

การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฟอร์มาลิน จุนสี กรดน้ำส้มสายชู ต่างทับทิม และไตรคลอโรฟอน (Dipterex®) ในการกำจัดเห็บกระจกที่พบในลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Comparison of the Efficacy of Formalin, Copper Sulfate, Acetic Acid Potassium Permanganate, and Trichlorfon (Dipterex®) on *Trichodina* spp. in Nile Tilapia Fingerlings (*Oreochromis niloticus*)

วรรณิา สิริมานะพงษ์^{1*} พิมพ์ชนก ประจําคํา² ศุภกาญจน์ อุไรรัตน์² สุภานัน สินธุมา²

อริชา ศรีสุทธากการ² และอรไพลิน ประยูรศุข²

Wanna Sirimanapong^{1*}, Pimchanok Prachamkhai², Suphakarn Urairat², Supanan Sintuma²

Athicha Srisutthakarn² and Ornphilin Prayoonsuk²

¹หน่วยวิจัยและดูแลสุขภาพสัตว์น้ำทางสัตวแพทย์ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

¹Veterinary Aquatic Animal Research Health Care Unit, Department of Clinical Science and Public Health

Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand 73170

²Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand 73170

*Corresponding author: wanna.sir@mahidol.edu

Abstract

Received: February 27, 2020

Revised: April 20, 2021

Accepted: May 03, 2022

The objective of this research was to compare the efficacy of formalin, copper sulfate, acetic acid, potassium permanganate and trichlorfon (Dipterex®) on controlling trichodiniasis in Nile tilapia fingerlings. Fish were randomly sampled from earthen pond that had heavy *Trichodina* spp. infection and raised in 6 tanks of 30 fish each. Each tank was supplemented with each of the 5 chemicals or left untreated for negative control and left for 24 hours. Skin and gill scraping of fish before and after treatment were performed for treatment efficacy evaluation. The results of this study showed significant difference among chemical treatments for inactivation of *Trichodina* spp. ($p < 0.01$). Formalin, acetic acid and potassium permanganate can eradicate *Trichodina* spp. of Nile tilapia.

Keywords: comparison of the efficacy, chemicals, Nile tilapia, *Trichodina* spp.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมี 5 ชนิด ที่ใช้กำจัดเห็บระฆังในปลานิล ได้แก่ ฟอรัมาลิน จุนสี กรดน้ำส้ม ต่างทับทิม และไตรคลอโรฟอน (Dipterex®) โดยทำการสุ่มปลานิลจากบ่อดินที่ตรวจพบเห็บระฆังในฟาร์มมาเลี้ยงในบ่อดทดลอง 6 บ่อ บ่อละ 30 ตัว ในแต่ละบ่อจะใส่สารเคมีทั้ง 5 ชนิดที่แตกต่างกัน และบ่อที่ไม่ใส่สารเคมีเป็นกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ได้มีการสุ่มชุดตรวจปลานิลในบ่อดทดลองก่อนและหลังใส่สารเคมี และตรวจคุณภาพน้ำในบ่อดทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารเคมี จากการศึกษาพบว่าชนิดสารเคมีที่ใช้ในบ่อเลี้ยงที่แตกต่างกัน มีผลต่อการพบและจำนวนของเห็บระฆังในปลานิลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยฟอรัมาลิน กรดน้ำส้ม และต่างทับทิมสามารถกำจัดเห็บระฆังที่พบในปลานิลได้

คำสำคัญ: การทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพ
สารเคมี ปลานิล เห็บระฆัง

คำนำ

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นอาหารโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ไขมันต่ำ เลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตเร็ว แต่ถึงแม้ว่าปลานิลจะสามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพทั้งในบ่อดินและในกระชัง อุตสาหกรรมที่สำคัญของการเพาะเลี้ยง คือ โรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อ ซึ่งเกิดจากการเลี้ยงที่หนาแน่น ขาดการจัดการที่ดี รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่มีความแปรปรวนสูง โดยโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยที่สุดในปลานิล คือ โรคติดเชื้อปรสิต เช่น เห็บระฆัง ปลิงใส และเห็บปลา โรคติดเชื้อแบคทีเรียแอโรโมนาส (*Aeromonas* spp.) สเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* spp.) ฟลาโวแบคทีเรีย (*Flavo*

bacterium spp.) เป็นต้น (Cai *et al.*, 2004; Eissa *et al.*, 2010; Natividad *et al.*, 1986; Shoemaker and Klesius, 1997)

