกเป็นสีขาวออกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อสั้น ๆ ตามซอกใบและปลายกิ่งมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ มีกลิ่นหอม ผลมีรูปกลมแป้นขนาด 3-5 เซนติเมตร ผิวเรียบ มีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อแก่จัดมีสีเขียวอมเหลือง ผิวบาง ภายในมีลักษณะเป็นกลีบหลายกลีบแยกออกจากกันได้ง่าย ผนังของกลีบบาง เนื้อในมีสีส้มบรรจุอยู่ในถุงน้ำหวานขนาดเล็กจำนวนมาก เมล็ดเป็นรูปกลมรีสีขาว การขยายพันธุ์ทำโดยใช้ตอนกิ่ง ทาบกิ่ง หรือใช้เมล็ด

สรรพคุณ ทางยาและโภชนาการ คือ ผลนำมารับประทาน หรือคั้นน้ำดื่ม มีรสชาติเปรี้ยวอมหวานบรรเทาอาการกระหายน้ำ สามารถป้องกันโรคหวัด และการติดเชื้อแบคทีเรีย ลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในโลหิต ช่วยระบบย่อยอาหารของร่างกาย ระบายได้ แก้อาการท้องผูก และมีคุณค่าทางอาหาร ผลส้มเขียวหวานสดน้ำหนัก 100 กรัม ให้วิตามินซี 42 มิลลิกรัม จึงใช้รักษา และป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน ช่วยบำรุงผิวพรรณให้สวยเปล่งปลั่งมีน้ำมีนวลผิวเกลี้ยงเกลา และสดชื่น ขจัดความหมองคล้ำ และชะลอการเกิดริ้วรอย นิยมกินผลสด นำมาทำเป็นเครื่องดื่ม และเป็นส่วนผสมในการบำรุงผิวภายนอก

สารเคมี เปลือกผลแห้ง มีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งประกอบด้วย ซิตรัล (citral) เจอรานิออล (geraniol) และไลนาโลออล (linalool) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยนี้สามารถสกัดออกมาเพื่อใช้แต่งกลิ่นยา และมีฤทธิ์ขับลม นอกจากนี้เปลือกผลแห้งเมื่อนำมาจุดไฟจะมีกลิ่นหอม และสามารถไล่ยุงได้ดี

2.7.14 ทับทิม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Punica granatum* Linn. ชื่อสามัญ pomegranate และ punica apple ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ พิลา (หนองคาย) พิลาขาว มะก่องแก้ว (น่าน) มะเก๊าะ (เหนือ) และหมากจัง (แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ขึนต้น หรือพรรณไม้พุ่ม ขนาดเล็ก ลักษณะผิวเปลือกลำต้นเป็นสีเทา ส่วนที่เป็นกิ่งหรือยอดอ่อนจะเป็นเหลี่ยม หรือมีหนามแหลมยาวขึ้น ใบมีลักษณะเป็นรูปยาวรี โคนใบมน แคบ ส่วนปลายใบเรียวแหลมสั้น ผิวหลังใบเกลี้ยงเป็นมัน ใต้ท้องใบจะเห็นเส้นใบได้ชัด ขนาดของใบกว้างประมาณ 1-1.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2.5-6 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ หรืออาจจะเป็นดอกเดียว ในบริเวณปลายยอด หรือง่ามกิ่ง ลักษณะของดอกสีส้ม สีขาว หรือสีแดง ดอกหนึ่งมีกลีบดอกประมาณ 6 กลีบ ปลายกลีบดอกจะแยกออกจากกัน ตรงกลางดอกมีเกสรตัวเมีย และตัวผู้ ซึ่งมีอับเรณูเป็นสีเหลือง ขนาดของดอกบานเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตร ผลมีลักษณะเป็นรูปค่อนข้าง กลม ผิวเปลือกนอกหนาเกลี้ยง ผลเมื่อแก่หรือสุกเต็มที่มีสีเหลืองปนแดง ลักษณะของผลจะแตก หรืออ้าออก ข้างในผลจะมีเมล็ดเป็นจำนวนมาก เป็นรูปเหลี่ยม มีสีชมพูสด ส่วนที่นำมาใช้ คือ ใบ ดอก เปลือกผลแห้ง เปลือกต้น เปลือกราก และเมล็ด

สรรพคุณ ใบ อมกลั้วคอ ทำเป็นยาล้างตา ดอกใช้ห้ามเลือด เปลือกและผลแห้งเป็นยาแก้ท้องร่วง ท้องเดิน บิด และโรคลักปิดลักเปิด

สารเคมี เปลือกผลมีรสฝาด เนื่องจากมี tannin 22-25% gallotannic acid สารสีเขียวอมเหลือง รากมีสารอัลคาลอยด์ ชื่อ pelletierine และอนุพันธ์ของ pelletierine

2.7.15 ชุมเห็ดเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cassia alata* (Linn.) Roxb. ชื่อสามัญ ringworm bush ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ ขี้คาก ลับมีนหลวง หมากกะลิงเทศ และชุมเห็ดใหญ่

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร แตกกิ่งออกด้านข้างในแนวขนานกับพื้น ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อยรูปขอบขนานรูปวงรีแกมขอบขนาน หรือ รูปไข่กว้าง 3-7 เซ็นติเมตร ยาว 6-15 เซ็นติเมตร หูใบเป็นรูปสามเหลี่ยม ดอกช่อ ออกที่ซอกใบตอนปลายกิ่ง กลีบดอกสีเหลืองทอง ใบประดับสีน้ำตาลแกมเหลือง หุ้มดอกย่อยเห็นชัดเจน ผลเป็นฝัก มี 4 ครีบ เมล็ดแบน รูปสามเหลี่ยม

สรรพคุณ ใบสด รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน ฝี และแผลพุพอง ดอก ใบสด หรือแห้ง เป็นยาระบาย ยาถ่าย ถ่ายพยาธิลำไส้ เมล็ด ขับพยาธิ เป็นยาระบายอ่อน ส่วนที่ใช้ ใบสด หรือแห้ง เมล็ดแห้ง ดอกสดของต้นขนาดกลาง ไม่แก่ หรืออ่อนเกินไป วิธีและปริมาณที่ใช้ ใบและ

ดอกของชุมเห็ดเทศใช้เป็นยารักษาโรคและอาการดังนี้ เป็นยาระบาย ยาถ่าย แก้อาการท้องผูก ใช้ดอกชุมเห็ดเทศสด 1-3 ช่อดอก (หรือแล้วแต่คนที่ธาตุเบาธาตุหนัก ช่อดอกใหญ่ หรือเล็ก) ต้มรับประทานจิ้มกับน้ำพริก หรือ ใช้ใบสด 8-12 ใบ ล้างให้สะอาด หั่นตากแห้ง หรือปิ้งไฟให้เหลือง หั่น ใช้ต้ม หรือชงน้ำดื่ม ครั้งละ 1 ถ้วยแก้ว เติมเกลือเล็กน้อย ดื่มให้หมด หรือใช้ใบแห้งบดเป็นผง ปั้นกับน้ำผึ้งเป็นลูกกลอนขนาดเท่าปลายนิ้วก้อย รับประทานครั้งละ 3 เม็ด ก่อนนอน หรือเมื่อมีอาการท้องผูก หรือ ใช้เมล็ด คั่วให้เหลือง ชงน้ำดื่มเป็นน้ำชา เป็นยาระบายอ่อน ๆ เป็นยารักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน ใช้ใบสด 3-4 ใบย่อย ขยี้หรือตำในครกให้ละเอียด เติมเกลือเล็กน้อย หรือใช้ใบชุมเห็ดเทศกับหัวกระเทียมปริมาณเท่ากัน ผสมปูนแดงที่กินกับหมากนิดหน่อย ตำผสมกันทาบริเวณที่เป็นกลาก หรือโรคผิวหนัง โดยเอาผิวไม้ไผ่ขูดบริเวณที่เป็นกลากเบา ๆ แล้วทายาวันละ 2 ครั้ง เช้าเย็นจนกว่าจะหาย หายแล้วทาต่ออีก 7 วัน รักษาฝี และแผลพุพอง ใช้ใบชุมเห็ดเทศ และก้านสด 1 กำมือ ต้มกับน้ำพอท่วมยาแล้วเคี่ยวให้เหลือ 1 ใน 3 ชะล้างบริเวณที่เป็นวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ถ้าเป็นมากให้ใช้ประมาณ 10 กำมือ ต้มอาบ

สารเคมี ใบ พบ anthraquinone เช่น aloe-emodin, chrysophanol, sennoside, flavonoids, terpenoids, iso-chrysophanol, physcion glycoside, kaempferol, chrysophanic acid, lectin, sitosterols และ rhein

2.7.16 ข่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia galangal* (Linn.) Willd. ชื่อสามัญ galanga และ galingale ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ ข่า ข่าเหลือง ข่าหยวก ข่าหลวง (ภาคเหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ล้มลุก สูง 1.5-2 เมตร เหง้าใต้ดินมีข้อ และปล้องชัดเจน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปรีแกมขอบขนาน หรือรูปใบหอก กว้าง 6-9 เซนติเมตร ยาว 20-40 เซนติเมตร ปลายใบแหลม ฐานใบรูปลิ่ม ดอก สีขาวครีมอมเขียว ออกเป็นช่อตั้ง ยาวได้ถึง 25 เซนติเมตร กลีบรองดอกสีเขียวอ่อน โคนเชื่อมกัน ปลายแยกเป็น 3 แฉก กลีบดอก 3 กลีบ โคนเชื่อมกัน กลีบปากแผ่รูปไข่กว้าง สีขาวครีมมีเส้นสีม่วงแดงเป็นทาง เกสรเพศผู้ สีเหลืองอ่อน ยื่นพ้นกลีบดอกชัดเจน ผล รูปทรงกลม ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่มีสีแดง พบกระจายอยู่ในอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงอินโดนีเซีย

สรรพคุณ นิยมนำมาปลูกเพื่อเป็นอาหาร และยารักษาโรค เหง้าต้มเอาน้ำดื่ม บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และขับลม เหง้าสดตำผสมเหล้าโรง ใช้ทารักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา เช่น กลาก และเกลื้อน

สารเคมี เหง้าสดเมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการต้มกลั่น (hydrodistillation) ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.24 ฤทธิ์ทางเภสัชกรรม คือ ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ได้

2.7.17 กานพลู

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock et Harrison, *Caryophyllus aromatica* Linn., *Eugenia aromatica* (Linn.) Baill, *E. caryophyllata* Thunb. และ *Syzygium aromaticum* (Linn.) Merr.& L.M.Perry ชื่อสามัญ clove tree ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ ดอกจันทร์ จันจี่ (ภาคเหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ต้น สูง 9-12 เมตร อาจสูงได้ถึง 20 เมตร เรือนยอดเป็นรูปกรวยคว่ำ แตกกิ่งต่ำ ลำต้นตั้งตรง เปลือกเรียบ สีเทา ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปใบหอก รูปรีหรือรูปไข่กลับแคบ ๆ กว้าง 8-11 เซนติเมตร ยาว 32-37 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือเรียวแหลม โคนสอบแคบ ขอบเรียบ แผ่นใบด้านบนเป็นมัน มีต่อมน้ำมันมาก เส้นแขนงใบข้างละ 15-20 เส้น ปลายเส้นโค้งจรดกับเส้นถัดไปก่อนถึงขอบใบ ก้านใบยาว 1-2.5 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อเชิงหลั่น ออกที่ปลายยอด ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นมาก แต่อาจยาวได้ถึง 1 เซนติเมตร ใบประดับรูปสามเหลี่ยม ยาว 2-3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 4 กลีบ โคนติดกันเป็นหลอดยาว 5-7 มิลลิเมตร เมื่อเป็นผลขยายออกเป็นรูปกรวยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ปลายแยกเป็นแฉกรูปไข่ยาว 3-4 มิลลิเมตร กลีบดอก 4 กลีบ รูปขอบขนานหรือกลม ยาว 7-8 มิลลิเมตร มีต่อมน้ำมันมาก ร่วงง่าย เกสรเพศผู้จำนวนมาก ร่วงง่าย ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร ก้านเกสรเพศเมียยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร ผลรูปไข่กลับกามรูปรี ยาว 2-2.5 เซนติเมตร แก่จัดสีแดง มี 1 เมล็ด กานพลูเป็นพรรณไม้พื้นเมืองของหมู่เกาะโมลุกกะ นำไปปลูกในเขตร้อนทั่วโลก ในประเทศไทยนำมาปลูกบ้างแต่ไม่แพร่หลาย ชอบขึ้นในดินร่วนซุย การระบายน้ำดี ความชื้นสูง ฝนตกชุก ขึ้นได้ดีบนพื้นที่ราบถึงที่สูงจากระดับน้ำทะเล 800-900 เมตร ส่วนที่ใช้ คือ เปลือกต้น ใบ ดอกตูม ผล น้ำมันหอมระเหย

สรรพคุณ เปลือกต้น แก้ปวดท้อง แก้ลม คุมธาตุ ใบ แก้ปวดมวน ดอกตูม รับประทานขับลม ใช้แต่งกลิ่นดอกกานพลูแห้ง ที่ยังไม่ได้สกัดเอาน้ำมันออก และมีกลิ่นหอมจัด มีน้ำมันหอมระเหยมาก รสเผ็ด ช่วยขับลม แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ปวดท้อง และแน่นจุกเสียด แก้อุจจาระพิการ แก้โรคเหนื่บชา แก้หืด แก้ไอ แก้น้ำเหลืองเสีย แก้เลือดเสีย ขับน้ำคาวปลา แก้ลม แก้ธาตุพิการ บำรุงธาตุ ขับเสมหะ แก้เสมหะเหนียว ขับผายลม ขับลมในลำไส้ แก้ท้องเสียในเด็ก แก้ปากเหม็น แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้รำมะนาด ดับกลิ่นเหล้า แก้ปวดฟัน ผล ใช้เป็นเครื่องเทศ เป็น

ตัวช่วยให้มีกลิ่นหอม น้ำมันหอมระเหยกานพลู ใช้เป็นยาชาเฉพาะแห่ง แก้ปวดฟัน ฆ่าเชื้อทางทันตกรรม เป็นยาระงับการชักกระตุก ทำให้ผิวหนังชา

สารเคมี พบ eugenol, cinnamic aldehyde vanillin และน้ำมันหอมระเหย caryophylla-3(12)-6-dien-4-ol

2.7.18 กระชาย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Boesenbergia pandurata* (Linn.) Mansf. ชื่อสามัญ kaempfer ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ กระชายดำ กะแอน ขิงทราย (มหาสารคาม) จี๊ปู ซีฟู เปาซอเร๊าะ เป๊าสี่ระแอน (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ละแอน (ภาคเหนือ) และว่านพระอาทิตย์ (กรุงเทพ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้ล้มลุก มีเหง้าสั้น แตกหน่อได้ รากอวบ รูปทรงกระบอกหรือรูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายเรียว กว้าง 1-2 เซนติเมตร ยาว 4-10 เซนติเมตร ออกเป็นกระจุก ผิวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะตัว ส่วนที่อยู่เหนือดินเป็นใบ มี 2-7 ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปรี กว้าง 5-12 เซนติเมตร ยาว 12-50 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม โคนมน หรือแหลม ขอบเรียบ เส้นกลางใบ ก้านใบ และกาบใบด้านบนเป็นร่อง ด้านล่างนูนเป็นสัน ก้านใบเรียบ ยาว 7-25 เซนติเมตร กาบใบสีชมพู ยาว 7-25 เซนติเมตร ระหว่างก้านใบและกาบใบมีลิ้นใบ ช่อดอกแบบช่อเชิงลด ออกที่ยอดระหว่างกาบใบคู่ในสุด ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร แต่ละดอกมีใบประดับ 2 ใบ สีขาว หรือขาวอมชมพูอ่อน รูปใบหอก กว้างประมาณ 8 มิลลิเมตร ยาว 3.5-4.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีขาว หรือขาวอมชมพูอ่อน โคนติดกันเป็นหลอดยาวประมาณ 1.7 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก กลีบดอกสีขาวหรือขาวอมชมพูอ่อน โคนติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 กลีบ รูปใบหอก ขนาดไม่เท่ากัน กลีบใหญ่ 1 กลีบ กว้างประมาณ 7 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1.8 เซนติเมตร อีก 2 กลีบ ขนาดเท่ากัน กว้างประมาณ 5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เกสรเพศผู้ 6 อัน แต่ 5 อันเปลี่ยนไปมีลักษณะเหมือนกลีบดอก โดย 2 กลีบบนสีชมพู รูปไข่กลับ ขนาดเท่ากัน กว้างประมาณ 1.2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1.7 เซนติเมตร อีก 3 กลีบล่างสีชมพูติดกันเป็นกระพุ้ง กว้างประมาณ 2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2.7 เซนติเมตร ปลายแผ่กว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร มีสีชมพูหรือม่วงแดงเป็นเส้น ๆ อยู่เกือบทั้งกลีบโดยเฉพาะอย่างยิ่งตรงกระเปาะ และปลายกลีบ มีเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ 1 อัน ก้านชูอับเรณูหุ้มก้านเกสรเพศเมีย ผลแก่แตกเป็น 3 เสี่ยง เมล็ดค่อนข้างใหญ่

สรรพคุณ เหง้าใต้ดิน มีรสเผ็ดร้อนขม แก้ปวดท้อง มวนในท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ บำรุงกำลัง บำรุงกำหนัด แก้กามตายด้าน เป็นยารักษาริดสีดวงทวาร เหง้า และราก แก้บิดมูกเลือด เป็นยาขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะพิการ ใช้เป็นยาภายนอกรักษาขี้กลาก ใบ บำรุงธาตุ แก้โรคในปากคอ แก้โลหิตเป็นพิษ ถอนพิษต่าง ๆ วิธีใช้และปริมาณที่ใช้ แก้ท้องร่วงท้องเดิน ใช้เหง้าสด 1-2 เหง้า

ตำหรือฝนเหง้าที่ปิ้งไฟแล้วกับน้ำปูนใส หรือคั้นให้ข้น ๆ รับประทานครั้งละ 1-2 ช้อนแกง แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด ปวดมวนในท้อง ใช้เหง้า และราก ประมาณครึ่งกำมือ (สด หนัก 5-10 กรัม, แห้ง 3-5 กรัม) ต้มเอาน้ำดื่ม หรือใช้ปรุงเป็นอาหารรับประทาน แก้บิด ใช้เหง้าสด 2 เหง้า บดให้ละเอียด เติมน้ำปูนใส คั้นเอาแต่น้ำดื่ม เป็นยาบำรุงหัวใจ ใช้เหง้าและรากกระชายปอกเปลือก ล้างน้ำให้สะอาด หั่นตากแห้ง บดเป็นผง ใช้ผงแห้ง 1 ช้อนชา ชงน้ำร้อน ½ ถ้วยชา รับประทานครั้งเดียว เป็นยารักษาริดสีดวงทวาร ใช้เหง้าสด 60 กรัม ประมาณ 6-8 เหง้า ผสมกับเนื้อมะขามเปียก 60 กรัม เกลือแกง 3 ช้อนแกง ตำแล้วต้มกับน้ำ 6 แก้ว เคี่ยวให้เหลือ 2 แก้ว รับประทานครั้งละ ½ แก้ว ก่อนนอน รับประทานติดต่อกัน 1 เดือน ริดสีดวงทวารควรจะหาย

สารเคมี ทั้งส่วนราก และส่วนต้น ประกอบด้วยสาร alpinetin, pinocembrin, cardamonin, boesenbergin A, pinostrobin และน้ำมันหอมระเหย และในส่วนรากยังพบ chavicinic acid อีกด้วย

2.7.19 กะเพรา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum sanctum* Linn. ชื่อสามัญ holy basil และ sacred Basi ชื่อประจำถิ่น ได้แก่ กะเพราขน กะเพราขาว กะเพรา (ภาคกลาง) กอมก้อ กอมก้อดง (เชียงใหม่) และอีตู่ไทย (ภาคอีสาน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ไม้พุ่ม สูง 30-60 เซนติเมตร โคนต้นค่อนข้างแข็ง กะเพราแดง ลำต้นสีแดงอมเขียว ส่วนกะเพราขาวลำต้นสีเขียวอมขาว ยอดอ่อนมีขนสีขาว ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกัน รูปรี กว้าง 1-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-5 เซนติเมตร ปลายใบมนหรือแหลม โคนใบแหลม ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อย แผ่นใบสีเขียว มีขนสีขาว ดอก ออกเป็นช่อที่ปลายยอด ดอกสีขาวแกมม่วงแดงมีจำนวนมาก กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดกัน ปลายเรียวแหลม ด้านนอกมีขน กลีบดอกแบ่งเป็น 2 ปาก ปากบนมี 4 แฉก ปากล่างมี 1 แฉก ปากล่างยาวกว่าปากบน มีขนประปราย เกสรเพศผู้มี 4 อัน ผล เป็นผลแห้ง เมื่อแตกออกจะมีเมล็ด สีดำ รูปไข่ ส่วนที่ใช้ คือ ใบสด

สรรพคุณ ใช้ใบสดของกะเพรา ถ้าเป็นกะเพราแดงจะมีฤทธิ์แรงยิ่งขึ้น ขยี้ทาตรงหัวหูดเช้า และเย็นจนกว่าหัวหูดจะหลุด

สารเคมี ใบ มี apigenin, citric acid, fumric acid , luteolin, tartaric acid, ursolic acid และ malic acid

2.7.20 ตะไคร้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cymbopogon citratus* Stapf. ชื่อสามัญ lemon grass และ lapine ชื่อประจำถิ่น จะไคร้ (ภาคเหนือ) ไคร (ภาคใต้) คาหอม (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน) ห่อวอตะไป่ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) หัวสิงโต (เขมร-ปราจีนบุรี) และตะไคร้แกง (ทั่วไป)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชตระกูลหญ้า ตะไคร้เป็นพืชที่เจริญเติบโตง่าย อาจมีทรงพุ่มสูงถึง 1 เมตร มีลำต้นที่แท้จริงประมาณ 4-7 เซนติเมตร ลำของต้นจะถูกห่อหุ้มไปด้วยกาบใบโดยรอบ ใบยาวแคบเส้นใบขนานกับก้านใบ ใบของตะไคร้อุดมไปด้วยน้ำมันหอมระเหย ที่นิยมนำมาปลูกเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกกันโดยทั่วไป

สรรพคุณ ส่วนที่ใช้ ทั้งต้น เก็บได้ตลอดปี ล้างให้สะอาด ใช้สดหรือผึ่งให้แห้งในที่ร่ม เก็บไว้ใช้ ราก เก็บได้ตลอดปี ล้างให้สะอาด ใช้สด ใบสด ทั้งต้น รสฉุน แก้หวัด ปวดศีรษะ ไอ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด ขับลมในลำไส้ บำรุงไฟธาตุ ทำให้เจริญอาหาร แก้ปวดกระเพาะอาหาร แก้ท้องเสีย แก้ปวดข้อ ปวดเมื่อย ฟกช้ำจากหกล้ม ขาบวมน้ำ แก้โรคทางเดินปัสสาวะ นิ่ว ขับปัสสาวะ ประจำเดือนมาผิดปกติ แก้ปัสสาวะเป็นเลือด แก้โรคหืด ราก แก้เสียดแน่นแสบบริเวณหน้าอก ปวดกระเพาะอาหารและขับปัสสาวะ บำรุงไฟธาตุ ขับปัสสาวะ แก้นิ่ว แก้ปัสสาวะพิการ รักษาเกลื้อน แก้อาการขัดเบา ใบสด มีสรรพคุณช่วยลดความดันโลหิตสูง แก้ไข้ ต้น เป็นยาขับลม แก้ผมแตกปลาย เป็นยาช่วยให้ลมเบ่งขณะคลอดลูก ใช้ดับกลิ่นคาว แก้เบื่ออาหาร บำรุงไฟธาตุให้เจริญ แก้โรคทางเดินปัสสาวะ นิ่วปัสสาวะพิการ แก้หนองใน คุณค่าทางด้านอาหาร ตะไคร้ยังมีประโยชน์ต่อร่างกาย เพราะช่วยเพิ่มเกลือแร่ที่จำเป็นหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และยังมีวิตามินเอ รวมอยู่ด้วย

สารเคมี ใบ มีน้ำมันหอมระเหย 0.4-0.8% ประกอบด้วย citral 75-85%, citronellal, geraniol, methylheptenone เล็กน้อย eugenol และ methylheptenol รากมีอัลคาลอยด์ 0.3%

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สมุนไพร และสารสกัดสมุนไพรในการควบคุมโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลามีจำนวนมาก ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะงานวิจัยที่น่าสนใจ และเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

นรสิงห์ เพ็ญประไพร (2545) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบยางพาราในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* พบว่า สารสกัด 95% เมทานอลของใบยางพารา สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ดี และสามารถนำไปรักษาโรคของสัตว์น้ำได้

จิติวัฒนา เหล็งบำรุง (2550) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium resenbergii* de Man) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม โดยประเมินจากค่า phenol oxidase (PO) specific activity ทั้งในห้องปฏิบัติการและในฟาร์มเลี้ยง พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับความเข้มข้น

10,000 ppm ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ได้ เมื่อนำสารสกัดขมิ้นชันมาผสมอาหารแล้วให้กุ้งก้ามกรามกินที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในห้องทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าระดับ phenol oxidase (PO) ของทั้งสามกลุ่ม อย่างไรก็ตามค่า phenol oxidase ของกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับการศึกษาอัตราการตายและระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามหลังจากกินอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่ระดับต่าง ๆ แล้วทำให้กุ้งติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีให้กุ้งกินซากกุ้งติดเชื้อ *A. hydrophila* และฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ระดับ LD_{50} ($1.66x10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร) พบว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อโดยการกินซากกุ้งป่วย และได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันปริมาณ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายสูงสุด และมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในขณะที่กุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ LD_{50} นั้นตายหมดทุกกลุ่มทดลองภายในเวลา 96 ชั่วโมง

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และจิราพร โรจน์ทินกร (2550) ศึกษาสมุนไพรไทยที่หาง่าย 34 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด ได้แก่ *A. hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) และ *V. harveyi* (VH) โดยใช้สมุนไพรสกัดด้วยเอทานอล 50% และ เอทานอล 50% ต้ม ที่ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี disc diffusion พบว่า สารสกัดใบหูกวางด้วยเอทานอล 50% ต้ม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VP สูงที่สุด (15.78 และ19.35 มิลลิเมตร) สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอทานอล 50% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH สูงที่สุด (19.8 มิลลิเมตร) ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อลูกกุ้งก้ามกราม (PL_{15}) โดยหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเทียนตาตั๊กแตน มีพิษระดับสูงต่อกุ้ง (LC_{50} 96 h = 0.42 ppt) จากการทดสอบพบว่า สารสกัดเปลือกทับทิม ใบหูกวาง กระเทียมสด ชาเขียวญี่ปุ่น และใบชะพลู มีฤทธิ์และประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกรามระดับต่ำ ดังนั้นสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยสูง

ร่วมฤดี พานจันทร์ พงษ์กฤษณ์ ศิริสรณ์ และสมวิทย์ ผาพรม (2553) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ที่แยกได้จากปลาดุกลูกผสม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ทดสอบความไวของเชื้อ *A. hydrophila* ต่อสารสกัดจากกระเทียมไทย และกระเทียมจีน จากตัวทำละลาย 2 ชนิด (เอทานอล 95% และอะซิโตน) โดยวิธี disc diffusion พบว่า สารสกัดจากกระเทียมไทยที่ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่าสารสกัดอื่น การทดลองที่ 2 หา

ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* ได้ การทดลองที่ 3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด ที่สามารถฆ่า *A. hydrophila* พบว่าไม่มีระดับความเข้มข้นใดที่สามารถฆ่าเชื้อ *A. hydrophila* ได้เลย

Rao et al. (2006) ได้ศึกษาผลของหญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*) ในการช่วยให้เกิดภูมิต้านทาน และการรอดชีวิตของปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ที่มีการติดเชื้อ *A. hydrophila* หลังจากตัวเชื้อเข้าสู่ตัวปลา 7 วัน กลุ่มควบคุม คือ ปลาที่ไม่รับสารสกัดจากหญ้าพันงู และกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด พบว่า ปลาทดลองที่ได้รับสารสกัดที่ได้จากหญ้าพันงูขาวมีการสร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ได้มากขึ้น

Swagatika et al. (2007) ได้ศึกษาผลของเมล็ดมะม่วงที่เป็นตัวเพิ่มการกินอาหารต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในปลายี่สกเทศ ผลแสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้กินเมล็ดในของมะม่วงนั้น สามารถสร้างภูมิคุ้มกัน หรือชักนำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นในปลายี่สกเทศในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

Ardo et al. (2008) ได้ศึกษาสมุนไพรจีน *Astragalus membranaceus* และ *Lonicera japonica* ที่มีผลต่อการเพิ่มสูงขึ้นของโบรอนที่ไม่มีผลจำเพาะต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล และการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* โดยใช้สมุนไพรจีนสองชนิดร่วมกับโบรอน (boron) ผลต่อการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยให้ปลานิลกินในระยะเวลาสี่สัปดาห์ แล้วตรวจสอบอัตราการตาย ผลปรากฏว่าปลานิลที่ได้กินสมุนไพรจีนทั้งสองชนิดพร้อมกัน หรือได้กินสมุนไพรชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น จะมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเพิ่มระดับของระบบภูมิคุ้มกัน สมุนไพรจีนทั้งสองชนิดจะช่วยลดอัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยการให้ปลากินสมุนไพรร่วมกันทั้งสองชนิด จะให้ผลยับยั้งการตายได้ดีกว่ากินเพียงชนิดเดียว และร่วมกับโบรอนด้วย สารสกัดจากยาสมุนไพรจีนทั้งสองชนิดนั้นถ้าใช้ร่วมกับโบรอนแล้วให้ปลากินในแต่ละวันจะมีผลทำให้ปลามีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อ *A. hydrophila* ได้ดี

Alsaid et al. (2010) ศึกษาสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรในประเทศมาเลเซีย ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้คล้ายกับสมุนไพรของไทย เป็นกลุ่มสมุนไพรที่ให้รสชาติเผ็ดร้อน 10 ชนิด นำมาจากท้องตลาด ได้แก่ กระเทียม (ส่วนหัว) อบเชย (เปลือก) ขิง (ราก) ตะไคร้ (ราก) โหระพา (ใบ) หอมแขก (ใบ) มัสตาร์ด (ผล) ขมิ้น (ราก) พริกไทย (ผล) กานพลู (ดาดอก) นำส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรเหล่านี้นำมาสกัดโดยนำมาอบแห้งก่อน จากนั้นจึงนำมาจุ่มแช่ลงในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) และทำตามขั้นตอนจนได้สารสกัดสุดท้ายที่เข้มข้น แล้วนำมาศึกษาผลการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ทดสอบตามวิธี disc diffusion assay ผลการศึกษาพบว่า เฉพาะสารสกัดจากอบเชย กระเทียม กานพลู และโหระพา เท่านั้น ที่สามารถแสดงออกถึง

การมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยอบเชยมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสูงที่สุด และมีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดลองฉีดสารสกัดจากอบเชยให้แก่ปลานิลที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ จากนั้น 17 วัน พบว่า ปลานิลมีอัตราการตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นชัดว่าสารสกัดจากอบเชยนั้นเป็นเครื่องป้องกันโรค streptococcosis ในปลานิลได้ และยังทำให้ปลามีสุขภาพดีขึ้นมาได้

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Rattanachaikunsopon และ Phumkhachorn อีกเป็นจำนวนมากที่ทำการศึกษาผลของสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา ตัวอย่างเช่น

การใช้สารในกลุ่ม flavonoids ที่แยกได้จากใบฝรั่ง ซึ่งได้แก่ morin, morin-3-*O*-lyxoside, morin-3-*O*-arabinoside, quercetin และ quercetin-3-*O*-lyxoside ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา ผลปรากฏว่าสารในกลุ่ม flavonoids ทุกตัว สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้หลายสายพันธุ์ เช่น *A. hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *S. agalactiae* และ *Vibrio salmonicida* (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2007)

การใช้สารสกัดเอทานอลของใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* และการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของใบฝรั่งบดละเอียด หรือสารสกัดเอทานอลของใบฝรั่งในการควบคุมโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิล (Pachanawan et al., 2008)

การใช้สารสกัดเอทานอลของใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* และการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของใบฟ้าทะลายโจรบดละเอียดและสารสกัด เอทานอลของฟ้าทะลายโจรในการควบคุมโรคติดเชื้อ*S. agalactiae* ในปลานิล (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2009a)

การใช้น้ำมันหอมระเหยของกานพลู (clove oil) ในการยับยั้งการเจริญของ *Lactococcus garvieae* และการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยของกานพลูในการควบคุมโรคติดเชื้อ *Lactococcus garvieae* ในปลานิล (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2009b)

การใช้น้ำมันหอมระเหยของกุยช่ายจีน (chinese chive oil) ในการยับยั้งการเจริญของ *Flavobacterium columnare* และการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยของกุยช่ายจีนในการควบคุมโรคติดเชื้อ *F. columnare* ในปลานิล (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2009c)

การใช้สารสกัดด้วยน้ำของใบบัวบก (*Centella asiatica*) ในการยับยั้งการเจริญของ *Flavobacterium columnare* และการใช้สารสกัดด้วยน้ำของใบบัวบกในการแช่ปลาเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อ *Flavobacterium columnare* ในปลานิล (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010a)

การใช้น้ำมันหอมระเหยของอบเชย (cinnamon oil) ในการยับยั้งการเจริญของ *S. iniae* และการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยของอบเชยในการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. iniae* ใน ปลานิล (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010b)

การใช้อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดด้วยน้ำของผักติ้ว (*Cratoxylum formosum*) ในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และลดอัตราการตายเนื่องมาจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010c)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชสมุนไพร

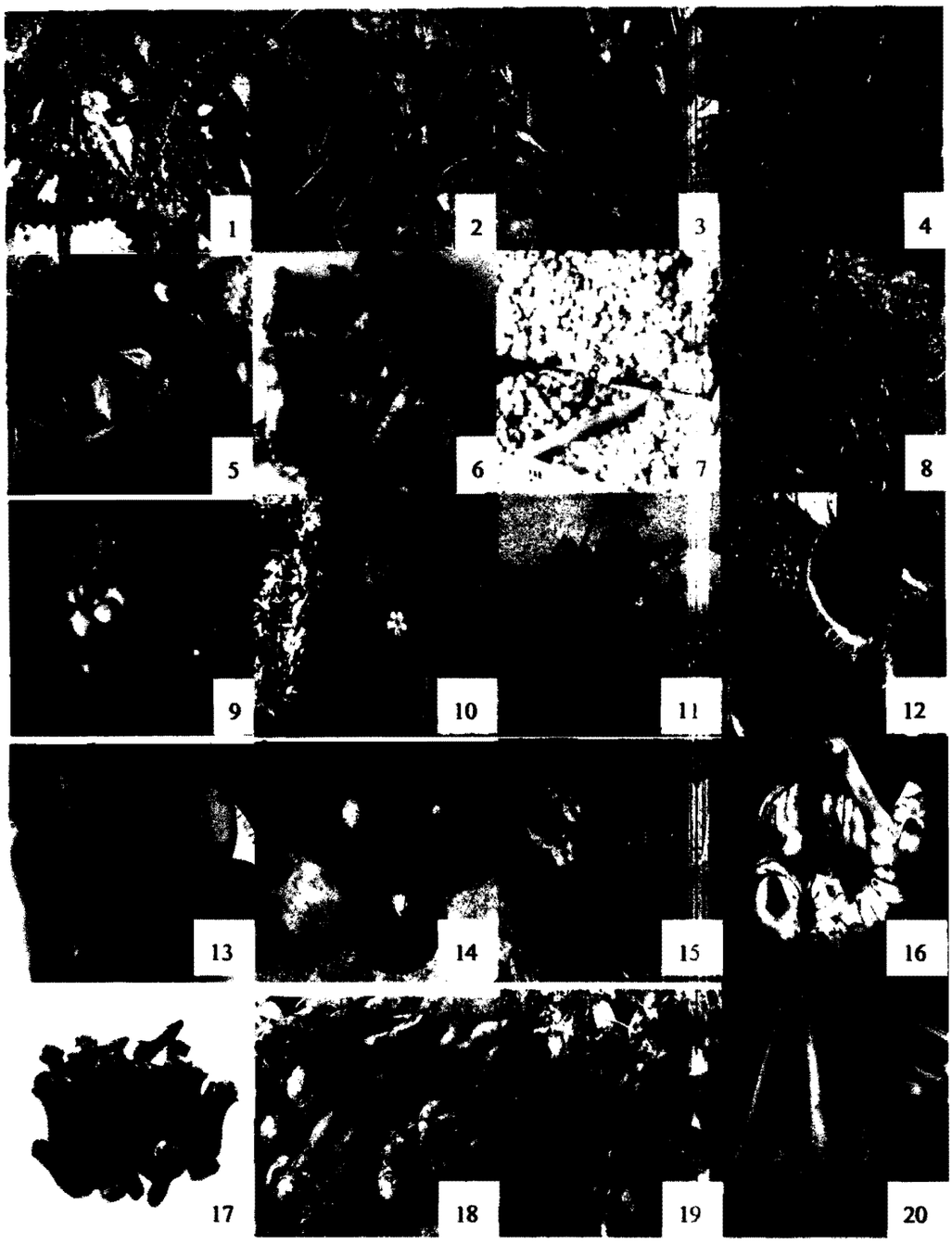
ในการศึกษานี้ใช้สมุนไพรไทย 20 ชนิด คือ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กะเม็ง ขมิ้นชัน กระเทียม ลูกใต้ใบ มังคุด มะระขี้นก น้ำนมราชสีห์ พริกขี้หนู ส้มเขียวหวาน ทับทิม ชุมเห็ดเทศ ข่า กานพลู กระชาย กะเพรา และตะไคร้ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 1 สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษานี้

สมุนไพร	ชื่ออังกฤษ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้
บอระเพ็ด	Heart-leaved moonseed	*Tinospora crispa* Linn.	ลำต้น
บัวบก	Asiatic pennywort	*Centella asiatica* Linn.	ใบ
ฝรั่ง	Guava	*Psidium guajava* Linn.	ใบ
ฟ้าทะลายโจร	Kalmegh, king of bitters, Chuan Xin Lian	*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees	ใบ
กะเม็ง	Han Lian Coa, False Daisy	*Eclipta prostrata* Linn.	ลำต้นและใบ
ขมิ้นชัน	Khamin-chun, Khamin-kaeng, Turmeric	*Curcuma longa* Linn.	ราก
กระเทียม	Garlic	*Allium sativum* Linn.	หน่อ หรือ กระเปาะ
ลูกใต้ใบ	Egg woman	*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn	ลำต้นและใบ
มังคุด	Mangosteen	*Garcinia mangostana* Linn.	เปลือกของผล

ตารางที่ 1 สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษานี้ (ต่อ)

สมุนไพร	ชื่ออังกฤษ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้
มะระขี้นก	Balsam pear, Bitter gourd, Bitter cucumber, Leprosy gourd	*Momordica charantia* Linn.	ใบ
น้ำนมราชสีห์	Garden spurge	*Euphobia hirta* Linn.	ลำต้นและใบ
พริกขี้หนู	Hot chili pepper, Chili pepper	*Capsicum frutescens* Linn.	ผลและเมล็ด
ส้มเขียวหวาน	Tangerine, Mandarin orange	*Citrus reticulata* Blanco	เปลือกของผล
ทับทิม	Pomegranate	*Punica granatum* Linn.	เปลือกของผล
ชุมเห็ดเทศ	Ringworm Bush	*Cassia alata* (Linn.) Roxb.	ใบ
ข่า	Galanga, Galingale	*Alpinia galangal* (Linn.) Willd.	ราก และเหง้า
กานพลู	Clove tree	*Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock et Harrison	ดอก
กระชาย	Kaempfer	*Boesenbergia pandurata* (Linn.) Mansf.	ราก
กะเพรา	Holy basil, Sacred Basi	*Ocimum sanctum* Linn.	ใบ
ตะไคร้	Lemon Grass, Lapine	*Cymbopogon citratus* Stapf.	ลำต้น



ภาพที่ 7 สมุนไพรไทยที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ (1) บอระเพ็ด (2) บัวบก (3) ฝรั่ง (4) ฟ้าทะลายโจร (5) กะเม็ง (6) ขมิ้นชัน (7) กระเทียม (8) ลูกใต้ใบ (9) มังคุด (10) มะระขี้นก (11) น้ำนมราชสีห์ (12) พริกขี้หนู (13) ส้มเขียวหวาน (14) ทับทิม (15) ชุมเห็ดเทศ (16) ข่า (17) กานพลู (18) กระชาย (19) กะเพรา (20) ตะไคร้

3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

ในการศึกษานี้ใช้ตัวทำละลาย 6 ชนิด ในการสกัดสารจากสมุนไพร ได้แก่ น้ำกลั่น (distilled water) เอทานอลเข้มข้น 95% (ethanol), เมทานอล (methanol), เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate), เฮกเซน (hexane) และอีเทอร์ (ether) (ตารางที่ 2) โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 6 ชนิด สกัดสารสมุนไพร ดังต่อไปนี้ บอระเพ็ด บัวบก ฝรั่ง ฟ้าทะลายโจร กระเทียม มังคุด มะระขี้นก และทับทิม ใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอลเข้มข้น 95%, เมทานอล, เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน กับสมุนไพรต่อไปนี้ กะเม็ง ขมิ้นชัน ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ พริกขี้หนู และส้มเขียวหวาน นอกจากนี้มีการใช้ตัวทำละลายเพียง 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอทานอลเข้มข้น 95% และอีเทอร์ เพื่อสกัดสารจากสมุนไพรต่อไปนี้ ชุมเห็ดเทศ ข่า กานพลู กระชาย กะเพรา และตะไคร้ จากนั้นนำสารสกัดของสมุนไพรที่ได้ มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลานิล ได้แก่ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ดังแสดงในตารางที่ 2

วิธีการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร โดยการนำสมุนไพรดังกล่าวไปทำการอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรที่อบแห้งแล้วไปบดให้เป็นผงละเอียด นำผงสมุนไพร 1 กรัม ไปผสมกับตัวทำละลายที่ต้องการปริมาณ 10 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วน 1:10 w/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมนี้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการนำไปใช้

การหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร ทำโดยนำสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 100 µl มาใส่ในหลอด micro centrifuge จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Speed Vac แล้วทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่แห้งแล้ว นำค่าที่ได้จากการชั่งมาหารด้วย 100 จะได้ค่าน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากสมุนไพรต่อปริมาตรของสารสกัดสมุนไพร 1 µl ก่อนนำสารสกัดสมุนไพรไปใช้ได้ทำการปรับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดให้มีค่าเท่ากับ 100 µg/µl

ตารางที่ 2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทย

พืชสมุนไพร	ตัวทำละลาย					
	น้ำกลั่น	เอทานอล 95%	เมทานอล	เอทิลอะซิเตท	เฮกเซน	อีเทอร์
บอระเพ็ด	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
บัวบก	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
ฝรั่ง	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
ฟ้าทะลายโจร	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
กะเม็ง	✓(S)	✓ (S)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	-
ขมิ้นชัน	✓(S)	✓ (S)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	-
กระเทียม	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
ลูกใต้ใบ	✓(S)	✓ (S)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	-
มังคุด	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
มะระขี้นก	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
น้ำนมราชสีห์	✓(S)	✓ (S)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	-
พริกขี้หนู	✓(S)	✓ (S)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	-
ส้มเขียวหวาน	✓(S)	✓ (S)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	-
ทับทิม	✓(S, A)	✓ (S, A)	✓ (S)	✓ (S)	✓(S)	✓(A)
ชุมเห็ดเทศ	✓ (A)	✓ (A)	-	-	-	✓ (A)
ข่า	✓ (A)	✓ (A)	-	-	-	✓ (A)
กานพลู	✓ (A)	✓ (A)	-	-	-	✓ (A)
กระชาย	✓ (A)	✓ (A)	-	-	-	✓ (A)
กะเพรา	✓ (A)	✓ (A)	-	-	-	✓ (A)
ตะไคร้	✓ (A)	✓ (A)	-	-	-	✓ (A)