เห็บระฆัง (*Trichodina* spp.) เป็นเชื้อโปรโตซัวอยู่ในแฟมิลี Trichodinidae ซึ่งประกอบด้วยจิ้นสทริโคดิดนา (*Trichodina*) พาราทริโคดิดนา (*Paratrachodina*) ทริโคโดเนลลา (*Trichodonella*) ทริพาเทลลา (*Tripartiella*) และเวาโซเมีย (*Vauchomia*) เห็บระฆังมีรูปร่างวงกลม เมื่อบริเวณด้านบน และครึ่งวงกลมเมื่อบริเวณด้านข้าง มีเส้นผ่านศูนย์กลางยาว 25-100 ไมโครเมตร มีซีเลียรอบตัวและช่องปากเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่และหาอาหาร พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม (Smith and Schwarz, 2009) เคลื่อนที่โดยการหมุนไปเกาะติดที่เหงือกและผิวหนังของปลาได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในช่วงที่ปลาอ่อนแอและสามารถติดได้ในปลาหลายชนิด โดยพบในปลาวัยรุ่น (Juvenile) มากที่สุด

นอกจากนี้ยังพบได้ในลูกปลาวัยอ่อน (Fry) และลูกปลาระยะโพสต์ลาร์วา (Post larva) การที่ปลาติดเชื้อจำนวนน้อยมักไม่ก่อให้เกิดโรค (Koyuncu and Toksen, 2010) แต่ถ้ามีปริมาณมากจะก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่าทริโคดิดินีโอซิส (Trichodiniasis) โดยปลาจะแสดงอาการคัน ว่ายน้ำผิดปกติ ซึม อ่อนแรง ไม่กินอาหาร ผลผลิตเมื่อยมากขึ้น จนเห็นเป็นหมอกปุยสีขาว ๆ ที่ผิวหนัง เกิดแผลหลุม ครีบเปื่อยยุ่ย หากโรคเกิดที่เหงือกจะทำให้เหงือกบวม หายใจลำบาก (Sharma *et al.*, 2012) การก่อโรคมักเกิดจากการเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่นและให้อาหารปริมาณมาก จนทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงขึ้นหรือมีสารอินทรีย์ในน้ำมากซึ่งเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเห็บระฆัง (Madsen *et al.*, 2000)

สารเคมีหลากหลายชนิดมีคุณสมบัติในการกำจัดเห็บระฆัง เช่น ฟอรัมาลิน (Formalin) จุนสี (Copper sulfate: CuSO_4) ต่างทับทิม (KMnO_4) กรดน้ำส้มสายชู (Acetic acid) เกลือ (NaCl) ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ ข้อดีและข้อจำกัดที่ต่างกันออกไป ดังนั้นการเลือกใช้สารเหล่านี้ควรเลือกให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์และสภาพพื้นที่ในการใช้งาน