หมายเหตุ - = ไม่ได้ทำการสกัดสารสมุนไพร

✓= ได้ทำการสกัดสมุนไพร

S = ใช้ทดสอบการยับยั้งกับเชื้อ *S. agalactiae*

A = ใช้ทดสอบการยับยั้งกับเชื้อ *A. hydrophila*

3.3 เชื้อก่อโรคปลา อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียก่อโรคปลาที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 ชนิด คือ เชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* โดย *S. agalactiae* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. นิลุบล กิจอันเจริญ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วน *A. hydrophila* ได้จากการแยกเชื้อจากปลานิลป่วยที่ติดโรคจากแบคทีเรียชนิดนี้ในธรรมชาติจากแม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดเหมือนกัน คือ เลี้ยงใน brain heart infusion (BHI) broth นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนการเก็บรักษาแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวทำโดยการเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีส่วนผสม glycerol ในปริมาณ 20% (v/v) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การทดลองสำหรับ *S. agalactiae*

3.4.1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*

การทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ใช้วิธี swab paper disc โดยเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าว ใน BHI broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาป้าย (swab) ลงบน BHI agar ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่น paper disc ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ดังกล่าว แล้วหยดสารสกัดจากสมุนไพร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปสังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc หรือไม่ ถ้าเห็น inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc ก็แสดงว่าสารสกัดจากสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*

3.4.2 การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*

การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากสมุนไพร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ทำโดยนำสารสกัดจากสมุนไพรจากความเข้มข้นเริ่มต้น 100 µg/µl มาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 2 เท่า (two fold serial dilution) จากนั้นนำสารสกัดสมุนไพรแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญ

ของแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยเติมลงใน culture ของ *S. agalactiae* (10^3 CFU/ml) ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร นำ culture ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ก่อนตรวจการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ culture ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งแสดงในหน่วย μg/ml

3.4.3 การตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* โดยสารสกัดจากสมุนไพร

การตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ด้วยสารสกัดสมุนไพร ทำโดยการนำสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นเท่ากับ MIC ใส่ในหลอดทดลองที่มี *S. agalactiae* ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ปริมาตร 4.9 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ของ *S. agalactiae* ที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดสมุนไพร ปริมาตร 100 μl มาใส่ลงในอาหาร BHI broth ที่มีสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาก *S. agalactiae* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรแสดงว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* แบบ bacteriostatic แต่ถ้า *S. agalactiae* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรแสดงว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* แบบ bactericidal

3.4.4 การเตรียมปลานิล

ปลานิลที่ใช้ในการทดลอง เป็นปลานิลที่ได้มาจากแหล่งพันธุ์ที่เชื่อถือได้ คือ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำจืด บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (ซีพีกรุ๊ป กรุงเทพ ประเทศไทย) โดยปลานิลดังกล่าวถูกนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลองในถังพลาสติกขนาด 50 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (fish stock) โดยมีการให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสงอีก 12 ชั่วโมง และให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับปลานิลโดยเฉพาะ คืออาหารปลาที่มีชื่อทางการค้าว่า ซากุระ ซึ่งเป็นอาหารที่มีโปรตีน 30 % โดยการให้อาหารจะให้ในปริมาณ 5%/น้ำหนักตัว/วัน โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง (เช้า และเย็น) ก่อนนำปลานิลไปใช้ในการทดลอง ทุกครั้งต้องทำการสุ่มตรวจปลานิลว่าปลอดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* หรือไม่ โดยการนำตับ และไตของปลานิลที่เลือกโดยการสุ่มมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคปลอดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตว่ามีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวหรือไม่ หากมีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ต้องนำไปทำการยืนยันว่าเป็น *S. agalactiae* หรือไม่ ซึ่งทำได้โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 strep test kit

ในทุกชุดการทดลองใช้ปลานิลจำนวน 10 ตัว ที่เลี้ยงไว้ในถังเลี้ยงปลาขนาด 45 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยปลานิลแต่ละตัวมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 10 ± 1 กรัม

3.4.5 การศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *S. agalactiae*

การศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *S. agalactiae* ทำโดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ โดยในแต่ละชุดการทดลองมีปลานิลจำนวน 10 ตัว ปลานิลในแต่ละชุดการทดลองถูกฉีดด้วย *S. agalactiae* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) โดยความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้สำหรับปลาในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^7$ CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^6$ CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^5$ CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 4 ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^4$ CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 5 ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^3$ CFU/ml

ชุดการทดลองที่ 6 ความเข้มข้นของ *S. agalactiae* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^2$ CFU/ml

จากนั้นทำการเลี้ยงปลาต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และสังเกตพฤติกรรมของปลา เช่น การกินอาหาร อัตราการตาย หากพบปลาตายให้รีบแยกออกจากกลุ่ม ปลานิลทุกตัวที่ตายจะถูกนำมาตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae* ในตับ และไต เพื่อยืนยันว่าการตายของปลานิลเกิดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae*

การคำนวณหาค่า median lethal dose (LD_{50}) (CFU/ml) ทำตามวิธีของ Reed-Muench (1938) โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\log LD_{50} = \alpha \log b + c$$

โดยที่ α = the mortality higher than 50% - 50% / the mortality higher than 50% - the mortality lower than 50%

b = dilution rate, in current experiment $b = 10^{-1}$

c = the log of minimum dilution rate, when the mortality higher than 50%

3.4.6 การศึกษาผลของสมุนไพร และสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการรอดตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae*

ในการทดลองนี้ใช้สมุนไพร และสารสกัดสมุนไพรที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด ซึ่งได้แก่ พริกขี้หนู และสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู ตามลำดับ ทำโดยการแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละชุดการทดลองใช้ปลานิลจำนวน 10 ตัว ปลานิลในแต่ละชุดการทดลองถูกเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมกับพริกขี้หนูบดละเอียดในอัตราส่วน 9:1 (w/w) (Diet 1)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมกับสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูในอัตราส่วน 19:1 (w/w) (Diet 2)

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมกับ oxytetracycline ในอัตราส่วน 199:1 (w/w) (Diet 3)

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่ไม่ผสมสารสกัดสมุนไพร และ ไม่ผสม oxytetracycline (w/w) (Diet 4)

การทดลองนี้ปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าวข้างต้นติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ก่อนการฉีด *S. agalactiae* ในปริมาณที่เท่ากับค่า LD_{50} เข้าทางช่องท้องของปลานิล จากนั้นทำการเลี้ยงปลานิลต่อไปอีก 10 วัน เพื่อสังเกตพฤติกรรมที่แสดงออก การกินอาหาร และอัตราการตายในแต่ละวัน ปลานิลทุกตัวที่ตายในการทดลองนี้ถูกนำมาตรวจหา *S. agalactiae* ในตับ และไต เพื่อยืนยันว่าการตายของปลานิลเกิดจากการติดเชื้อ *S. agalactiae*

3.5 การทดลองสำหรับ *A. hydrophila*

3.5.1 การทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

การทดสอบความสามารถของสารสกัดจากสมุนไพร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย*A. hydrophila* ใช้วิธี swab paper disc โดยเลี้ยง *A. hydrophila* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาป้าย (swab) ลงบน BHI agar ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่น paper disc ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ดังกล่าว แล้วหยดสารสกัดจากสมุนไพร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปให้สังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc หรือไม่ ถ้าเห็น inhibition zone เกิดขึ้น

รอบ ๆ แผ่น paper disc ก็แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

3.5.2 การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดจากสมุนไพร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ทำโดยนำสารสกัดจากสมุนไพรจากความเข้มข้นเริ่มต้น 100 µg/µl มาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 2 เท่า (two fold serial dilution) จากนั้นนำสารสกัดสมุนไพรแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยเติมลงใน culture *A. hydrophila* (10^3 CFU/ml) ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร นำ culture ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ก่อนตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ culture ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งแสดงในหน่วย µg/ml

3.5.3 การตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยสารสกัดสมุนไพร

การตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ด้วยสารสกัดสมุนไพร ทำโดยการนำสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นเท่ากับ MIC ใส่ในหลอดทดลองที่มี *A. hydrophila* ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture ของ *A. hydrophila* ที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดสมุนไพร ปริมาตร 100 µl มาใส่ลงในอาหาร BHI broth ที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากเชื้อ *A. hydrophila* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพร แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* แบบ bacteriostatic แต่ถ้า *A. hydrophila* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ไม่มีการเติมสารสกัดสมุนไพร แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* แบบ bactericidal

3.5.4 การเตรียมปลานิล

ปลานิลที่ใช้ในการทดลอง เป็นปลานิลที่ได้มาจากแหล่งพันธุ์ที่เชื่อถือได้ คือ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำจืด บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (ซีพีกรุ๊ป กรุงเทพ ประเทศไทย) โดยปลานิลดังกล่าวถูกนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลองในถังพลาสติกขนาด 50 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (fish stock) โดยมีการให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้แสงอีก 12 ชั่วโมง และให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับปลานิลโดยเฉพาะ คือ อาหารปลาที่มีชื่อทางการค้าว่า ซากุระ ซึ่งเป็นอาหารที่มีโปรตีน 30 % โดยการให้อาหารจะให้ในปริมาณ 5%/น้ำหนักตัว/วัน โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง (เช้า และเย็น) ก่อนนำปลานิลไปใช้ในการทดลองทุกครั้งต้องทำการสุ่มตรวจปลานิลว่าปลอดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* หรือไม่ โดยการนำตับ และไตของปลานิลที่เลือกโดยการสุ่มมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคปลอดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตว่ามีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวหรือไม่ หากมีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องนำไปทำการยืนยันว่าเป็น *A. hydrophila* หรือไม่ ซึ่งทำได้โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 test kit

ในทุกชุดการทดลองใช้ปลานิลจำนวน 10 ตัว ที่เลี้ยงไว้ในถังเลี้ยงปลาขนาด 45 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยปลานิลแต่ละตัวมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 10 ± 1 กรัม

3.5.5 การศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *A. hydrophila*

การศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *A. hydrophila* ทำโดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ โดยในแต่ละชุดการทดลองมีปลานิลจำนวน 10 ตัว ปลานิลในแต่ละชุดการทดลองถูกฉีดด้วย *A. hydrophila* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) โดยความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้สำหรับปลาในแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^7$ CFU/ml
ชุดการทดลองที่ 2 ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^6$CFU/ml
ชุดการทดลองที่ 3 ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^5$ CFU/ml
ชุดการทดลองที่ 4ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^4$ CFU/ml
ชุดการทดลองที่ 5 ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^3$ CFU/ml
ชุดการทดลองที่ 6 ความเข้มข้นของ *A. hydrophila* ที่ใช้เท่ากับ $6x10^2$ CFU/ml

จากนั้นทำการเลี้ยงปลาต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และสังเกตพฤติกรรมของปลา เช่น การกินอาหาร อัตราการตาย หากพบปลาตายให้รีบแยกออกจากกลุ่ม ปลานิลทุกตัวที่ตายจะถูกนำมาตรวจหา *A. hydrophila* ในตับ และไต เพื่อยืนยันว่าการตายของปลานิลเกิดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila*

การคำนวณหาค่า median lethal dose (LD_{50}) (CFU/ml) ทำตามวิธีของ Reed-Muench (1938) โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$\log LD_{50} = \alpha \log b + c$$

โดยที่ α = the mortality higher than 50% - 50% / the mortality higher than 50% - the mortality lower than 50%

b = dilution rate, in current experiment $b = 10^{-1}$

c = the log of minimum dilution rate, when the mortality higher than 50%

3.5.6 การศึกษาผลของสมุนไพร และสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการรอดตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*

ในการทดลองนี้ใช้สมุนไพรไทย และสารสกัดสมุนไพรที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ดีที่สุด ซึ่งได้แก่ ใบฝรั่ง และสารสกัดเอทานอล 95% ของใบฝรั่ง ตามลำดับ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละชุดการทดลองใช้ปลานิลจำนวน 10 ตัว ปลานิลในแต่ละชุดการทดลองถูกเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมกับใบฝรั่งแห้งบดละเอียดในอัตราส่วน 4:1 (w/w) (Diet 1)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมกับสารสกัดเอทานอล 95%ของใบฝรั่งในอัตราส่วน 24:1 (w/w) (Diet 2)

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมกับ oxytetracycline ในอัตราส่วน 199:1 (w/w) (Diet 3)

ชุดการทดลองที่ 4ปลานิลถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่ไม่ผสมสมุนไพร และ oxytetracycline (Diet 4)

ในการทดลองนี้ปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง ถูกเลี้ยงด้วยอาหารดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 5 วัน ก่อนการฉีด *A. hydrophila* ในปริมาณที่เท่ากับค่า LD_{50} เข้าทางช่องท้องของปลานิล จากนั้นทำการเลี้ยงปลานิลต่อไปอีก 10 วัน เพื่อสังเกตพฤติกรรมที่แสดงออก การกินอาหาร และอัตราการตายในแต่ละวัน ปลานิลทุกตัวที่ตายในการทดลองนี้ถูกนำมาตรวจหา *A. hydrophila* ในตับ และไต เพื่อยืนยันว่าการตายของปลานิลเกิดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila*

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูปทางสถิติ ทำการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way analysis of variances: One-way ANOVA) และ LSD (Least Significant Difference) ใช้สำหรับเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสำหรับสิ่งทดลองไม่เกิน 5 สิ่งทดลอง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดลองสำหรับ *S. agalactiae*

4.1.1 ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* โดยวิธี swab paper disc ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธี swab paper disc

พืชสมุนไพร	ตัวทำละลาย				
	เฮกเซน	เมทานอล	เอทานอล 95%	เอทิลอะซิเตท	น้ำกลั่น
บอระเพ็ด	-	+	+	+	-
บัวบก	-	+	+	+	-
ฝรั่ง	+	++	+++	++	+
ฟ้าทะลายโจร	+	+	++	++	+
กะเม็ง	-	+	+	++	-
ขมิ้นชัน	+	+	++	-	-
กระเทียม	-	+	++	+++	+
ลูกใต้ใบ	-	+	++	+	-
มังคุด	++	++	++	+	+
มะระขี้นก	-	+	+	++	-
น้ำนมราชสีห์	-	+	++	+	-
พริกขี้หนู	++	+++	+++	++	+
ส้มเขียวหวาน	++	+	+	+	-
ทับทิม	-	++	+++	++	-
ชุดควบคุม (ตัวทำละลาย)	-	++	++	++	-

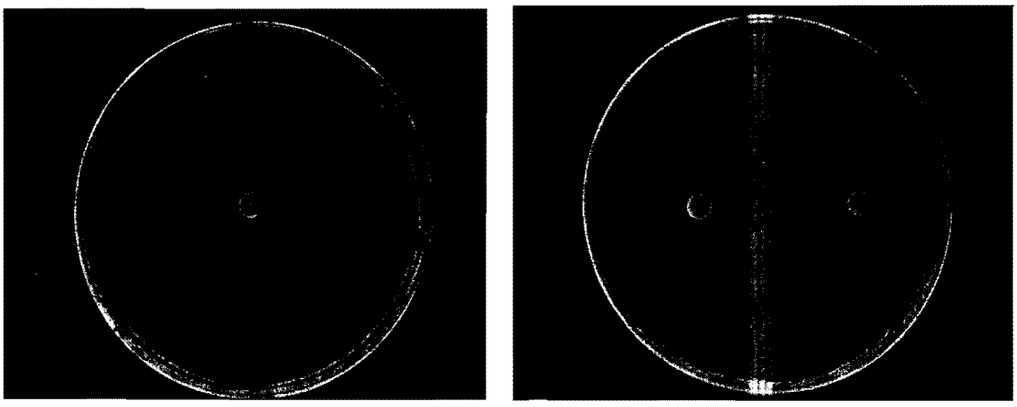
หมายเหตุ - ไม่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

\+ ขนาดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่า 0.1 mm แต่ไม่เกิน 10 mm

\+ + ขนาดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่า 10 mm แต่ไม่เกิน 20 mm

\+++ ขนาดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่า 20 mm

จากผลการทดลองดังกล่าว เห็นได้ว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* อยู่ในระดับสูงสุด (+++) หรือทำให้เกิด inhibition zone กว้างกว่า 20 มิลลิเมตร (ตารางที่ 10 ภาคผนวก ข) ได้แก่ สารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู (ภาพที่ 8 ก) สารสกัด 95% เอทานอลของพริกขี้หนู (ภาพที่ 8 ข) สารสกัด 95% เอทานอลของฝรั่ง สารสกัด 95% เอทานอลของทับทิม และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของกระเทียม ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้แก่ สารสกัดเฮกเซนของบอระเพ็ด และสารสกัดเฮกเซนของบัวบก



(ก) (ข)

ภาพที่ 8 ผลการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ด้วยสารสกัดเมทานอล และสารสกัด 95% เอทานอลของพริกขี้หนู

(ก) ผลการยับยั้งเชื้อด้วยสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู

(ข) ผลการยับยั้งเชื้อจากสารสกัด 95% เอทานอลของพริกขี้หนู

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่สามารถทำให้เกิด inhibition zone ในการทดสอบด้วยวิธี swab paper disc ไปหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* (MIC) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*

พืชสมุนไพร	ปริมาณสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) (µg/ml)				
	เฮกเซน	เมทานอล	95 % เอทานอล	เอทิลอะซิเตท	น้ำกลั่น
บอระเพ็ด	nd	2000	2000	2000	nd
บัวบก	nd	>2000	>2000	>2000	nd
ฝรั่ง	>2000	250	125	250	2000
ฟ้าทะลายโจร	>2000	2000	500	250	>2000
กะเม็ง	nd	2000	2000	500	nd
ขมิ้นชัน	>2000	>2000	1000	nd	nd
กระเทียม	nd	2000	1000	62.5	2000
ลูกใต้ใบ	nd	2000	250	2000	nd
มังคุด	500	500	250	>2000	>2000
มะระขี้นก	nd	>2000	>2000	500	nd
น้ำนมราชสีห์	nd	>2000	1000	>2000	nd
พริกขี้หนู	1000	31.25	62.5	500	>2000
ส้มเขียวหวาน	250	2000	2000	2000	nd
ทับทิม	nd	250	125	500	nd

หมายเหตุ nd = not done

ค่า MIC ≤ 125 µg/ml หมายถึง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีมาก

ค่า MIC = 250 µg/ml หมายถึง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ปานกลาง

ค่า MIC ≥ 500 µg/ml หมายถึง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อย

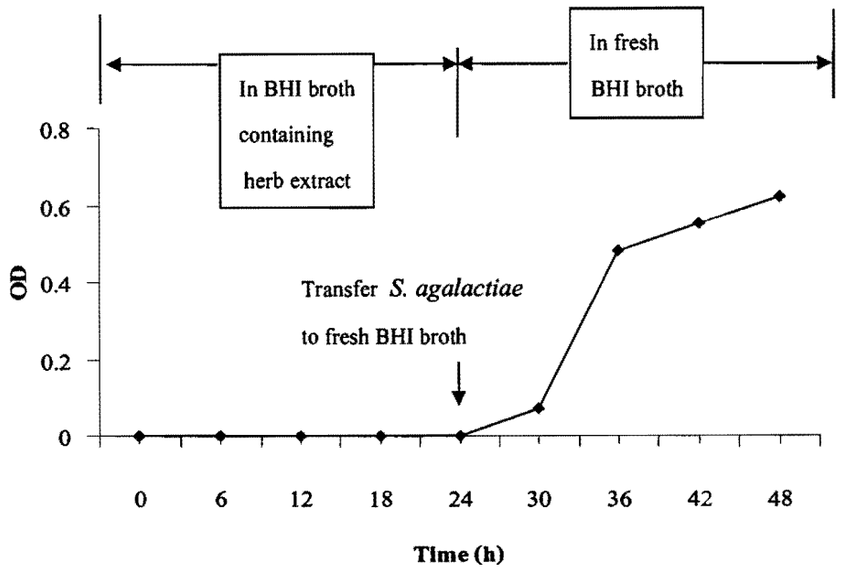
จากผลการทดลองดังกล่าว เห็นได้ว่าในบรรดาสารสกัดสมุนไพรที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ในระดับสูงสุด (+++) จากการทดสอบด้วยวิธี swab paper disc มีค่า MIC ที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดเมทานอล 95% เอทานอล และเอทิลอะซิเตทของบอระเพ็ดมีค่า MIC เท่ากับ 2000 µg/ml สารสกัดสกัดเมทานอล 95% เอทานอล และเอทิลอะซิเตทของบัวบกมีค่า MIC เท่ากับ >2000 µg/ml สารสกัด 95% เอทานอลของฝรั่งมีค่า MIC เท่ากับ 125 µg/ml สารสกัด เอทิลอะซิเตทของฟ้าทะลายโจรมีค่า MIC เท่ากับ 250 µg/ml และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของกะเม็งมีค่า MIC เท่ากับ 500 µg/ml สารสกัด 95% เอทานอลของขมิ้นชันมีค่า MIC เท่ากับ 1000 µg/ml สารสกัดเอทิลอะซิเตทของกระเทียมมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 µg/ml สารสกัด 95% เอทานอลของลูกใต้ใบมีค่า MIC เท่ากับ 250 µg/ml สารสกัด 95% เอทานอลของมังคุดมีค่า MIC เท่ากับ 250 µg/ml สารสกัดเอทิลอะซิเตทของมะระขี้นกมีค่า MIC เท่ากับ 500 µg/ml สารสกัด 95% เอทานอลของน้ำนมราชสีห์มีค่า MIC เท่ากับ 1000 µg/ml สารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 µg/ml สารสกัดเฮกเซนของส้มเขียวหวานมีค่า MIC เท่ากับ 250 µg/ml และสารสกัด 95% เอทานอลของทับทิมมีค่า MIC เท่ากับ 125 µg/ml

หากพิจารณาจากค่า MIC ที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC ต่ำที่สุด คือ มีค่าเท่ากับ 31.25 µg/ml

เนื่องจากสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูมีความสามารถในการยับยั้ง *S. agalactiae* ได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี swab paper disc และค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพร ดังนั้นสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวจึงได้รับการเลือกเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป รวมทั้งใช้ในการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล

4.1.2 กลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*

เมื่อนำ *S. agalactiae* ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการถ่ายเชื้อ *S. agalactiae* ที่ถูกยับยั้งการเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ไม่มีการเติมสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู พบว่า *S. agalactiae* ที่ถูกยับยั้งการเจริญสามารถกลับมาเจริญได้อีก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูมีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ในลักษณะที่ไม่ไปทำให้เซลล์ของ *S. agalactiae* ถูกทำลาย เพียงแต่ไปทำให้การเจริญของ *S. agalactiae* หยุดลง หรือที่เรียกว่ามีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* แบบ bacteriostatic (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 กลไกการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* แบบ bacteriostatic ด้วยสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู

4.1.3 ความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *S. agalactiae*

การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *S. agalactiae* โดยการฉีด *S. agalactiae* ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าทางช่องท้องของปลานิล แล้วหาเปอร์เซ็นต์การตายของปลา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่า LD_{50} ของเชื้อ *S. agalactiae* ตามวิธีการของ Reed-Muench พบว่าค่า LD_{50} ของเชื้อ *S. agalactiae* มีค่าเท่ากับ $10^{-3.6}$ หรือเท่ากับ $2.4x10^{5}$ CFU/ml

การตายของปลานิลทุกตัวอยู่ในช่วง 1 ถึง 5 วัน หลังจากที่มีการฉีด *S. agalactiae* เข้าสู่ตัวปลา จากการแยกเชื้อจากตับ และไตของปลานิลที่ตาย พบว่าปลานิลที่ตายทุกตัวมี *S. agalactiae* อยู่ในตับ และไต ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการตายของปลานิลเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* นอกจากนี้พฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลานิลก่อนตาย รวมทั้งลักษณะภายในของปลานิลที่ตาย (ภาพที่ 10) ยังช่วยสนับสนุนว่าปลานิลที่ตายมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยปลานิลก่อนตายมีพฤติกรรม และลักษณะภายนอกเหมือนกับปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* คือ ปลากินอาหารลดลง หรือไม่ยอมกินอาหารเลย ลักษณะและพฤติกรรมการว่ายน้ำมีลักษณะผิดปกติไป เช่น เฉื่อย และเชื่องช้าลงจนสังเกตได้ ว่ายน้ำเอียงข้างใดข้างหนึ่ง มักว่ายน้ำลงด้านล่าง ถูลำตัวไปกับพื้น พร้อมทั้งมีการเคลื่อนไหวแบบคดเคี้ยวคล้ายงู ลักษณะอาการ

ของโรคที่เกิดกับตัวปลา คือ ตาโปนโตข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง กระจกตาจะบอดแสง เกล็ดหลุดร่วง และลำตัวมีสีดำคล้ำ นอกจากนี้ยังมีลักษณะภาวะตกเลือดทางตา และปาก แผ่นปิดเหงือก เหงือก ครีบ และทวารหนัก เกิดบาดแผลเปื่อยบริเวณผิวหนังและด้านท้อง บริเวณที่ได้รับผลกระทบต่อการติดเชื้อ และแสดงอาการได้ดี คือ บริการด้านข้างของลำตัว ด้านหัวถึงด้านท้าย แผ่นปิดเหงือก รอบ ๆ ปาก และด้านใต้ของแผ่นปิดเหงือก และมีการแสดงรอยโรคอย่างเห็นชัดบริเวณทวาร

ส่วนลักษณะภายในของปลานิลทดลองที่ตาย ก็ไม่แตกต่างจากปลานิลที่ตายด้วยการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยมีลักษณะดังนี้ มีภาวะอักเสบเฉพาะบริเวณ มีเลือดมาเลี้ยงบริเวณอักเสบมากกว่าปกติของเส้นเลือดฝอย และเกิดการตายของเนื้อเยื่อบางส่วน ชักนำให้เกิดภาวะตกเลือดขึ้น และปลาจะตายในที่สุด เมื่อผ่าเปิดหน้าท้องดูลักษณะอวัยวะภายใน เช่น ลำไส้ของปลาที่ติดเชื้อแล้ว พบว่า ท่อลำไส้เกิดการอักเสบ และเกิดคราบเมือกเกาะที่ลำไส้อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ยังมีม้ามบวมใหญ่ และตับสีซีดจางลง พบพื้นที่การตายของเนื้อเยื่อหลายบริเวณ และถ้าเชื้อมีปริมาณสูงขึ้นจะส่งผลกระทบต่อการติดเชื้อที่หัวใจ และไตของปลานิลทดลอง

ตารางที่ 5 อัตราการตายของปลานิลทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *S. agalactiae* เข้าสู่ร่างกาย (LD_{50}) ด้วยวิธี intraperitoneal injection ในสัปดาห์ที่สองของการรับเชื้อเข้าไป

เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*		**จำนวนปลาทดลองที่ตาย**					**อัตราการตาย**
ความเข้มข้น (CFU/ml)	Dilution	1[a]	2[a]	3[a]	4[a]	5[a]	(%)
$6.0x10^{7}$	10^{-1}	10/10	10/10	9/10	8/10	8/10	90
$6.0x10^{6}$	10^{-2}	8/10	7/10	7/10	8/10	7/10	74
$6.0x10^{5}$	10^{-3}	5/10	6/10	5/10	7/10	5/10	56
$6.0x10^{4}$	10^{-4}	4/10	5/10	6/10	4/10	4/10	46
$6.0x10^{3}$	10^{-5}	3/10	3/10	4/10	3/10	4/10	34
$6.0x10^{2}$	10^{-6}	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	10

หมายเหตุ [a] = replicate number (จำนวนซ้ำของการทดลอง)

(ก) Exophthalmia and opacity

(ข) Cornea opacity

(ค) Ulceration of body, anal fin area

(ง) hemorrhages operculum region/gills

(จ) Pale liver

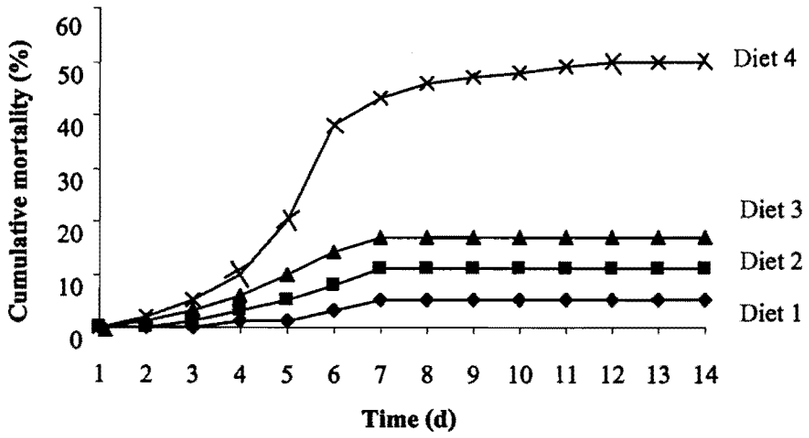
(ฉ) Necrosis of pale liver

ภาพที่ 10 ลักษณะภายนอกและภายในของปลานิลทดลองที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*

4.1.4 ความสามารถของพริกขี้หนู และสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูในการลดอัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *S. agalactiae*

การทดลองนี้ได้นำอาหารเลี้ยงปลา 4 สูตร ซึ่งได้แก่ อาหารที่มีส่วนผสมของพริกขี้หนูบดละเอียดในอัตราส่วน 9:1 (w/w) (Diet 1) อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูในอัตราส่วน 19:1 (w/w) (Diet 2) อาหารที่มีส่วนผสมของ oxytetracycline ในอัตราส่วน

199:1 (w/w) (Diet 3) และอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพร หรือ oxytetracycline (Diet 4) มาเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะมีการฉีด *S. agalactiae* ให้กับปลานิลด้วยขนาดที่เท่ากับค่า LD_{50} ผลปรากฏว่าปลานิลที่ได้รับอาหาร Diet 1 Diet 2 และ Diet 3 มีอัตราการตายต่ำกว่าปลานิลที่ได้รับอาหาร Diet 4 (ภาพที่ 11) แสดงว่าทั้งพริกขี้หนูบดละเอียด สารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู และ oxytetracycline มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าอัตราการตายของปลาที่ได้รับอาหาร Diet 1 Diet 2 และ Diet 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพริกขี้หนู และสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูอาจนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิลได้



ภาพที่ 11 อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

4.2 ผลการทดลองสำหรับ *A. hydrophila*

4.2.1 ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A.hydrophila* โดยวิธี swab paper disc ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยใช้วิธี swab paper disc

พืชสมุนไพร	ตัวทำละลาย		
	น้ำกลั่น	95% เอทานอล	อีเทอร์
บอระเพ็ด	-	-	-
บัวบก	-	-	++
ฝรั่ง	++	+++	++
ฟ้าทะลายโจร	++	++	++
กระเทียม	+	++	++
มังคุด	++	++	++
มะระขี้นก	-	-	-
ทับทิม	-	++	-
ชุมเห็ดเทศ	-	-	++
ข่า	-	-	-
กานพลู	-	++	++
กระชาย	-	-	++
กะเพรา	-	+	+
ตะไคร้	-	-	-
ชุดควบคุม	-	+	-

หมายเหตุ
- ไม่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
+ ขนาดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่า 0.1 mm แต่ไม่เกิน 10 mm
++ ขนาดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่า 10 mm แต่ไม่เกิน 20 mm
+++ ขนาดโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่า 20 mm

จากผลการทดลองดังกล่าว เห็นได้ว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้แตกต่างกัน โดยสมุนไพรที่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ไม่ว่าจะสกัดด้วยตัวทำละลายใด ๆ ได้แก่ บอระเพ็ด (*T. crispa*) ข่า (*A. galangal*) มะระขี้นก (*M. charantia*) และตะไคร้ (*C. citrares*) ส่วนสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้แตกต่างกัน โดยสมุนไพรที่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการ

เจริญของ *A. hydrophila* ไม่ว่าจะสกัดด้วยตัวทำละลายใด ๆ ได้แก่ บอระเพ็ด (*T. crispa*) ข่า (*A. galangal*) มะระขี้นก (*M. charantia*) และตะไคร้ (*C. citrares*) ส่วนสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ไม่ว่าจะสกัดด้วยตัวทำละลายใด ๆ ได้แก่ ฝรั่ง (*P. guajava*) ฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) กระเทียม (*A. sativum*) และมังคุด (*G. mangostana*) ในบรรดาสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ สารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ดีที่สุด โดยทำให้เกิด inhibition zone มีขนาดเท่ากับ 20.1 มิลลิเมตร (ตารางที่ 11 ภาคผนวก ข)

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรที่สามารถทำให้เกิด inhibition zone ในการทดสอบด้วยวิธี swab paper disc ไปหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* (MIC) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

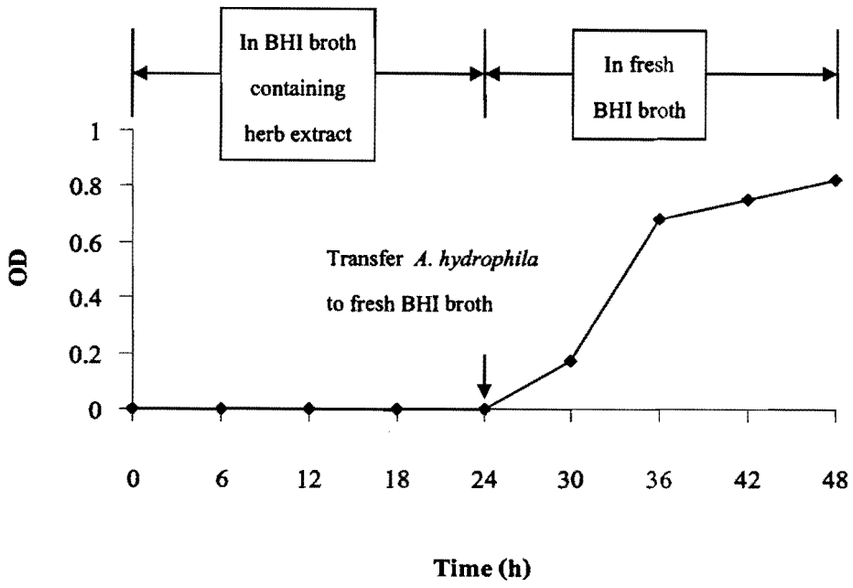
พืชสมุนไพร	ปริมาณสารสกัดสมุนไพรไทยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) (µg/ml)		
	น้ำกลั่น	95% เอทานอล	อีเทอร์
บอระเพ็ด	nd	nd	nd
บัวบก	nd	nd	250
ฝรั่ง	250	62.5	125
ฟ้าทะลายโจร	500	250	250
กระเทียม	>2000	250	500
มังคุด	500	125	200
มะระขี้นก	nd	nd	nd
ทับทิม	nd	500	nd
ชุมเห็ดเทศ	nd	nd	250
ข่า	nd	nd	nd
กานพลู	nd	2000	1000
กระชาย	nd	nd	500
กะเพรา	nd	2000	>2000
ตะไคร้	nd	nd	nd

หมายเหตุ nd = not done

จากผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี swab paper disc กล่าวคือสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้เกิด inhibition zone ที่กว้างจะมีค่า MIC ที่ต่ำ จากการทดลองนี้ พบว่า ในบรรดาสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดที่ใช้สารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งมีค่า MIC ต่ำสุด คือมีค่าเท่ากับ 62.5 μg/ml

4.2.2 กลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

เมื่อนำ *A. hydrophila* ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการถ่ายเชื้อ *A. hydrophila* ที่ถูกยับยั้งการเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ไม่มีการเติมสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง พบว่า *A. hydrophila* ที่ถูกยับยั้งการเจริญสามารถกลับมาเจริญได้อีก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งมีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในลักษณะที่ไม่ไปทำให้เซลล์ของ *A. hydrophila* ถูกทำลายเพียงแต่ไปทำให้การเจริญของ *A. hydrophila* หยุดลง หรือที่เรียกว่ามีกลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* แบบ bacteriostatic (ภาพที่ 12)



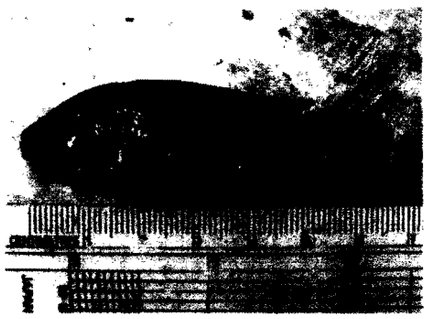
ภาพที่ 12 กลไกการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* แบบ bacteriostatic ด้วยสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง

4.2.3 ความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *A. hydrophila*

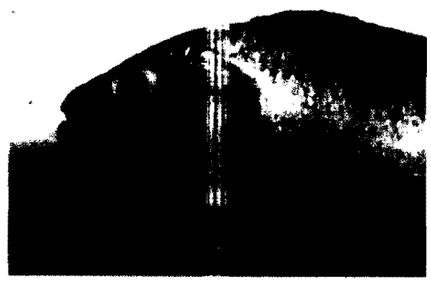
การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคในปลานิลของ *A. hydrophila* โดยการฉีดเชื้อชนิดนี้ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าทางช่องท้องของปลานิลแล้วหาเปอร์เซ็นต์การตายของปลา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 การตายของปลานิลทุกตัวอยู่ในช่วง 1 ถึง 5 วัน หลังจากที่มีการฉีด *A. hydrophila* เข้าสู่ตัวปลา จากการแยกเชื้อจากตับ และไตของปลานิลที่ตาย พบว่าปลานิลที่ตายทุกตัวมี *A. hydrophila* อยู่ในตับ และไต (ภาพที่ 13)

(ก) Exophthalmia and opacity

(ข) Cornea opacity



(ค) Ulceration of body, anal fin area



(ง) hemorrhages operculum region/gill

(จ) Pale liver

(ฉ) Necrosis of pale liver

ภาพที่ 13 ลักษณะภายนอกและภายในของปลานิลทดลองที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila*

ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการตายของปลานิลเหล่านี้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* นอกจากนี้ พฤติกรรม และลักษณะภายนอกของปลานิลก่อนตาย รวมทั้งลักษณะภายในของปลานิลที่ตาย ยังช่วยสนับสนุนว่าปลานิลที่ตายมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยปลานิลก่อนตายมีพฤติกรรม และลักษณะภายนอกเหมือนกับปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* (ภาพที่ 13) คือ ปลานิลทดลองมีพฤติกรรมผิดปกติไป มีการว่ายน้ำเฉื่อยชา ไม่กินอาหาร ลักษณะภายนอกลำตัวมีครีบกร่อน มีการตกเลือด และเมื่อได้รับเชื้อในปริมาณมากจะเกิดบาดแผลเป็นหลุมลึก ท้องบวม ส่วนลักษณะภายในของปลานิลที่ตายก็ไม่แตกต่างจากปลานิลที่ตายด้วยการติดเชื้อ *S. agalactiae* โดยมีลักษณะดังนี้ ตับเหลือง และมีการตกเลือดบริเวณลำไส้

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่า LD_{50} ของเชื้อ *A. hydrophila* ตามวิธีการของ Reed-Muench พบว่าค่า LD_{50} ของเชื้อ *A. hydrophila* มีค่าเท่ากับ $10^{-2.64}$ หรือ 1.37×10^{6} CFU/ml (ตารางที่ 8)

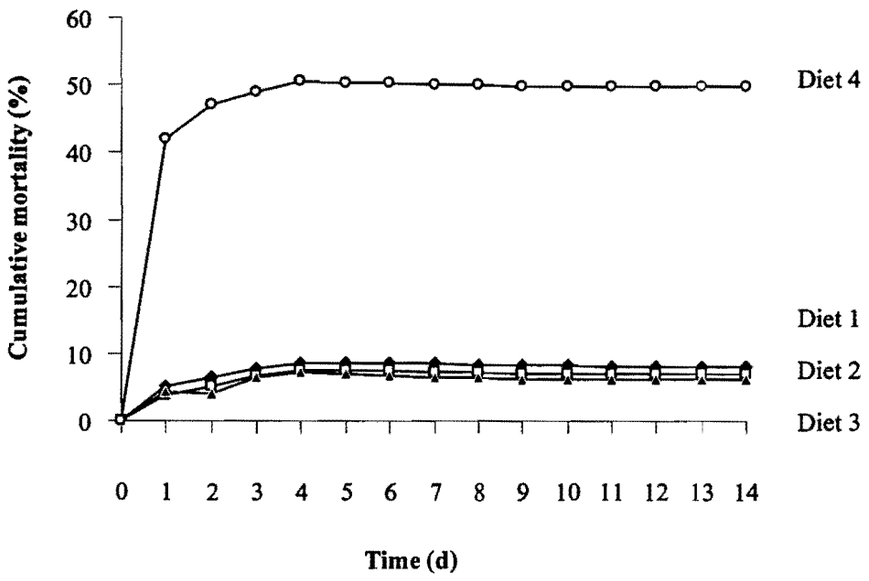
ตารางที่ 8 อัตราการตายของปลานิลทดลองหลังจากได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เข้าสู่ร่างกาย (LD_{50}) ด้วยวิธี intraperitoneal injection ในสัปดาห์ที่สองของการรับเชื้อเข้าไป

เชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*		**จำนวนปลาทดลองที่ตาย**					**อัตราการตาย (%)**
ความเข้มข้น (CFU/ml)	Dilution	1[a]	2[a]	3[a]	4[a]	5[a]	
6.0×10^{7}	10^{-1}	10/10	9/10	10/10	8/10	9/10	92
6.0×10^{6}	10^{-2}	5/10	6/10	8/10	7/10	6/10	64
6.0×10^{5}	10^{-3}	3/10	4/10	5/10	5/10	4/10	42
6.0×10^{4}	10^{-4}	2/10	3/10	3/10	3/10	2/10	26
6.0×10^{3}	10^{-5}	1/10	2/10	2/10	1/10	1/10	14
6.0×10^{2}	10^{-6}	0/10	1/10	1/10	0/10	1/10	4

หมายเหตุ [a] = replicate number (จำนวนซ้ำของการทดลอง)

4.2.4 ความสามารถของใบฝรั่ง และสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งในการลดอัตราการตายของปลานิลที่ติดเชื้อ *A. hydrophila*

การทดลองนี้ได้นำอาหารเลี้ยงปลา 4 สูตร ซึ่งได้แก่ อาหารที่มีส่วนผสมของใบฝรั่งบดละเอียดในอัตราส่วน 4:1 (w/w) (Diet 1) อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งในอัตราส่วน 24:1 (w/w) (Diet 2) อาหารที่มีส่วนผสมของ oxytetracycline ในอัตราส่วน 199:1 (w/w) (Diet 3) และอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของสมุนไพรหรือ oxytetracycline (Diet 4) มาเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะมีการฉีด *A. hydrophila* ให้กับปลานิลด้วยขนาดที่เท่ากับค่า LD_{50} ผลปรากฏว่าปลานิลที่ได้รับอาหาร Diet 1 Diet 2 และ Diet 3 มีอัตราการตายต่ำกว่าปลานิลที่ได้รับอาหาร Diet 4 (ภาพที่ 14) แสดงว่าทั้งใบฝรั่ง สารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง และ oxytetracycline มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิล นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าอัตราการตายของปลาที่ได้รับอาหาร Diet 1 Diet 2 และ Diet 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใบฝรั่ง และสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งอาจนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลได้



ภาพที่ 14 อัตราการตายของปลานิลทดลองที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การติดเชื้อแบคทีเรียนับเป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในการเพาะเลี้ยงปลานิลโดย แบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในปลานิลได้มีหลากหลายสายพันธุ์ ในบรรดาแบคทีเรียเหล่านี้ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญมากต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลในประประเทศไทย การติดเชื้อแบคทีเรียในปลานิลนอกจากจะส่งผลกระทบต่อผู้เพาะเลี้ยงแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคด้วย โดยผู้เพาะเลี้ยงมักประสบปัญหาการขาดทุนเนื่องจากการตายของปลาเป็นจำนวนมาก ส่วนผู้บริโภคมักประสบปัญหาเรื่องราคาปลาที่สูงขึ้น และอันตรายที่อาจเกิดจากแบคทีเรียที่อาจกลายพันธุ์ทำให้ก่อโรคในคนได้

ในปัจจุบันมักใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรคปลา ถึงแม้ว่าวิธีการดังกล่าวจะให้ผลดี แต่ก็มีข้อด้อยอยู่หลายประการเช่น

(1) ยาปฏิชีวนะตกค้างอยู่ในตัวปลาได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคกังวลว่าจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค

(2) การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม เช่น ใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้เป็นเวลานานเกินไป อาจส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรค ซึ่งความสามารถในการดื้อยาสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในธรรมชาติได้ ส่งผลให้เกิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อยาจำนวนมาก (Brown, 1989)

(3) การใช้ยาปฏิชีวนะมักทำให้เกิดผลข้างเคียง (side effect) กับปลา เนื่องจากยาปฏิชีวนะมักไปมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อยู่ในตัวปลา ซึ่งจะทำให้ปลาเกิดอาการเครียด มีภาวะภูมิคุ้มกันที่ต่ำลง และมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง (Atal, 1982)

ด้วยเหตุนี้ในหลาย ๆ ประเทศได้มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อการค้าและการส่งออก ยาปฏิชีวนะที่มีการห้ามใช้แล้วในหลายประเทศ เช่น chloramphenicol, ยาในกลุ่ม nitrofurans (ได้แก่ furazolidone, nitrofurazone, furaltadone, nitrofurantoin, furylfuramide, nifuratel, nifursoxime, nifurprazine), neomycin, nalidixic acid, sulphamethoxazole, chlorpromazine, colchicines, dapsone, dimetridazole, metronidazole, onidazole, ipronidazole, clenbuterol, diethylstilbestrol, sulfonamide และ floroquinolone เป็นต้น (Citarasu, 2010)

จากการที่มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อการค้า และการส่งออก จึงทำให้มีความพยายามที่จะหาสิ่งที่สามารถนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรคปลา สิ่งหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน คือ พืชสมุนไพร เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น

(1) สมุนไพรเกือบทุกชนิดสามารถหาได้ตามธรรมชาติ หรือปลูกได้เอง ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาไม่จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายมากในการซื้อยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาแพงนอกจากนี้ ยังทำให้เกษตรกรสามารถพึ่งตนเองได้โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพาบริษัทยาปฏิชีวนะ

(2) สมุนไพรส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยจากการที่มีการใช้รักษาโรคในคน หรือสัตว์ต่าง ๆ มาเป็นเวลานาน

(3) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่าสามารถใช้ป้องกัน และรักษาโรคในคนและสัตว์ต่าง ๆ ได้ (Citarasu, 2010)

(4) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ (antimicrobial activity) เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส (Cowan, 1999; Sivaram et al., 2004; Citarasu, 2010)

(5) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Ou et al., 2003; Citarasu, 2010) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมคุณภาพของปลาได้

(6) สมุนไพรหลายชนิด ได้รับการยืนยันทางวิชาการว่า มีความสามารถในการลดความเครียดได้ ซึ่งการลดความเครียดในปลาจะช่วยทำให้ปลามีการเจริญเติบโตได้ดี และมีโอกาสติดเชื้อได้น้อยลง (Citarasu, 2010)

(7) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่า มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulation) ของคน และสัตว์ต่าง ๆ รวมทั้งปลาได้ (Sivaram et al., 2004; Galina et al., 2009; Citarasu, 2010)

สารเคมีที่พบในสมุนไพรจำนวนมากได้รับการพิสูจน์ และยืนยันว่ามีส่วนช่วยให้สมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 12) การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การกำจัดอนุมูลอิสระ การลดความเครียด และการป้องกันการเกิดโรค ตัวอย่างของสารดังกล่าว เช่น alkaloids, flavoniods, phenolics, terpenoids, steroids และ essential oils (Cowan, 1998; Sivaram et al., 2004; Citarasu, 2010)

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทำให้การศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะหาสมุนไพร เพื่อมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคติดเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ในปลานิล โดยนำสารสกัดของสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ

S. agalactiae และ *A. hydrophila* ในหลอดทดลอง (*in vitro* test) แล้วเลือกสารสกัดสมุนไพรที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ในหลอดทดลองที่ดีที่สุดไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในปลานิลต่อไป ผลที่ได้จากการศึกษานี้น่าจะมีประโยชน์อย่างมากต่อทั้งผู้เพาะเลี้ยงปลานิล และผู้บริโภค โดยผู้เพาะเลี้ยงปลานิลจะสามารถผลิตปลานิลได้โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพายาปฏิชีวนะอีกต่อไป ส่วนผู้บริโภคก็จะมั่นใจในความปลอดภัยในการบริโภคปลานิล

ในการศึกษาความสามารถของพืชในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการทดลองมีความสำคัญมากทั้งนี้เนื่องจากแต่ละส่วนของพืชมีสารที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ผลของพริกขี้หนูเป็นส่วนที่มีสรรพคุณทางยา และมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขณะที่ใบพริกไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว ดังนั้นในการเลือกส่วนของพริกที่จะนำมากศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค จึงควรเลือกผลของพริกมาใช้ในการศึกษา ซึ่งในการศึกษานี้ส่วนของพืชที่ใช้ เป็นส่วนที่เคยมีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือมีสรรพคุณทางยาในการเก็บพืชสมุนไพรเพื่อให้ได้สรรพคุณทางยา หรือความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์สูงสุด มีหลักการเก็บดังนี้ โดยขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่เก็บ ถ้าส่วนของพืชที่จะเก็บเป็นราก หรือเหง้า ให้เก็บหลังจากที่พืชเจริญเต็มที่แล้ว หรือหยุดการเจริญแล้ว ถ้าส่วนของพืชที่จะเก็บเป็นใบ หรือยอด ให้เก็บก่อนที่พืชจะออกดอก หรือก่อนที่ดอกจะบานเต็มที่ ถ้าส่วนของพืชที่จะเก็บเป็นผล ให้เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว และถ้าส่วนของพืชที่จะเก็บเป็นเมล็ด ให้เก็บเมื่อเมล็ดแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

ในการสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายหากต้องการให้ได้ผลดีต้องใช้พืชสด แต่เนื่อง จากความไม่สะดวก โดยทั่วไปจึงมักนำพืชมาทำให้แห้งแล้วเก็บไว้ เมื่อต้องการจึงค่อยนำมาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย วิธีการทำพืชให้แห้งเพื่อใช้ในการสกัดสารต้องเป็นวิธีที่ใช้อุณหภูมิไม่สูงมากนัก และใช้เวลาไม่นานเพื่อป้องกันไม่ให้สารถูกทำลายด้วยความร้อน การเก็บพืชที่แห้งควรเก็บในที่แห้ง ไม่มีแสง เย็นและอากาศถ่ายเทได้ดี เพื่อให้พืช และสารในพืชคงสภาพได้นาน ในการสกัดสารจากพืชให้ได้ผลดีควรต้องทำการย่อยพืชให้มีขนาดเล็กก่อน เช่น ทำการบดพืชให้ละเอียดก่อน เพื่อให้ส่วนของพืชสัมผัสกับตัวทำละลายได้มากที่สุด ในการเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารจากพืชก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญ เพราะตัวทำละลายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติ ความสามารถในการทำละลาย ความมีขั้วที่แตกต่างกัน ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากพืช ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรเมทานอล อีเทอร์ และอะซิโตน โดยตัวทำละลายเหล่านี้มีความสามารถในการสกัดสารที่แตกต่างกันออกจากพืช (ตารางที่ 9) ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้ไดคลอโรเมทานอลในการสกัดสารจากพืช สารที่ได้จะเป็นสารในกลุ่ม terpenoids (ตารางที่ 9) แต่ถ้าใช้อะซิโตนในการสกัดสารจากพืช สารที่ได้จะเป็นสารในกลุ่ม flavonoids (ตารางที่ 9) เป็นต้น

ตารางที่ 9 ตัวทำละลายเฉพาะที่ใช้สกัดสารสำคัญ (active component) ออกจากพืชสมุนไพร

Water	**Ethanol**	**Methanol**	**Chloroform**	**Dichloromethanol**	**Ether**	**Acetone**
Anthocyanins	Tannins	Anthocyanins	Terpenoids	Terpenoids	Alkaloids	Flavonols
Starches	Polyphenols	Terpenoids	Flavonoids		Terpenoids	
Tannins	**Polyacetylenes**	Saponins			**Coumarins**	
Saponins	Flavonoids	Tannins			**Fatty acids**	
Terpenoids	Terpenoids	**Xanthoxyllines**				
Polypeptides	**Sterols**	**Totarol**				
Lectins	Alkaloids	**Quassinoids**				
	Propolis	**Lactones**				
		Flavones				
		Phenones				
		Polyphenols				

หมายเหตุ: ตัวอักษรเข้ม หมายถึง สารสำคัญที่ละลายได้เฉพาะตัวทำละลายชนิดนั้นเท่านั้น (Cowan, 1999)

จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าในการสกัดสารบางกลุ่มออกจากพืชสามารถใช้ตัวทำละลายได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น หากต้องการสกัดสารในกลุ่ม terpenoids ออกจากพืช สามารถใช้น้ำ เอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรเมทานอล และอีเทอร์ เป็นตัวทำละลายได้ ในขณะที่ในการสกัดสารบางกลุ่มออกจากพืชจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายที่จำเพาะเท่านั้น ตัวอย่าง เช่น หากต้องการสกัดสารในกลุ่ม lectins ออกจากพืช จำเป็นต้องใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเท่านั้น หรือหากต้องการสกัดสารในกลุ่ม steroids ออกจากพืช จำเป็นต้องใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเท่านั้น (Cowan, 1999) ในการศึกษานี้ใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัดสารออกจากสมุนไพรเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคปลา ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสาระสำคัญใดในพืชสมุนไพรแต่ละชนิดที่ใช้ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคปลา ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายหลายชนิดในการสกัดสารออกจากสมุนไพรจึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการสกัดเอาสารสำคัญดังกล่าวออกจากพืชสมุนไพร

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสมุนไพรและสารสกัดสมุนไพรขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสมุนไพร ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร และชนิดของจุลินทรีย์

ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าชนิดของสมุนไพร มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากการศึกษานี้ ได้แก่ การที่บอระเพ็ด (*T. crispa*) ข่า (*A. galangal*) มะระขี้นก

(*M. charantia*) และตะไคร้ (*C. citratus*) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ไม่ว่าจะใช้ตัวทำละลายใดในการสกัด ในขณะที่ฝรั่ง (*P. guajava*) ฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) กระเทียม (*A. sativum*) และมังคุด (*G. mangostana*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ไม่ว่าจะใช้ตัวทำละลายใดในการสกัด ปรากฏการณ์เช่นนี้มิได้พบแต่เฉพาะในการศึกษานี้เท่านั้น จากการศึกษาของ Rattanachaikunsopon and Phumkhachon (2010a) พบว่า ฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ใบบัวบก (*C. asiatica*) มังคุด (*G. mangostana*) และฝรั่ง (*P. guajava*) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคปลา *Flavobacterium columnare* ได้ ในขณะที่ทับทิม (*P. granatum*) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้

ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากการศึกษานี้ ได้แก่ การที่สารสกัดอีเทอร์ของใบบัวบก (*C. asiatica*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ แต่สารสกัดน้ำ และสารสกัด 95% เอทานอลของใบบัวบกไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ หรือการที่สารสกัด 95% เอทานอลของทับทิม (*P. granatum*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ แต่สารสกัดน้ำและสารสกัดอีเทอร์ของทับทิมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ หรือการที่สารสกัดเฮกเซน สารสกัดเมทานอล และสารสกัด 95% เอทานอลของขมิ้นชัน (*C. longa*) สามารถยับยั้งการ เจริญของ *S. agalactiae* ได้ แต่สารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของขมิ้นชันไม่สามารถยับยั้ง การเจริญของ *S. agalactiae* ได้ หรือการที่สารสกัดเมทานอล สารสกัด 95% เอทานอล และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของบอระเพ็ด (*T. crispa*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้ แต่สารสกัดน้ำ และสารสกัดเฮกเซนของบอระเพ็ดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร มีผลต่อระดับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น สารสกัด 95% เอทานอลของฝรั่งให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ดีกว่าสารสกัดอีเทอร์ และสารสกัดน้ำของพืชชนิดเดียวกัน โดยสังเกตได้จากความกว้างของ inhibition zone และค่า MIC

ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าชนิดของจุลินทรีย์ มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากการศึกษานี้ ได้แก่ การที่บอระเพ็ด (*T. crispa*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ และเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับผลการศึกษาของ Rattanachaikunsopon and Phumkhachon (2009a) ก็พบหลักฐานที่สามารถสนับสนุนให้เห็นว่าชนิดของจุลินทรีย์ มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ กล่าวคือ ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดน้ำของใบบัวบกไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ได้ แต่ในการศึกษาของ Rattanachaikunsopon and Phumkhachon (2010a) กลับพบว่าสารสกัดดังกล่าว

สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคปลา *F. columnare* ได้ ทั้งที่วิธีที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร และวิธีที่ใช้ในการทดสอบความ สามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกัน

สมุนไพรบางชนิดมีกลไกการยับยั้งเชื้อแบบ bactericidal คือไปทำลาย หรือฆ่าเซลล์แบคทีเรีย ในขณะที่สมุนไพรบางชนิดมีกลไกการยับยั้งเชื้อแบบ bacteriostatic คือไปทำให้การเจริญของแบคทีเรียหยุด แต่ไม่ไปฆ่า หรือทำลายเซลล์แบคทีเรีย ในการศึกษานี้พบว่าฝรั่งมีกลไกการยับยั้ง *A. hydrophila* แบบ bacteriostatic เช่นเดียวกับพริกขี้หนูที่มีกลไกการยับยั้ง *S. agalactiae* แบบ bacteriostatic ผลที่ได้จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ด้วยฝรั่งในการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการวิจัยที่ผ่านมาของ Rattanachaikunsopon and Phumkhachon (2007) โดยงานวิจัยดังกล่าว พบว่าฝรั่งมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคปลา *A. hydrophila, A. salmonicida* subsp. *salmonicida, F. columnare, Lactococcus garvieae, S. agalactiae* และ *V. salmonicida* แบบ bacteriostatic นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง ๆ สามารถถูกยับยั้งได้ทั้งแบบ bactericidal และแบบ bacteriostatic ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสมุนไพร ตัวอย่างเช่น *F. columnare* ถูกยับยั้งแบบ bactericidal โดยฟ้าทะลายโจร และใบบัวบก แต่ถูกยับยั้งแบบ bacteriostatic โดยชุมเห็ดเทศ มังคุด และฝรั่ง (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2009c) หรือ *L. garvieae* ถูกยับยั้งแบบ bactericidal โดยอบเชย (*Cinnamomum verum*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) แต่ถูกยับยั้งแบบ bacteriostatic โดยขิง (*Zingiber officinale*) และโหระพา (*Ocimum sanctum*) (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2010b)

แบคทีเรียก่อโรคปลาแต่ละสายพันธุ์มีความรุนแรงในการก่อโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยปกติมักบ่งบอกด้วยค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนร้อยละ 50 หรือค่า median lethal dose (LD_{50}) ซึ่งอาจรายงานในหน่วย CFU/ml หรือ CFU/fish หรือ CFU/g of fish ก็ได้ นอกจากนี้แล้วเนื่องจากค่าดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของปลา และวิธีการให้เชื้อกับปลา ดังนั้นในการรายงานค่าดังกล่าวจึงจำเป็นต้องระบุไว้เสมอว่าเป็นค่าที่ทำให้เกิดโรคในปลาชนิดใด และได้มาจากการให้เชื้อกับปลาโดยวิธีใด ตัวอย่างของค่า LD_{50} ของแบคทีเรียก่อโรคปลาที่เคยรายงานไว้ เช่น ค่า LD_{50} ของ *L. garvieae* สำหรับปลานิล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.78×10^2 CFU/fish โดยการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องของปลา (intraperitoneal injection) (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2009b) ค่า LD_{50} ของ *F. columnare* สำหรับปลานิล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.72×10^3 CFU/fish โดยการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องของปลา (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2009c) ค่า LD_{50} ของ *F. columnare* สำหรับปลานิล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.37×10^5 CFU/ml of water โดยการใส่ลงในน้ำเลี้ยงปลา (bath exposure) (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2010a) ค่า LD_{50} ของ *S. iniae* สำหรับปลานิล ซึ่งมีค่าเท่ากับ

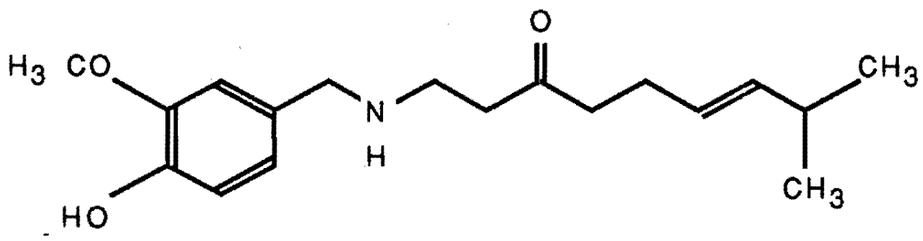
$6.84x10^3$ CFU/fish โดยการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องของปลา (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2010b) และค่า LD_{50} ของ *Edwardsiella tarda* สำหรับปลานิล ซึ่งมีค่าเท่ากับ $5.0x10^2$ CFU/g of fish โดยการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้องของปลา (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2010d) ด้วยเหตุที่ค่า LD_{50} เป็นค่าเฉพาะตัวของแบคทีเรียก่อโรคปลาแต่ละชนิด อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับชนิดของปลา และวิธีการให้เชื้อกับปลา ดังนั้นหากต้องการทราบค่า LD_{50} ของเชื้อใดเชื้อหนึ่งจึงจำเป็นต้องมีการทดลองเสมอ โดยต้องทำการทดลองกับปลาชนิดใดชนิดหนึ่ง และด้วยวิธีการให้เชื้อกับปลาวิธีใดวิธีหนึ่ง ซึ่งค่าที่ได้ก็จะเป็นค่าเฉพาะสำหรับเชื้อ ปลา และวิธีการให้เชื้อกับปลาที่ใช้ทดลองเท่านั้น ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคของ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ในปลานิลโดยการฉีดเชื้อเข้าทางช่องท้อง ดังนั้นค่า LD_{50} ของ *S. agalactiae* และค่า LD_{50} ของ *A. hydrophila* ที่ได้จากการศึกษานี้จึงเป็นค่าเฉพาะสำหรับเชื้อดังกล่าวทั้งสองในการก่อโรคในปลานิลด้วยวิธีการฉีดเข้าทางช่องท้องเท่านั้น

ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนู ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* ในหลอดทดลองได้ดีที่สุด และอาหารปลาที่มีส่วนผสมของสารสกัดดังกล่าวก็สามารถลดอัตราการตายของปลาอันเนื่องมาจากการติดเชื้อ *S. agalactiae* ได้ด้วย นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่าสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ในหลอดทดลองได้ดีที่สุด และอาหารปลาที่มีส่วนผสมของสารสกัดดังกล่าวก็สามารถลดอัตราการตายของปลาอันเนื่องมาจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* ได้ด้วย

พริกขี้หนู (*C. frutescens*) เป็นพืชที่อยู่ใน Family Solanaceae เช่นเดียวกับ มันฝรั่ง มะเขือเทศ มะเขือยาว และยาสูบ มีการสันนิษฐานว่าชื่อวงศ์ Solanaceae น่าจะมาจากคำว่า "solari" ซึ่งเป็นภาษาลาตินแปลว่า "to soothe" หรือ "บรรเทาอาการ" เนื่องจากพืชหลายชนิดในวงศ์นี้รวมทั้งพริกขี้หนูมีคุณสมบัติทางยาในการบรรเทาอาการต่าง ๆ การปลูกพริกส่วนใหญ่มักนำมาใช้เป็นเครื่องเทศในอาหาร แต่เนื่องจากผลของพริกขี้หนูมีสรรพคุณทางยามากมาย จึงได้มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคและบรรเทาอาการผิดปกติต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น บรรเทาอาการปวด (analgesia) ป้องกันมะเร็ง (anticancer) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Cordel and Araujo, 1993; Surh and Lee, 1995; Cai et al., 2004; Chen et al., 1985; Caceres et al., 1993; Cichewicz and Thorpe, 1996; Alderman and Hasting, 1998) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าพริกขี้หนูสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *C. tetani* and *S. pyogenes* เป็นต้น (Cichewicz and Thorpe, 1996)

จากการศึกษาสารเคมีที่พบในผลพริกขี้หนู พบว่า มีสารเคมีเป็นจำนวนมาก โดยมีสารหลักคือ capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide), dihydrocapsicin, *meta*-coumaric acid, *ortho*-

coumaric acid และ *trans*-cinnamic acid (Maria et al., 2000) ในบรรดาสารเหล่านี้ capsaicin จัดเป็นสารที่ได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากเป็นสารที่ทำให้พริกขี้หนูมีรสเผ็ดร้อน และมีฤทธิ์ทางยา โดยมักนำมาใช้ลดอาการปวดต่าง ๆ เช่น อาการปวดหัว ปวดตามข้อเนื่องจากการอักเสบ (rheumatoid arthritis) และปวดกล้ามเนื้อ เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่า capsaicin (ภาพที่ 15) มีความสามารถทำให้สารสื่อประสาทที่เรียกว่า substance P (ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ทำให้รู้สึก เจ็บ ปวด) หมดไปจากระบบประสาท (สุดเหมือนฝัน ธนธัญญา, 2547) นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานว่า capsaicin มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *C. tetani* และ *S. pyogenes* (Robert, 1996) ส่วนข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารอื่นที่พบในพริกขี้หนูนั้นยังไม่มีมากนัก ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะสรุปว่าการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae* โดยผงพริกขี้หนูบดละเอียด และสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูเป็นผลมาจาก capsaicin เพียงอย่างเดียว หรือเป็นผลของ capsaicin ร่วมกับสารอื่น หรือเป็นผลมาจากสารอื่นที่ไม่ใช่ capsaicin หากต้องการทราบข้อมูลที่แท้จริงจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป เช่น โดยการแยกส่วนต่าง ๆ จากผงพริกขี้หนูบดละเอียด และสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูโดยวิธี gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) จากนั้นนำสารที่แยกได้แต่ละชนิดมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. agalactiae*



ภาพที่ 15 สูตรโครงสร้างของ capsaicin สารต่อต้านจุลินทรีย์ในพริกขี้หนู (Cowan, 1999)

ฝรั่ง (*P. guajava*) เป็นพืชที่อยู่ใน Family Myrtaceae เช่นเดียวกับ กานพลู (*Syzygium aromaticum*) ออลสไปซ์ (allspice, *Pimenta officinalis*) และยูคาลิปตัส (eucalyptus, *Eucalyptus globulus*) เป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกากลาง แต่ปัจจุบันนี้มีการปลูกกันทั่วไป โดยเฉพาะในประเทศที่มีอากาศร้อนชื้น และอบอุ่น ส่วนใหญ่มักปลูกไว้เพื่อรับประทานเป็นหลักโดยอาจใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร และของหวาน ฝรั่งมีสรรพคุณทางยามากมาย และเคยมีรายงานการใช้ในการรักษาโรค และอาการต่าง ๆ เช่น การอักเสบ (inflammation) มาลาเรีย (malaria) เนื้องอก (tumor) การแพ้

(allergy) น้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) แผล (wounds) ไอ (cough) และโรคฟัน (dental disease) (สุนทรี สิงหบุตร, 2554) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฝรั่ง โดยเฉพาะส่วนใบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 14174, *Flavobacterium columnare* ATCC 23463, *Lactococcus garvieae* ATCC 49156, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio salmonicida* ATCC 43839, *Bacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* (Rattanachaikunsopon and Phumkhachon, 2007, 2010e)

ในอดีตที่ผ่านมามีงานวิจัยจำนวนมาก ที่ทำการศึกษาเพื่อหาว่าสารใดในใบฝรั่งที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของใบฝรั่ง Belemtougri et al. (2006) รายงานว่าจากการตรวจสอบชนิดของสารที่พบในสารสกัดเอทานอลของใบฝรั่ง พบว่า มีสารหลายชนิด ได้แก่ anthocyans, alkaloids, flavonoids, tannins และ terpenoids ซึ่งในบรรดาสารเหล่านี้มีเพียงสารในกลุ่ม flavonoids ซึ่งได้แก่ morin, morin 3-*O*-lyxoside, morin-3-*O*-arabinoside, quercetin และ quercetin-3-*O*-arabinoside เท่านั้นที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ Belemtougri et al. (2006) ใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียก่อโรคปลาต่าง ๆ เช่น *A. hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *F. columnare*, *L. garvieae*, *S. agalactiae* และ *V. salmonica* นอกจากนี้ยังมีรายงานที่สนับสนุนว่าสารในกลุ่ม flavonoids ทั้ง morin, morin 3-*O*-lyxoside, morin-3-*O*-arabinoside, quercetin และ quercetin-3-*O*-arabinoside มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดย Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010e) รายงานว่าสารดังกล่าวทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคคน และเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta* และ *Pseudomonas fluorescences* อย่างไรก็ตามยังมีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าสารอื่น ๆ ที่พบในฝรั่งนอกเหนือจาก flavonoids ก็มีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น alkaloids, anthocyans,tannins และ terpenoids จากข้อมูลข้างต้นอาจสรุปได้ว่าความสามารถของใบฝรั่งบด และสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* น่าจะเกิดจากผลร่วมกันของสารหลาย ๆ ชนิด อย่างไรก็ตามหากต้องการทราบข้อมูลที่ชัดเจนจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป เช่น โดยการแยกส่วนต่าง ๆ จากใบฝรั่งบด และสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่ง โดยวิธี gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) จากนั้นนำสารที่แยกได้แต่ละชนิดมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila*

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าการนำพริกขี้หนูบดละเอียด และสารสกัดเมทานอลของพริกขี้หนูไปผสมในอาหารเลี้ยงปลาช่วยทำให้อัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* ลดลง และการนำใบฝรั่งบดละเอียด และสารสกัด 95% เอทานอลของใบฝรั่งไปผสมในอาหารเลี้ยงปลาช่วยทำให้อัตราการตายของปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* ลดลง โดยผลการทดลองดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการใช้อาหารที่ผสมด้วยยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างมากในการนำสมุนไพรทั้งสองชนิดดังกล่าวมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคในปลานิล

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กรมการศึกษานอกโรงเรียน กระทรวงศึกษาธิการ. ชุดวิชาการเพาะพันธุ์ปลานิลหมวดเกษตรกรรม. กรุงเทพมหานคร : บริษัทต้นอ้อแกรมมี่จำกัด, 2541.

กรมประมง. การเลี้ยงปลานิลในกระชัง. ฝ่ายเผยแพร่ กองส่งเสริมการประมง กรมประมง : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545.

กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ. "ผลของสมุนไพรไทยต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค การเจริญเติบโตสุขภาพและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ", วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สงขลานครินทร์. 27 : 55-70, 2548.

กุศล คำเพราะ และวรรณพร คำเพราะ. "การใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรเพื่อทดแทนปฏิชีวนะสารคลอเตตร้าซัยคลินในอาหารไก่เนื้อ", วารสารสัตว์เศรษฐกิจ. 12 : 14-20, 2537.

กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2552.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. "กระเทียม", ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร. http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=8. สิงหาคม, 2554.

คณิต สุวรรณบริรักษ์ และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธิ์. "น้ำลายพังพอน ฟ้าทะลายโจร". วารสารสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย. 7 (1) : 3-9, 2534.

จริยา สินเติมสุข สมเกียรติ ตีกิจเสริมพงศ์ และวีณา จารุปรีชาชาญ. "เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงเบาหวาน ใบฝรั่ง และเปลือกมังคุด". วารสารเภสัชศาสตร์. 16 (2) : 32-35, 2532.

จิติวัฒนา เหล็งบำรุง. ประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium resenbergii* de Man) เพื่อยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน), 2550.

จำรัส เซ็นนิล. "สมุนไพรบำบัดปลาเป็นแผล", รวบรวมผลงานและการทำงานของจำรัส เซ็นนิล. http://www.jamrat.net. สิงหาคม, 2554.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. โรคปลา (Fish Diseases). กรุงเทพมหานคร : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2528.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ชาลี ทองเรือง. "การชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงและการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพ ของสารสกัดจากรากเพาะเลี้ยงมะระขี้นก", ฐานข้อมูลการเกษตรของประเทศไทย. http://pikul.lib.ku.ac.th/cgi-bin/. สิงหาคม, 2554.

ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ. "ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli", วารสารสงขลานครินทร์. 27(1) : 235-244, 2548.

ทิพวัลย์ เลี้ยงบุญเลิศชัย และสุมาลี เหลืองสกุล. "ฤทธิ์ของสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย", วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 4 (3) : 128-135, 2531.

ทีมงานบ้านวัวดี. "โรคเต้านมอักเสบในโค", บ้านวัวดี.คอม. http://wuadee.com/forum/read.php?fid=18. สิงหาคม, 2554.

ทีมงานรักบ้านเกิด. "รักษาโรคปลาหรือกบเป็นแผล", รักบ้านเกิด.คอม. http://www.rakbankerd.com/. สิงหาคม, 2554.

_____. "โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย", รักบ้านเกิด.คอม. http://www.rakbankerd.com/. สิงหาคม, 2554.

ทีมงานสมุนไพรไทยภูมิปัญญาไทย. "กะเม็ง", สมุนไพรไทยภูมิปัญญาไทยอนุรักษ์ไว้เพื่อคนไทยทั้งชาติ. http://www.samunpri.com/herbs/?p=86. สิงหาคม 2554.

ทีมงานศูนย์รวมผลิตภัณฑ์คุณภาพและความงาม ออนไลน์. "ข้อมูลทางวิชาการ พืชสมุนไพรบอระเพ็ด", ศูนย์รวมผลิตภัณฑ์คุณภาพและความงาม ออนไลน์, http://www.gooherb.com/article?id=22495&lang=th. สิงหาคม, 2554.

ธิดารัตน์ ปลื้มใจ. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้าทะลายโจร. กรุงเทพมหานคร : กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2534.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2544.

นรสิงห์ เพ็ญประไพร. สารสกัดจากใบยางพาราในการควบคุมการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila*. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง : สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตตรัง, 2545.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

นเรศ ช่วนยุก และคณะ. "โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)". วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสงขลานครินทร์. 27 : 307 – 319, 2548.

นันทวัน บุณยประภัศร. ก้าวไปกับสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2535.

ปณรัตน์ ผาดี. โรคและการวินิจฉัยโรคปลา. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2552.

ประสิทธิ์ อัศวโภคี. "โรคติดเชื้อแอร์โรโมนาส ไฮโดรฟิลาในคน : ผลการศึกษา พ.ศ. 2521-2526", ใน บทคัดย่อประชุมวิชาการเรื่องโรคระบาดในน้ำจืด พ.ศ. 2525-2526. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2526.

ประวิตร พิศาลบุตร. "โรคผิวหนังหน้าฝน", นิตยสารหมอชาวบ้านออนไลน์. http://www.inderm.go.th/inderm_sai/skin/skin79.html. สิงหาคม 2554.

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. "การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา". วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553.

ภัทริดา โปฏก และคณะ. "ผลของการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)", ใน การประชุมทางวิชาการด้านการประมงครั้งที่ 49 วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2554.

ภิรัตน์ มั่นใจอางค์. การทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน), 2552.

มาลิน จุลศิริ และคณะ. "สารสกัดสมุนไพรเพื่อรักษาโรคอุจจาระร่วง ผลต่อเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง", วารสารสาธารณสุขศาสตร์. 16 (1) : 21-35, 2529.

รัดชนก ศิริคะรินทร์. การพิสูจน์ทราบการติดเชื้อแบคทีเรียของไรน้ำนางฟ้าไทย (*Brachinella thailandensis*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2553.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ร่วมฤดี พานจันทร์ พงษ์กฤษณ์ ศิริสรณ์ และสมวิทย์ ผาพรม. ฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่แยกได้จากปลาดุกลูกผสม. สาขาวิชาประมง คณะทรัพยากรธรรมชาติ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร, 2553.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล และคณะ. สมุนไพรยาไทยที่ควรรู้. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ศักดิ์โสภาการพิมพ์, 2545.

ลิลา เรืองแป้น. "ปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง", วารสารการประมง. 55 (3) : 203-208, 2545.

วรวุฒิ เจริญศิริ. "เชื้อสเตร็ปโตคอคคัส Group B", ศูนย์สุขภาพ Bangkok health. http://www.bangkokhealth.com/index.php/. สิงหาคม, 2554.

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์ ทินวรรธน์ ศรีสุข และวรวิทย์ วัชชวัลคุ. "ประสิทธิภาพของวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล", วารสาร KKU. Vet. J. 17 (1), 2550.

ศุภยางค์ วราวุฒิคุณชัย และหลิน กิจพิพิธ. "ฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อ clinical isolates ของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", วารสารสงขลานครินทร์. 27 (1) : 222-234, 2548.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์, 2536.

สถาพร คิเรกบุษราคม และคณะ. "ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ", ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539. กรมประมง : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2539.

สุดเหมือนฝัน ธนธัญญา. "รู้ไหม ยาอะไรเอ่ย ใช้รักษาอาการปวดที่เท้าอันเนื่องมาจากปลายประสาทอักเสบ", นิตยสารหมอชาวบ้าน. 297, 2547.

สุนทรี สิงหบุตร. "สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด", โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herb1.htm. สิงหาคม, 2554.

สุธา วัฒนสิทธิ์ ยุทธนา ศิริวัธนานุกูล และอรุณพร อิฐรัตน์. "ผลของการเสริมฟ้าทะลายโจรและใบฝรั่งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่กระทง", วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสงขลานครินทร์. 27(1) : 587-596, 2548.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สุปราณี พึ่งแพง. ผลของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน), 2550.

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. "ข่า", ฐานข้อมูลสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน. http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp. สิงหาคม, 2554.

สำนักงานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. การชันสูตรโรคสเตรปโทคอกคัสในปลานิล. กรุงเทพมหานคร : มาตรฐานสินค้าเกษตร ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 127 ตอนพิเศษ 150 ง วันที่ 28 ธันวาคม พุทธศักราช 2553, 2553.

หิรัญ กังแฮ. โรค streptococcus ในปลานิลแดงแปลงเพศและผลของสารสกัดสมุนไพร 19 ชนิดในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2548.

อัญชลี ธำมรงค์ดงสถิต และจิราพร โรจน์ทินกร. "ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)", วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 2, 2550.

อรุณี สาระยา มาลิน จุลศิริ และจิตต์กวี ปวโร. "สารต้านเชื้อ Pseudomonas ที่สกัดได้จากผลมะระ", วารสารเภสัชศาสตร์. 12 (3) : 69-73, 2528.

Abuseliana, A. F., Hassan H.M.D., Saleha A. A., Siti K. B. and Milud A. "Pathogenocity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to Juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.)", Journal of Animal and Veterinary Advances, 10: 914-919, 2011.

Alderman , D.J. and Hastings T.S. "Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks", International Journal of Food Science &Technology. 33: 139-155, 1998.

Al-Harbi, A.H. and Uddin N. "Bacterial diversity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia", Aquaculture. 250: 566-572, 2005.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Alsaid, M., Hassan, D., Siti, K.B. and Ali, A. "Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic uses to prevent Streptococcal infection in Red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.)", World Journal of Fish and Marine Sciences. 2: 532-538, 2010.

American Association of Bovine Practitioner. "*Streptococcus agalactiae* Fact Sheet", http://www.aabp.org/about/strep.pdf. August, 2011.

Ardo, L., Guojun, Y., Pao, X., Laszlo, V., Gabor, S., Zsigmond, J. and Galina, J. "Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*", Aquaculture. 275: 26-33, 2008.

Atal, C.K. "Chemistry of some biological active Indian medicinal plants", In Proceeding of the Indian Natural Science Academy. 48: 99-121, 1982.

Atlas, R.M. Handbook of Microbiology Media. Boca Raton: CRC Press, 1993.

Belemtougri, R. G., Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G., and Sawadogo, L. "Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture", Journal of Zhejiang University Science. 7: 56-63, 2006.

Brown, J. "Antibiotics: their use and abuse in aquaculture", Journal of World Aquaculture. 20 (2): 34-43, 1989.

Caceres, A., Figueroa L., Taracena A.M. and Samayoa, B. "Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory disease 2. Evaluation of activity of 16 plants against gram positive baeteria", Journal of Ethnopharmacology. 39 (1): 7-82, 1993.

Cai,W.Q., Li, S.F. and Ma, J.Y. "Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia X male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*", Aquaculture. 229: 79-87, 2004.

Cichewicz, R.H. and Thorpe, P.A. "The antimicrobial properties of chilies peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine", Journal of Ethnopharmacology. 52: 61-70, 1996.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Citarasu, T. "Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry", Aquaculture International. 18 (3): 403-414, 2010.

Chen, H., Chang, M. and Chang, T. "Antibacterial properties of some spice plants before and after heat treatment", Chinese Journal of Microbiology and Immunology. 18: 190-195, 1985.

Christian, J. W. "*Streptococcus Group B Infections*". Medscape Reference Drug, Diseases & Procedures. Available. http://emedicine.medscape.com/article/229091-overview. http://emedicine.medscape.com/article/229091-overview. August, 2011.

Cordel, G.A. and Araujo, O.E. "Capsaicin: Identification, nomenclature, and pharmacotherapy", The Annals of Pharmacotherapy. 27 (3): 330-336, 1993.

Cowan, M.M. "Plant products as antimicrobial agents", Clinical Microbiology Reviews. 12 (4): 564-582, 1999.

Daskalove, H. "The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety", Journal of Food Control. 17: 474-483, 2006.

Emel, A., Pinarbasi, B., Akyuz, F., Ibrisim, D., Kaymakoglu, S. and Mungan, Z. "A case of *Aeromonas hydrophila* enteritis in the course of ulcerative colitis", European Journal of Internal Medicine. 18: 430-431, 2007.

Galina, J., Yin, G., Ardo, L. and Jeng, Z. "The use of immunostimulating herbs in fish: An overview of research", Journal of Fish Physiology and Biochemistry. 35 (4): 669-676, 2009.

Gul, N., Mujahid, T.Y., Jehan, N. and Ahmad, S. "Studies on the antibacterial effect of different fractions of *Curcuma longa* against urinary tract infection isolates", Pakistan Journal of Biological Sciences. 7: 2055-2060, 2004.

Hussain, H.S.N. and Deeni, P.P. "Plants in Kano ethomedicine: screening for antimicrobial Activity and alkaloids", International Journal of Pharmacology. 34: 87-90, 1991.

Inglis,V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. Bacterial Disease of Fish. New York, U.S.A: Academic press. 1993.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Institut Pasteur. "*Scanning Electron Microscopy*", http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/en/research/plates-formes technologiques. August, 2011.

Joyce, J.E., Phillip, H.K., David, J.P. and John, F.B. "Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Emerging Infectious Diseases. 15: 774-776, 2009.

Kitao, T. "The methods for detection of Streptococcus sp., causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Especially, their cultural, biochemical and serological properties", Journal of Fish Pathology. 17: 17-26, 1982.

Kumar, S., Narain, U., Tripathi, S., and Misra, K. "Syntheses of curcumin bioconjugates and study of their antibacterial activities against β-lactamase producing microorganisms", Journal of Bioconjugate Chemistry. 2 (4): 464 – 469, 2001.

Kummee, S., Ongsakul, M., Supavita, T. and Pungrasamee, P. "Antibacterial activity of some medicinal plants against *Shigella* spp", In 28th Congress on Science and Technology of Thailand. 418, 2002.

Kuniko, K., Shoko, K., Atsushi, N., Masahiro, K., Yuji, N., Toshinobu, A., Makoto, Y. and Kohtaro, K. "Novel substrate specificity of glutathione synthesis enzymes from *Streptococcus agalactiae* and *Clostridium acetobutylicum*", Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. 352: 351-359, 2007.

Maria, E. J., Elizabeth, F. and Claudia, S. "Inhibition of growth of someborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum*", International Journal of Food Microbiology. 57: 125-128, 2000.

Mars, A. Api 20E Analytical Profile Index. Marcy-l' Etoile: Biomerieux S.A., 1994.

Microbe Wiki. "*Aeromonas*", Microbe Wiki Kenyon College. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aeromonas. August, 2011.

Microbiologyinthepictures. "*Streptococcus agalactiae*", Microbiology In The Pcitures. http://www.microbiologyinpictures.com/streptococcus%20agalactiae.html. August, 2011.

Mike, M. "*Streptococcus agalactiae*", Milk Money Fact Sheet 02 ; Resources Milk Money: Pamela Ruegg. 2005.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mtambo, M.M.A., Mushi E.J., Kinabo L.D.B., Maeda-Machang A., Mwamengele G.L.M., Yongolo M.G.S. and Temu R.P.C. "Evaluation of the efficacy of the crude extracts of *Capsicum frutescens, Citrus limon* and *Opuntia vulgalis* against Newcastle disease in domestic fowl in Tanzania". Journal of Ethnopharmacology. 68: 51-61, 1999.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M. and Flanagan, JA. "When east meets west the relationship between *ying-yang* and antioxidation-oxidation", The FASEB Journal, 17 : 127-129, 2003.

Pachanawan A., Phumkhachorn P. and Rattanachaikunsopon P. "Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Journal of Biotechnology and Bioengineering. 106 (5): 419-422, 2008.

Popma, T.J. and Lovshin, L.L. Worldwide prosoects for commercial production of Tilapia. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Department of Fisheries and Allied Aquaculture Auburn University : Alabama, 1995.

Rao,V.Y., Basanta, K.D., Jyotyrmayee, P. and Rina, C. "Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*", Journal of Fish & Shellfish Immunology. 20: 263-273, 2006.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens", Fitoterapia. 78: 434-436, 2007.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Prophytic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Journal of Biotechnology and Bioengineering. 107 (5): 579-582, 2009a.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Protective effects of clove oil supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in tilapia", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 73 (9): 2085-2089, 2009b.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Potential of Chinese chive oil as a natural antimicrobial for controlling *Flavobacterium columnare* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Fisheries Science. 75: 1431-1437, 2009c.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn P. "Use of *Centella asiatica* aqueous extract as bath treatment to control columnaris in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Journal of Aquatic Animal Health. 75: 1431-1437, 2010a.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil in controlling *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Fisheries Science. 76: 287-293, 2010b.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Effect of *Cratoxylum formosum* on innate immune response and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", Fisheries Science. 76: 653-659, 2010c.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda in vitro* and in tilapia (*Oreochromis niloticus*)",African Journal of Microbiology Research. 4: 420-425, 2010d.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. "Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*", Journal of Medicinal Plants Research. 4: 393-396, 2010e.

Reed, L.J. and Muench, H. "A simple method of estimating fifty percent endpoints", The American Journal of Hygiene. 27: 493–497, 1938.

Robert, H.C. and Patrick, A.T. "The antimicrobial properties of chili peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine", Journal of Ethnopharmacology. 52: 61-70, 1996.

Rodina, A.G. Method in aquatic microbiology. Balltimore: University Park Press., 1972.

Scinecephotolibrary. "*Aeromonas hydrophila* Bacteria", Science Photo Library. http://www.sciencephotolibrary.com. August, 2011.

Sivaram, V., Babu, M.M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass, S. and Marian, M.P. "Growth and immune respone of juvenile greasy groupers (*Einephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principal supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections", Aquaculture. 237: 9-20, 2004.

Surh, Y.J. and Lee, S.S. "Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential", Journal of Life Sciences. 56: 1845-1855, 1995.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Swagatika S., Basanta, K.D., Jyotirmayee, P., Mohapatra, B.C., Mishra B.K. and Niranjan, S. "Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. " Journal of Fish & Shellfish Immunology. 23: 109-118, 2007.

The Journal of Undergraduate Biology Studies. "Pathogen Profile Dictionary ; *Streptococcus agalactiae*", Viruses Bacteria Fungi Protozoans & Helminth Parasites. http://ppdictionary.com/bacteria/gpbac/agalactiae.htm. August, 2011.

Toranzo, A.E., Magarinos, B. and Romalde, J.L. "A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems", Aquaculture. 246: 37-61, 2004.

Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T. and Thubthimthed, S. "Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants", Fitoterapia. 76: 233-236, 2005.

Wikipedia The Free Encyclopedia. "*Aeromonas hydrophila*", http://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas_hydrophila. August, 2011.

Wikipedia The Free Encyclopedia. "*Streptococcus agalactiae*", http://en.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_agalactiae. August, 2011.

Zamri-Saad, M., Amal, M.N.A. and Siti-Zahrah, M.N.A. "Pathological changes in red Tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*", Journal of Comparative Pathology. 143: 227-229, 2010.

Ziya, I., Timur, G. and Abdülbaki, A. "*Aeromonas hydrophila* associated with ovine abortion", Journal of Small Ruminant Research. 61: 73-78, 2006.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ประกอบด้วย

Brain extract	7.8	กรัม
Heart extract	9.7	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Dextose	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Thiamine hydrochloride	0.1	มิลลิกรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ประกอบด้วย

Brain extract	12.5	กรัม
Heart extract	5.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Dextose	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Thiamine hydrochloride	0.1	มิลลิกรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

สีย้อมแบคทีเรีย

สีย้อมแกรม (gram strain) โดยวิธี Hucker modification of gram method (Rodina, 1972)

1. Crystal violet

- crystal violet	2	กรัม
- ammonium oxalate	0.8	กรัม
- ethyl alcohol (95%)	20	มิลลิลิตร
- distilled water	80	มิลลิลิตร

ทำการผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานควรเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

2. Lugol solution

- crystalline violet	1	กรัม
- potassium iodine	2	กรัม
- distilled water	80	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วคนสารให้ละลายเข้าด้วยกัน แล้วนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

3. Safranin solution

เตรียม stock safranin 2.5% โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

วิธีการย้อมสีแกรม

นำเชื้อมาเกลี่ย (smear) บาง ๆ ลงบนสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปผ่านเปลวไฟ (fixed) เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับสไลด์ แล้วหยด crystal violet ให้ท่วม วางทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาประมาณ 2 วินาที หยด logol solution ทิ้งไว้ 1 นาที ทำการล้างสี (decolorized) ด้วย 95% เอทานอล 30 วินาที รีบล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสี safranin ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ที่กำลังขยาย 100 เท่า ผลการทดสอบ คือ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

วิธีการฉีดสารเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal administration) ของปลาทดลอง

เป็นวิธีที่จะทำได้ง่ายและปลอดภัยกว่า การฉีดเข้าเส้นเลือด และทำได้กับปลาทุกขนาด แต่จะได้ผลดีถ้าหากการฉีดไม่แทงเข้าไปในอวัยวะภายใน เช่น ตับ ม้าม หรือไต แต่ก็ไม่เหมาะหากมีปลาจำนวนมาก ควรใช้เข็มขนาดเล็กแทงเข้าไปใต้เกล็ด ช่องท้องผ่านผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อความลึกประมาณพอดีกับชั้นของผนังช่องท้อง หากปลามีอาการหนักแล้ว ก่อนฉีดควรทำให้สลบเสียก่อน เว้นแต่ผู้ฉีดมีประสบการณ์สูง ปริมาณสารละลายที่จะฉีดขึ้นกับขนาดของปลา แต่สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ปริมาณยา วิธีนี้ควรระวังการนำเชื้อจากปลาตัวหนึ่งสู่อีกตัวหนึ่ง จึงต้องใช้เข็มและกระบอกฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

การเตรียมการทดสอบด้วยชุดทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสและแบคทีเรียแอโรโมแนสทางชีวเคมี (Api 20 Strep) และอาหารทดสอบอื่น ๆ (Atlas, 1993; Mars, 1994)

API 20 Strep (Biomerieux) เป็นชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถทดสอบคุณสมบัติทั้งหมดได้ 20 คุณสมบัติ คือ acetone production (AP) hydrolysis (HIP), β-glucosidase (ESC), Pyrrolidonyl arylamidase (PYRA), α-galactosidase (α GAL), β-glucuronidase (β GUR), β-galactosidase (β GAL), alkaline phosphatase (PAL), leucine arylamidase (LAP), arginine dihydrolase (ADH), ribose (RIB), L-arabinose (ARA), mannitol (MAM), sorbital (SOR), lactose (LAC), trehalose (TRE), inulin (INU), raffinose (RAF), starch (AMD) และ glycogen (GLYG)

วิธีการทดสอบ โดยเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัสให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 แล้วใช้ไมโครปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายเชื้อใส่ลงใน ช่องต่าง ๆ จนเรียบร้อย และนำแถบ API มาใส่ในถาดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายรีเอเจนต์ แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจผล หลังจากได้ผลแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API test เพื่อที่จะแยกเชื้อ

ภาคผนวก ข
ข้อมูลประกอบผลการวิจัย

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี swab paper disc assay

ชนิดสารสกัดสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition zones; mm)				
	เฮกเซน	เมทานอล	เอทานอล 95%	เอทิลอะซิเตท	น้ำกลั่น
บอระเพ็ด	-	5.90±2.78	8.51±2.14	9.18±2.43	-
บัวบก	-	4.80±2.96	9.52±2.97	2.66±1.49	-
ฝรั่ง	6.07±0.25	19.38±2.06	23.88±1.97	19.84±1.70	5.63±0.13
ฟ้าทะลายโจร	4.37±2.73	1.31±0.73	16.80±2.02	12.96±2.07	3.33±1.13
กะเม็ง	-	4.59±1.27	8.33±1.59	17.69±2.94	-
ขมิ้นชัน	8.23±2.15	2.78±1.29	18.46±2.10	-	-
กระเทียม	-	8.90±1.98	16.36±2.68	21.00±2.54	9.63±1.43
ลูกใต้ใบ	-	8.88±1.83	18.33±2.19	6.47±1.03	-
มังคุด	18.46±4.10	11.46±2.51	16.46±2.15	7.59±2.89	5.89±2.27
มะระขี้นก	-	7.94±2.46	8.72±2.99	16.72±2.69	-
น้ำนมราชสีห์	-	7.14±1.23	17.20±1.50	6.11±1.25	-
พริกขี้หนู	19.66±1.98	28.60±0.35	26.35±0.50	18.94±1.83	9.56±2.81
ส้มเขียวหวาน	16.64±1.46	8.80±1.96	9.80±2.36	7.80±1.02	-
ทับทิม	-	17.70±1.89	22.20±1.00	13.80±0.69	-
ชุดควบคุม (ตัวทำละลาย)	-	14.40±1.19	16.60±1.81	12.00±0.87	-

หมายเหตุ - ไม่แสดงผลการยับยั้งต่อเชื้อ

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ของสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี swab paper disc assay

ชนิดสารสกัดสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition zones; mm)		
	น้ำ	เอทานอล 95%	อีเทอร์
บอระเพ็ด	-	-	-
บัวบก	-	-	15.6±1.4
ชุมเห็ดเทศ	-	-	15.2±1.5
ฝรั่ง	16.9±0.6	20.1±0.7	18.2±1.6
ฟ้าทะลายโจร	14.6±1.1	15.5±0.9	15.2±1.3
ข่า	-	-	-
กานพลู	-	10.1±2.1	12.9±0.9
กระชาย	-	-	13.1±1.3
กะเพรา	-	9.8±0.9	6.6±1.2
กระเทียม	6.9±2.2	15.1±2.9	13.9±1.1
มังคุด	13.3±1.4	17.6±1.2	15.9±1.5
มะระขี้นก	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-
ทับทิม	-	13.4±2.0	-
ชุดควบคุม	-	7.6±1.0	-

หมายเหตุ - ไม่แสดงผลการยับยั้งต่อเชื้อ

ตารางที่ 12 สารเคมีสำคัญที่พบในสมุนไพร 20 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค

สมุนไพร	สารเคมีสำคัญ	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค	อ้างอิง
บอระเพ็ด	picroretine, berberine, colonbin, tintotuberide	*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*	ศูนย์รวมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงามออนไลน์ (2554)
บัวบก	asiaticoside centelloside, brahmic acid,	*Flexibacter columnaris*	Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010a)
ฝรั่ง	caryophyllene cincol, tannin, sesquiter penoids, triterpenoid compounds	*Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*	Caceres et al. (1993)
ฟ้าทะลายโจร	lactone	*Streptococcus agalactiae*	Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2009a)
กะเม็ง	coumestan derivative wedelolactone	-	-
ขมิ้นชัน	diferuloyl methane	*Streptococcus pyogenes*	Gul et al. (2004)
กระเทียม	allicin, ajoene, allin, diallyl disulfide, allyl disulfide	*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* *Shigella sonnei*	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (2554)
ลูกใต้ใบ	potassium, phyllanthin, hypophyllanthin	*Shigella* sp.	Kummee et al. (2002)
มังคุด	tannin, catechin, anthocyanin, xanthones	*Streptococcus aureus*	ศุภยางค์ วราวุฒิคุณชัย และหลิน กิจพิพิธ (2548)

ตารางที่ 12 สารเคมีสำคัญที่พบในสมุนไพร 20 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค (ต่อ)

สมุนไพร	สารเคมีสำคัญ	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค	อ้างอิง
มะระขี้นก	charanthin,serotonin, momordicine	*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*	ชาลี ทองเรือง (2554)
น้ำนมราชสีห์	flavoniods, tannin, sterol, saponin, triterpenoid	*Streptococcus* sp.	Hussain and Deeni (1991)
พริกขี้หนู	capsaicin	*Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*	Mtambo et al. (1999) Robert (1996)
ส้มเขียวหวาน	citral, geranitol, linalool	-	-
ทับทิม	flavonoid, tannin, sterol, triterpenes	Gram-negative bacilli	ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ (2548)
ชุมเห็ดเทศ	anthraquinone, flavonoid	-	-
ข่า	eugenol	*Escherichia coli* *Microsporum gypseum*	สำนักงานข้อมูลสมุนไพร มหาวิทยาลัยมหิดล (2554)
กานพลู	eugenol, acetyleugenol sesquiterpene	*Streptococcus faecalis*	หิรัญ กังแฮ (2548)
กระชาย	alpinetin, pinocembrin	-	-
กะเพรา	ocimol, eugenol, linalool methyl chavicol	*Vibrio harveyi*	Sivaram et al. (2004)
ตะไคร้	citral	*Salmonella* spp., *E. coli* *Clostridium peringens*	Wannissorn et al. (2005)

ภาคผนวก ค
ผลงานวิชาการเผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ

JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING
Vol. 106, No. 5, 419–424. 2008
DOI: 10.1263/jbb.106.419

©2008, The Society for Biotechnology, Japan

Potential of *Psidium guajava* Supplemented Fish Diets in Controlling *Aeromonas hydrophila* Infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Adithepchaikarn Pachanawan,[1] Parichat Phumkhachorn,[1] and Pongsak Rattanachaikunsopon[1]*

Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand[1]

Received 27 May 2008/Accepted 12 July 2008

Fourteen herbs were extracted in water, 95% ethanol, and ether, and tested *in vitro* for antimicrobial activities against *Aeromonas hydrophila*, a fish pathogen causing motile Aeromonas septicemia. Using swab paper disc assays and minimal inhibitory concentration (MIC) determinations, we noted that the ethanol extract of *Psidium guajava* leaf exhibited the strongest antimicrobial activity. The extract allowed growth-inhibited *A. hydrophila* cells to regrow in fresh BHI broth indicating a bacteriostatic mode of action. In a pathogenicity test, the median lethal dose (LD_{50}) of *A. hydrophila* for tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal injection was 3.44×10^6 CFU/ml. *In vivo* experiments showed that fish diets containing either dry leaf powder of *P. guajava* or dried ethanol extract of *P. guajava* leaf reduced mortality of *A. hydrophila* infected tilapia with no detected adverse effect on the fish. This study suggests that *P. guajava* leaf has the potential to control fish diseases caused by *A. hydrophila*.

[**Key words:** *Psidium guajava*, *Aeromonas hydrophila*, motile Aeromonas septicemia, antimicrobial activity, tilapia]

Species of *Aeromonas* are short, gram-negative, facultatively anaerobic, non-spore-forming, motile bacilli with a single flagellum, and can ferment glucose with or without the production of gas. They are 0.3–1.0 μm in diameter and 1.0–3.5 μm in length. They occur ubiquitously and autochthonously in aquatic environments. The genus *Aeromonas* is within the family *Aeromonadaceae*, which comprises of 14 different species (1); among which, *Aeromonas hydrophila* is known to infect fish, reptiles, amphibians (2), and humans (3). Some diseases caused by *A. hydrophila* can spread from animals to humans and vice versa.

A. hydrophila is a major cause of bacterial infections affecting warm water fish such as carp (*Cyprinus carpio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), striped bass (*Morone saxatilis*), largemouth bass (*Micopterus salmoides*), and tilapia (*Oreochromis niloticus*). It can cause motile Aeromonas septicemia (MAS) in fish, both in commercial production systems and in natural waters. MAS is stress-related, and conditions such as poor water quality, overcrowding, and rough handling make fish more susceptible to the bacteria. Infected fish frequently exhibit small pinpoint hemorrhages at the base of fins or on the skin, distended abdomens, and protruding eyes. Internal signs include fluid in the abdomen, swollen liver and spleen, and distended and fluid filled intestines. The disease can produce significant losses in the aquaculture industry because of reduced growth and unmarketable appearance of infected fish. When virulent strains of *A. hydrophila* become endemic in a fish population, introducing new fish into the water body without significant mortalities is difficult.

Currently, bacterial infections in aquaculture, including MAS, are mainly controlled by antibiotics. However, recently, the use of antibiotics in aquaculture has received considerable attention because their use can lead to the development of drug resistant bacteria, thereby reducing drug efficacy. Moreover, the accumulation of antibiotics both in the environment and in fish can be potentially risky to consumers and the environment (4). To alleviate such problems, use of so-called environment friendly, natural products has been considered as an alternative to control bacterial infections in aquaculture. Some herbs are reported to have antimicrobial activity against several pathogenic bacteria and have been used as traditional medicines for the treatment of human diseases. Recently, they have been used as to control diseases in animals, including fowl (5), calves (6), and tilapia (7, 8). In this study, we tested several herbs for antimicrobial activity and mode of action against *A. hydrophila*. This work also describes the use of fish diets supplemented with *Psidium guajava* leaf as a treatment against *A. hydrophila* infections in tilapia, one of the most cultured fish species in Thailand with a high incidence of *A. hydrophila* infection.

* Corresponding author. e-mail: rattanachaikunsopon@yahoo.com
phone/fax: +66-45-288-380

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions The *A. hydrophila* used in this study was isolated from diseased tilapia naturally occurring in the Moon River, Ubon Ratchathani Province, Thailand. *A. hydrophila* was grown in brain-heart infusion (BHI) broth and agar at 30°C. The bacterial stock was stored as a frozen culture at −20°C in BHI broth containing 20% glycerol (v/v) until use.

Preparation of herb extracts The 14 herbs used in this study are listed in Table 1. They were oven dried at 70°C for 72 h and then powdered. Extracts of the powdered herbs were prepared using water, 95% ethanol, or ether as solvents at ratios of 1 : 10 (w/v). The extractions were carried out at room temperature for 24 h. The extracts obtained were centrifuged at 13,000 rpm at room temperature for 15 min and the supernatants stored at −20°C until use. Concentration of each extract (mg/ml) was determined from dry weight of 100 ml of the extract and was adjusted to 0.1 mg/ml.

Detection of antimicrobial activity of herb extracts against *A. hydrophila* A swab paper disc method (9) with some modifications was used to detect antimicrobial activity of herb extracts against *A. hydrophila*. Bacterial colony forming units (CFU) (10^8/ml) were spread with a sterile swab on BHI agar plates. Sterile filter paper discs (Schleicher & Schuell, NH, USA), 6 mm in diameter, were placed on the surface of the agar plates containing the tested strain. Twenty microliters of the extracts were dropped separately on the paper discs. Oxytetracyline (20 μg/ml) was used as a positive control and the solvent of each extract (20 μl) was used as a negative control. The plates were incubated at 30°C for 24 h, after which the zones of bacterial growth inhibition (diameters) around the paper discs were measured. Growth inhibition diameter in the negative control treatment was subtracted with the remainder representing the zones of growth inhibition. When no growth inhibition in negative control treatment was observed, the diameter of the disc was subtracted. Every experiment was carried out five times. Inhibition zones > 15 mm were categorized as strong activity, from 10–15 mm as moderate activity, and < 10 mm as weak activity.

Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) Each herb extract with an initial concentration of 0.1 mg/ml was subjected to twofold serial dilution. One hundred microliters of each dilution were added to 4.9 ml of *A. hydrophila* culture (10^3 CFU/ml). The mixture was incubated at 30°C for 24 h. The MIC value of each extract (μg/μl) represented the lowest concentration of the extract showing definite inhibition of the tested strain. The MIC value of oxytetracycline was also determined. The average MIC was determined from the results in five experiments.

Examination of mode of action The extract exhibiting the strongest antimicrobial activity against *A. hydrophila* was used in this experiment. The herb extract (at a final concentration equal to the MIC value) was added to 4.9 ml of *A. hydrophila* culture (10^3 CFU/ml). After incubation at 30°C for 24 h, 100 μl of the mixture was inoculated into 4.9 ml of fresh BHI broth. The optical density at a wavelength of 600 nm of the culture was determined at inoculation and after incubation at 30°C for 24 h.

Fish preparation Live tilapia of mixed sexes were obtained from the Freshwater Aquatic Genetic Improvement Center, Charoen Pokphand Food Public Co. Ltd. (CP Group, Bangkok, Thailand). They were maintained in 500 *l* plastic containers at 30°C, subjected to a 12 h light, 12 h dark cycle, and fed a commercial tilapia diet (Sakura Fish Food, See-All Aquariums, Bangkok, Thailand) for 2 weeks prior to the experiment. To determine whether the fish were free of bacterial infection, they were randomly sampled, and their livers and kidneys aseptically streaked on BHI agar and incubated at 30°C for 24 h.

All fish experiments were conducted in 45 *l* aquaria at 30°C. Ten tilapia weighing 10±1 g were placed in each aquarium 24 h prior to the experiments. Commercial tilapia diet was supplied twice daily at the rate of 5% of total fish body weight per day.

Examination of pathogenicity of *A. hydrophila* Groups of 10 tilapia were used to study pathogenicity of *A. hydrophila*. From an initial bacterial concentration of 6.0×10^8 CFU/ml, 10-fold serial dilutions were prepared, and 50 μl of each dilution was injected into each fish intraperitoneally. As a control, the same amount of physiological saline was injected instead of the bacterial suspension. Each dilution trial was conducted in five replicates. Mortalities were recorded daily for 2 weeks. Dead fish were removed from the aquarium daily and their livers and kidneys were subjected to bacterial identification testing, as described above, to confirm the presence of *A. hydrophila* infection.

The median lethal dose (LD_{50}) using the method of Reed–Muench (10) was calculated as follows:

$$\log LD_{50} = \alpha \log b + c$$

where α = [mortality > 50%–50%]/[mortality > 50%–mortality < 50%]; b = dilution rate (10^{-1}); and c = the log of minimum dilution rate in which the mortality was > 50%. LD_{50} was expressed as colony forming units per milliliter (CFU/ml).

Fish diet preparation Commercial tilapia diet supplemented with dried leaf powder of *P. guajava*, dried *P. guajava* ethanol extract, and oxytetracycline were prepared. Diet 1 comprised dried

TABLE 1. List of herbs and plant parts used for extraction

Thai names	Common names	Scientific names	Sources of active compounds
Bo Ra Ped	Heart-leaved moonseed	*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook. F. & Thomas.	Stem
Bua Bok	Asiatic pennywort	*Centella asiatica* (Linn.) Urban.	Leaf
Chum Hed Tade	Ringworm bush, candle bush	*Cassia alata* Linn.	Leaf
Fa Rung	Guava	*Psidium guajava* Linn.	Leaf
Fa Ta Lie Jone	Kalmegh, king of bitters, Chuan Xin Lian	*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees.	Leaf
Ka	Greater galangal, false galangal	*Alpinia galangal* (Linn.) Stuntz.	Root
Kan Plu	Clove	*Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S.G. Harrison.	Flower
Kra Chai	Fingerroot	*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr.	Root
Kra Prao	Holy basil, sacred basil	*Ocimum sanctum* L.	Leaf
Kra Team	Garlic	*Allium sativum* Linn.	Bulb
Mang Kud	Mango steen	*Garcinia mangostana* L.	Peel
Ma Ra Kee Nok	Balsam pear, bitter gourd, bitter cucumber, leprosy gourd	*Momordia Charantia*	Fruit
Tra Krai	Lapine, lemon grass	*Cymbopogon citrates* (De ex Nees) Stapf.	Stem
Tub Tim	Pomegranate	*Punica granatum* Linn.	Fruit peel

leaf powder of *P. guajava* in the commercial tilapia diet at a ratio of 1:4 w/w. Diet 2 consisted of dried *P.guajava* ethanol extract mixed in the commercial tilapia diet at a ratio of 1:24 w/w. Diet 3 comprised the commercial tilapia diet supplemented with oxytetracycline at a ratio of 1:199 w/w. Each supplemented diet was mixed with distilled deionized water (1 ml/g) until a homogenous mixture was obtained. The mixture was passed through a meat mincer, producing extruded string shapes, which were dried at 30°C for 24 h and then broken to produce pellets approximately 2-mm long. The control diet (diet 4) was prepared using the same process except no supplement was added.

Fish feeding experiment To study the effect of *P. guajava* supplemented diets on *A. hydrophila* infection *in vivo*, groups of 10 uninfected tilapia were fed diets 1, 2, 3, or 4 for 5 d. On the sixth day, tilapia were anesthetized with 0.025% clove oil and infected with *A. hydrophila* by intraperitoneal injection of 50 µl of bacterial suspension, at a dose level causing 50% mortality (LD_{50}). Feeding of the assigned diets continued for 10 d. Mortality was observed daily. Dead fish were removed from the aquaria daily, and their livers and kidneys were subjected to bacterial determination as described above. After 10 d, bacterial identification was performed on the livers and kidneys of the surviving fish to determine if they were free of *A. hydrophila* infection. The experiment was conducted in five replicates. The same experiment was also conducted without *A. hydrophila* injection to examine whether the supplemented fish diets had an effect on tilapia. In addition to mortality, the appearance, feeding response, and behavior of the fish were observed daily.

RESULTS

Detection of antimicrobial activity of herb extracts against *A. hydrophila* Extracts of fourteen herbs, in water, 95% ethanol, or ether, were tested for antimicrobial activity against *A. hydrophila* (Table 2). Four herbs (*T. crispa*, *A. galangal*, *M. charantia*, and *C. citrates*) did not inhibit *A. hydrophila* in all extraction solvents, while four herbs (*P. guajava*, *A. paniculata*, *A. sativum*, and *G. mangostana*) exhibited inhibitory activity in all extraction types. Ten, seven, and three extracts exhibited strong, moderate, and weak inhibitory activity, respectively. The largest inhibition zone diameter (20.1±0.7 mm) was obtained from the ethanol extract of *P. guajava* leaf, while the smallest inhibition diameter (6.6±1.2 mm) was obtained from the ether extract of *O. sanctum* leaf. Oxytetracycline produced zones of growth inhibition against *A. hydrophila* with an average diameter of 29.3±0.5 mm.

TABLE 2. Antimicrobial activity of herbs extracted in three different solvents against *A. hydrophila* as determined by swab paper disc assay

Herbs	Inhibition zones (mm)		
	Water	95% ethanol	Ether
T. crispa	0	0	0
C. asiatica	0	0	15.6±1.4
C. alata	0	0	15.2±1.5
P. guajava	16.9±0.6	20.1±0.7	18.2±1.6
A. paniculata	14.6±1.1	15.5±0.9	15.2±1.3
A. galangal	0	0	0
E. caryophyllus	0	10.1±2.1	12.9±0.9
B. pandurata	0	0	13.1±1.3
O. sanctum	0	9.8±0.9	6.6±1.2
A. sativum	6.9±2.2	15.1±2.9	13.9±1.1
G. mangostana	13.3±1.4	17.6±1.2	15.9±1.5
M. charantia	0	0	0
C. citrates	0	0	0
P. granatum	0	13.4±2.0	0

TABLE 3. Minimal inhibitory concentrations (MIC) against *A. hydrophila* of herbs extracted in three different solvents

Herbs	MIC (µg/µl)		
	Water	95% ethanol	Ether
T. crispa	nd[a]	nd	nd
C. asiatica	nd	nd	250
C. alata	nd	nd	250
P. guajava	250	62.5	125
A. paniculata	500	250	250
Z. officinale	nd	nd	nd
E. caryophyllus	nd	2000	1000
B. pandurata	nd	nd	500
O. sanctum	nd	2000	>2000
A. sativum	>2000	250	500
G. mangostana	500	125	200
M. charantia	nd	nd	nd
C. citrates	nd	nd	nd
P. granatum	nd	500	nd

[a] Not done.

The ether extractions produced the highest numbers of herbs showing antimicrobial activity with 5 strong, 3 moderate, and 1 weak activity, while water extractions gave the lowest numbers of 1 strong, 2 moderate, and 1 weak activity. Within the 95% ethanol extractions, herbs 4, 2, and 1 showed strong, moderate, and weak activity, respectively (Table 2).

MIC determination The MICs against *A. hydrophila* of the herb extracts, which showed microbial inhibition were determined in BHI broth. The results showed that the ethanol extract of *P. guajava* leaf had the lowest MIC (62.5 µg/µl), while the aqueous extract of *A. sativum* and the ether extract of *O. sactum* had the highest value (>2000 µg/µl). The other antimicrobially active herb extracts had MIC values of 125 µg/µl (2 extracts), 250 µg/µl (7 extracts), 500 µg/µl (5 extracts), 1000 µg/µl (1 extracts), and 2000 µg/µl (2 extracts) (Table 3). The MIC of oxytetracycline against *A. hydrophila* was 0.5 µg/ml.

Since the ethanol extract of *P. guajava* leaf presented the strongest inhibitory effect against *A. hydrophila* in both swab paper disc assay and MIC determination, that extract was used in the remaining experiments.

Examination of mode of action To study the mode of action of the *P. guajava* leaf ethanol extract against *A. hydrophila*, the recovery of *A. hydrophila*, which had been inhibited by the extract for 24 h, was examined in fresh BHI broth. The inhibited bacteria resumed growth in fresh BHI broth within 24 h (Fig. 1), suggesting that the ethanol extract of *P. guajava* leaf has a bacteriostatic effect on *A. hydrophila*.

Examination of pathogenicity of *A. hydrophila* Pathogenicity of *A. hydrophila* for tilapia is shown in Table 4. All deaths occurred within 5 d after bacterial infection and the pathogen was found in the livers and kidneys of all mortalities. The calculated LD_{50} of *A. hydrophila* for tilapia was 3.44×10^6 CFU/ml.

Fish feeding experiment Before testing the thera-

TABLE 4. The mortality of tilapia injected intraperitoneally with different dilutions of an *A. hydrophila* suspension

A. hydrophila		Number of dead fish/number of tested fish[a]					% mortality
Concentration (CFU/ml)	Dilution	1	2	3	4	5	
6.0×10^{7}	10^{-1}	10/10	9/10	10/10	8/10	9/10	92
6.0×10^{6}	10^{-2}	5/10	6/10	8/10	7/10	6/10	64
6.0×10^{5}	10^{-3}	3/10	4/10	5/10	5/10	4/10	42
6.0×10^{4}	10^{-4}	2/10	3/10	3/10	3/10	2/10	26
6.0×10^{3}	10^{-5}	1/10	2/10	2/10	1/10	1/10	14
6.0×10^{2}	10^{-6}	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	4

[a] Results from all replicates (nos. 1–5).

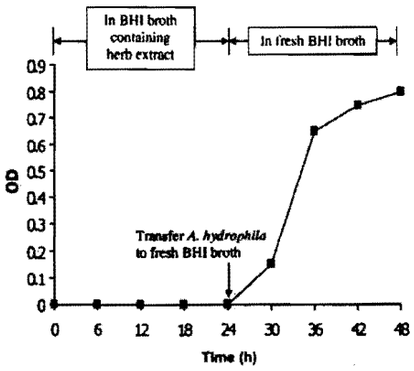


FIG. 1. Recovery in fresh BHI broth of *A. hydrophila* inhibited by the ethanol extract of *P. guajava* leaf.

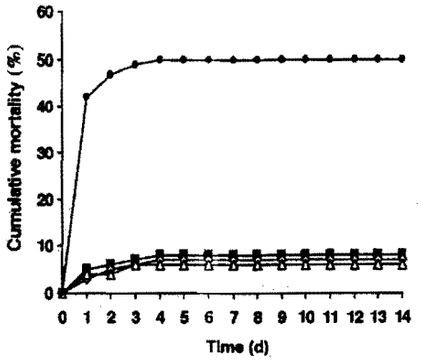


FIG. 2. Effects of fish diets supplemented with *P. guajava* leaf powder (diet 1, squares), dried ethanol extract of *P. guajava* leaf (diet 2, rhombuses), and oxytetracycline (diet 3, triangles) on mortality of *A. hydrophila* infected tilapia compared with that using the control fish diet (diet 4, circles).

peutic effects of fish diets supplemented with *P. guajava* leaf powder, *P. guajava* ethanol extract, or oxytetracycline on tilapia infected with *A. hydrophila*, all diets were fed to uninfected fish. No adverse effect was observed. When infected tilapia were fed a control diet with no supplements (diet 4), a >40% mortality occurred within 24 h (Fig. 2). In infected tilapia fed diet 1 (supplemented with *P. guajava* leaf powder), diet 2 (supplemented with *P. guajava* ethanol extract), or diet 3 (supplemented with oxytetracycline), substantial reductions in mortality were observed (Fig. 2). No significant difference in mortality of fish was observed among the two *P. guajava* treatments and the oxytetracycline treatment.

DISCUSSION

This study aimed to find a natural source, antimicrobial substance to replace antibiotics for the treatment of *A. hydrophila* infections in fish aquaculture. The *A. hydrophila* used in this study was isolated from naturally occurring tilapia exhibiting MAS from the Moon River, Ubon Ratchathani Province, Thailand. The *A. hydrophila* pathogenicity was confirmed by determination of its LD_{50} for tilapia, which was 3.44×10^{6} CFU/ml. In this study, we screened 14 herbs to determine the herb with the strongest antimicrobial activity against *A. hydrophila*. The herbs were selected because they are readily found, and easily grown, throughout Thailand. Moreover, the herbs had previously been reported to have antimicrobial activity (11–25). Such herbs, if effective against *A. hydrophila*, would make it practical for Thai farmers to use a locally occurring herb as a replacement for antibiotics.

Based on inhibition zone sizes and MIC values against *A. hydrophila*, the ethanol extract of *P. guajava* leaf had the strongest antimicrobial activity. It was also shown to have a bacteriostatic mode of action.

Belemtougri *et al.* (26) reported that antimicrobial compounds found in *P. guajava* leaf ethanol extracts were anthocyans, alkaloids, flavonoids, tannins, and terpenoids. Among these compounds, only the flavonoids (morin, mori-3-*O*-lyxoside, morin-3-*O*-arabinoside, quercetin, and quercetin-3-*O*-arabinoside) were found to have a bacteriostatic effect on fish pathogenic bacteria including *A. hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae*, and *Vibrio salmonicida* (25). This suggests that the inhibitory effect of the *P. guajava* leaf ethanol extract may due to the presence of flavonoids, or flavonoids combined with other antimicrobial substances. Although the other compounds identified by Belemtougri *et al.* (26) have not been reported to have inhibitory effects against fish pathogenic bacteria, there are other reports showing their antimicrobial activity. For ex-

ample, Leitao *et al.* (27) reported that anthocyans isolated from cranberry juice had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. According to a review by Scalbert (28) tannins may be toxic to filamentous fungi, yeasts, and bacteria. Terpenes have been reported to be active against bacteria (29–32), fungi (33, 34), viruses (35, 36), and protozoa (16). Even though protozoa (37, 38) and viruses (39, 40) were reported to be the major targets of alkaloids, antibacterial effects have also been described (16).

For oral administration to tilapia, *P. guajava* was added to a commercial fish diet either as a leaf powder or as a dried ethanol leaf extract. Both supplements markedly reduced the mortality of tilapia experimentally infected with *A. hydrophila* and no toxic effects were observed. Moreover, no significant differences in mortality rates were found among tilapia treated with *P. guajava* leaf powder, its ethanol extract, or those treated with oxytetracycline. The results suggest that *P. guajava* has therapeutic potential. To develop a treatment for MAS in tilapia, further experiments into aquacultural use of *P. guajava* supplemented fish diets against natural *A. hydrophila* infections in tilapia are underway.

The prolonged and extensive use of antibiotics to control diseases in fish aquaculture can be harmful to consumers, farmers, and the environment (4). At present, the use of antibiotics are strictly regulated and many may be prohibited in the near future. The results presented here indicate the potential of using the readily available *P. guajava* as an environmental friendly antibiotic for controlling *A. hydrophila* infection in tilapia.

REFERENCES

1. **Joseph, S. W. and Carnahan, A. M.:** Update on the genus *Aeromonas*. ASM News, **66**, 218–223 (2000).
2. **Vivas, J., Carracedo, B., Riano, J., Razquin, B. E., Lopez-Fierro, P., Acosta, F., Naharro, G., and Villena, A. J.:** Behavior of a *Aeromonas hydrophila* aro A live vaccine in water microcosms. Appl. Environ. Microbiol., **70**, 2702–2708 (2004).
3. **Janda, J. M. and Abbott, S. L.:** Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an exapanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clin. Infect. Dis., **27**, 332–344 (1998).
4. **Alderman, D. J. and Hastings, T. S.:** Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. Int. J. Food Sci. Technol., **33**, 139–155 (1998).
5. **Mtambo, M. M. A., Mushi, E. J., Kinabo, L. D. B., Maeda-Machang, A., Mwamengele, G. L. M., Yongolo, M. G. S., and Temu, R. P. C.:** Evaluation of the efficacy of the crude extracts of *Capsicum frutescens*, *Citrus limon* and *Opuntia vulgalis* against Newcastle disease in domestic fowl in Tanzania. J. Ethnopharmacol., **68**, 51–61 (1999).
6. **Kromna, V., Wachirapakorn, C., Luangtbongkum, P., Juntarasanit, W., and Solcome, C.:** The effect of *Psidium guajava* Linn. leaves treatment on diarrhea in diary calves. Khonkhan Univ. Res. J., **6**, 38–47 (2006).
7. **Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., and Zilberg, D.:** Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). Aquaculture, **238**, 97–105 (2004).
8. **Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X., and Jeney, Z.:** Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, **253**, 39–47 (2006).
9. **Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P.:** A simple method for detecting bacteriocin production: swab-paper disc. J. Sci. KhonKaen Univ., **26**, 281–288 (1998).
10. **Reed, L. J. and Muench, H.:** A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg., **27**, 493–497 (1938).
11. **Elnima, E. I., Ahmed, S. A., Mekkawi, A. G., and Mossa, J. S.:** The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. Pharmazie, **38**, 747–748 (1983).
12. **Sundaram, B. M., Gopalakrishnan, C., Subramanian, S., Shankaranarayanan, D., and Kameswaran, L.:** Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. Planta Med., **48**, 59–60 (1983).
13. **Hughes, B. G. and Lawson L. D.:** Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* (elephant garlic) and *Allium cepa* L. (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. Phytother. Res., **5**, 154–158 (1991).
14. **Agnihotri, S. and Vaidya, A. D.:** A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. Indian J. Exp. Biol., **34**, 712–715 (1996).
15. **Treadway, S.:** Exploring the universe of Ayurvedic botanicals to manage bacterial infections. Clin. Nutr. Insights, **6**, 1–3 (1998).
16. **Cowan, M. M.:** Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., **12**, 564–582 (1999).
17. **Jaiarj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, M. L. S., and Ruangsomboon, O.:** Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. J. Ethnopharmacol., **67**, 203–212 (1999).
18. **Singha, P. K., Roy, S., and Dey, S.:** Antimicrobial activity of *Andrographis paniculata*. Fitoterapia, **74**, 692–694 (2003).
19. **Mamtha, B., Kavitha, K., Srinivasan, K. K., and Shivananda, P. G.:** An in vitro study of the effect of *Centella asiatica* [Indian pennywort] on enteric pathogens. Ind. J. Pharmacol., **36**, 41 (2004).
20. **Vudhivanich, S.:** Efficacy of medicinal plant crude extracts on growth inhibition of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the vegetable soft rot agent. Kamphaengsaen Acad. J., **2**, 72–81 (2004).
21. **Nanasombat, S. and Lohasupthawee, P.:** Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonellae* and other enterobacteria. KMITL Sci. Tech. J., **5**, 527–538 (2005).
22. **Thongson, C., Davidson, M. P., Mahakarnchanakul, W., and Vibulsresth, P.:** Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria moncytogenes* and *Salmonella typhimurium* DT104. J. Food. Prot., **68**, 2054–2058 (2005).
23. **Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., and Eumkeb, G.:** Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galangal* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. Lebenson. Wiss. Technol., **39**, 1214–1220 (2006).
24. **Makinde, A. A., Igoli, J. O., TA'Ama, L., Shaibu, S. J., and Garba, A.:** Antimicrobial activity of *Cassia alata*. Afr. J. Biotechnol., **6**, 1509–1510 (2007).
25. **Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P.:** Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. Fitoterapia, **78**, 434–436 (2007).
26. **Belemtougri, R. G., Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G., and Sawadogo, L.:** Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture. J. Zhejiang Univ. Sci. B, **7**, 56–63 (2006).
27. **Leitao, D. P. S., Polizello, A. C. M., Ito, I. Y., and Spadaro, A. C. C.:** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. J. Med. Food, **8**, 36–

40 (2005).
28. **Scalbert, A.**: Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, **30**, 3875–3883 (1991).
29. **Scortichini, M. and Pia Rossi, M.**: Preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* J. Appl. Bacteriol., **71**, 109–112 (1991).
30. **Himejima, M., Hobson, K. R., Otsuka, T., Wood, D. L., and Kubo, I.**: Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. J. Chem. Ecol., **18**, 1809–1818 (1992).
31. **Barre, J. T., Bowden, B. F., Coll, J. C., Jesus, J., Fuente, V. E., Janairo, G. C., and Ragasa, C. Y.**: A bioactive tritepene from *Lantana camara*. Phytochemistry, **45**, 321–324 (1997).
32. **Habtemariam, S., Gray, A. I., and Waterman, P. G.**: A new antibacterial sequiterpene from *Premna oligotricha*. J. Nat. Prod., **56**, 140–143 (1993).
33. **Harrigan, G. G., Ahmad, A., Baj, N., Glass, T. E., Gunatilaka, A. L., and Kingston, D. G. I.**: Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. J. Nat. Prod., **56**, 921–925 (1993).
34. **Ayafor, J. F., Tchuendem, M. H. K., and Nyasse, B.**: Novel bioactive diterpenoids from *Aframomum aulacocarpos*. J. Nat. Prod., **57**, 917–923 (1994).
35. **Pengsuparp, T., Cai, L., Fong, H. H. S., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M., Wani, M. C., and Wall, M. E.**: Pentacyclic triterpenes derived from *Maprounea Africana* are potent inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. J. Nat. Prod., **57**, 415–418 (1994).
36. **Sun, H. D., Qiu, S. X., Lin, L. Z., Wang, Z. Y., Lin, Z. W., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Fong, H. H., Cordell, G. A., and Farnsworth, N. R.**: Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaeranda* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. J. Nat. Prod., **59**, 525–527 (1996).
37. **Frelburghaus, F., Kaminsky, R., Nkunya, M. H. H., and Brun, R.**: Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. J. Ethanopharmacol., **55**, 1–11 (1996).
38. **Omulokoli, E., Khan, B., and Chhabra, S. C.**: Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. J. Ethanopharmacol., **56**, 133–137 (1997).
39. **Sethi, M. L.**: Inhibition of reverse transcriptase activity by benzophenanthridine alkaloids. J. Nat. Prod., **42**, 187–196 (1997).
40. **McMahon, J. B., Currens, M. J., Gulakowski, R. J., Buckheit, R. W. J., Lackman-Smith, C., Hallock, Y. F., and Boyd, M. R.**: Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms. Antimicrob. Agents Chemother., **39**, 484–488 (1995).

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นายอดิเทพชัยย์การณ์ ภาชนะวรรณ

ประวัติการศึกษา

-เทคโนโลยีการเกษตรบัณฑิต (ทษ.บ.) สาขาวิชาประมงน้ำจืด คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2534

-วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2542

ประวัติการได้รับทุนสนับสนุน

-ทุนสนับสนุนการศึกษาระดับปริญญาเอกจาก วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม

-ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์บางส่วน ประจำปีการศึกษา 2550 จากสำนักงานบริหารงานบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

-ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์บางส่วน ประจำปีการศึกษา 2550 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประวัติการวิจัย

-**Adithepornchai Pachanawan** and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2007. Antimicrobial activity of herb extracts against *Streptococcus agalactiae*, a fish pathogenic bacterium. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology on November 1-3, 2007. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand. (Proceeding)

-**Adithepornchai Pachanawan** and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2008. Infection of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) and antimicrobial activity of some herb extracts. The Greater Mekong Sub-region Agriculture Conference

(GMSAC) on February 9-10, 2008. Nakhon Phanom University. (Proceeding)

-Adithepornchai Pachanawan and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2008. Efficacy of Gauva leave (Psidium guajava Linn.) inhibition of *Streptococcus agalactiae*, a fish pathogenic bacterium. The 2nd Conference on Graduate Research on February 23, 2008. Surinda Rajabhat University. (Proceeding)

-Adithepornchai Pachanawan, Ekkalak Somboon, Parichat Phumkhachon and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2008. Preliminary study on inhibitory potential of *Capsicum frutescens* Linn. against infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.), Mekong economic fish. International Symposium on Sustaining fish diversity, fisheries and aquacultures in the Mekong Basin, September 3-5, 2008. Faculty of Agriculture Ubon Ratchathani University, Thailand. (Proceeding)

-Adithepornchai Pachanawan, Parichat Phumkhachon and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2008. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 106(5), page 419-424. (Publication)

-Adithepornchai Pachanawan, Parichat Phumkhachon and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2009. Acute toxicity of Chili pepper (*Capsicum frutescens* Linn.) on water quality and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.), National Conference on

Management Sciences and Resources management August 20-21, 2009. Faculty of Management Sciences, Ubon Rajathanee University, Thailand. (Proceeding)

-Ekkalak Somboon, Wanpen Thamniamton, Varaporn Boonsarn, **Adthepchaikarn Pachanawan**, Parichat Phumkhachon and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2009. Diversity of bacteriophages infecting lactic acid bacteria found in Nham. 35th Congress on Science and Technology of Thailand. (Proceeding)

-Varaporn Boonsarn, Wanpen Thamniamton, Ekkalak Somboon, **Adthepchaikarn Pachanawan**, Parichat Phumkhachon and Pongsak Rattanachaikunsopon. 2009. Characterization of cadmium resistant lactic acid bacteria isolated from fermented foods. 35th Congress on Science and Technology of Thailand. (Proceeding)

ประวัติการทำงาน พ.ศ. 2534-2535 นักวิชาประมง แผนกเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์

พ.ศ. 2535-ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาประมง วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม

ตำแหน่งและสถานที่ทำงานปัจจุบัน ครู วิทยฐานะ ชำนาญการ วิทยาลัยเกษตร และเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม
103 หมู่ 3 ถนนชยางกูร ตำบลขามเฒ่า อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000 โทรศัพท์ 042-532471
โทรศัพท์มือถือ 081-8723176