ฟอร์มาลิน (Formalin) เป็นแก๊สฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) ที่ละลายในน้ำ ได้รับการรับรองจาก FDA ให้ใช้เพื่อกำจัดปรสิตในปลา ออกฤทธิ์โดยกระบวนการอัลคิเลชัน (Alkylation) ที่กรดนิวคลีอิกและทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ มีประสิทธิภาพในการกำจัดปรสิตภายนอกในปลาน้ำจืดและปลาทะเล ได้แก่ เชื้อโปรโตซัวและพยาธิใบไม้ในกลุ่มโมโนจีนี (Monogenetic trematodes) เช่น ปลิงใส (Reardon and Harrell, 1990) แต่ข้อเสียของฟอร์มาลินเป็นพิษต่อสาหร่าย ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง การใช้ปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิดการทำลายเหงือกปลาจนเกิดเป็นเนื้อตายได้ นอกจากนี้ยังเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) และเป็นแก๊สพิษ ดังนั้นผู้ที่ใช้สารเคมีต้องสวมอุปกรณ์ป้องกันและเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท (Ruth, 1996) การสลายตัวของฟอร์มาลินขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำและการให้อากาศในน้ำ ถ้าน้ำมีอุณหภูมิสูงและมีการให้อากาศจะทำให้ฟอร์มาลินสลายตัวเร็ว ฟอร์มาลินในระดับความเข้มข้น 25 ppm จะสลายตัวหมดภายในเวลาไม่เกิน 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27-30°C. ปริมาณสารที่แนะนำ คือ 1) 15-25 ppm 24 ชั่วโมงในบ่อ เพิ่มเครื่องตีน้ำและงดอาหาร 2) 125-250 ppm 1 ชั่วโมง 3) 1,000-2,000 ppm 15 นาที สำหรับกำจัดเชื้อราที่ไข่ปลา (Leal et al., 2018) จากการศึกษาของ Yu et al. (2020) ศึกษาการใช้ฟอร์มาลินในการรักษาการติดเชื้อปรสิต *Mesanocephalus* sp. ของปู (*Portunus trituberculatus*) นอกจากนี้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 30-40 ppm สามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อปรสิตที่พบในปลา Silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell) ที่เลี้ยงในบ่อดิน (Rowland et al., 2006)

จุนสี (Copper sulfate: CuSO_4) ใช้ในการรักษาการติดเชื้อปรสิตอะมีบะไลโอโดเนียม โอซิลลาทัม (*Amyloodinium ocellatum*) และคริปโทคาริออน เออร์แทนส์ (*Cryptocaryon irritans*) กำจัดเห็บกระซัง (*Trichodina* spp.) ไคซิลโลดอนเนลลา (*Chilodonella* spp.) คอสเทีย (*Costia* spp.) อีพิสไทลิส (*Epistylis* spp.) และอิคโทอพอไทเรียส มัลติฟิเลียส (*Ichthyophthirius*

multifiliis) โดยยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน (Yanong, 2010) แต่เนื่องจากจุนสีมีองค์ประกอบของคอปเปอร์ (II) ไอออน (Cu^{2+}) ซึ่งง่ายต่อการเกิดพิษกับปลาโดยที่จะไปทำลายเนื้อเยื่อเหงือกและรบกวนการควบคุมไอออน (Reardon and Harrell, 1990) ทำลายเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น ตับ ไต ระบบประสาทและระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นการใช้สารนี้จึงควรคำนึงถึงค่าความกระด้างซึ่งเกิดจากแคลเซียม (Calcium hardness) และค่าความเป็นด่างของน้ำ (Alkalinity) รวมด้วยเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของสองค่านี้จะช่วยในการลดความเป็นพิษของ Cu^{2+} ได้โดยที่แคลเซียมจะแย่ง Cu^{2+} จับที่เหงือกของปลาและคาร์บอเนต (Carbonate) จะจับตัวกับ Cu^{2+} ทำให้ความเข้มข้นของ Cu^{2+} ในน้ำลดลง Cu^{2+} จะไม่มีการสลายตัวแต่จะมีการเปลี่ยนรูปได้เมื่อจับกับสารประกอบอื่น ๆ ปริมาณสารที่แนะนำ คือ 0.15-0.20 ppm 24 ชั่วโมงในบ่อ โดยค่า Alkalinity ต้องมากกว่า 50 ppm (Yanong, 2010) จากการศึกษาของ Owatari et al. (2020) ใช้จุนสีความเข้มข้น 0.2 ppm ในการรักษาการติดเชื้อ *Amyloodinium ocellatum* ในปลาซาร์ดีนหรือปลาพิลชาร์ด Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) นอกจากนี้ในปลาตุ๊กแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) มีการทดสอบความเป็นพิษของจุนสีที่พบว่า จุนสีความเข้มข้น 37.47-44.58 ppm สามารถทำให้เกิดการตายในปลาตุ๊กแอฟริกาที่ 96 ชั่วโมง (Wani et al., 2018)

ต่างทับทิม (Potassium permanganate: KMnO_4) เป็นสารออกซิไดซ์ มีประโยชน์ในทางสัตวน้ำ คือ ใช้เพื่อกำจัดเห็บกระซัง ไคโลดอนเนลลา (*Chilodonella* spp.) คอสเทีย (*Costia* spp.) แอมบิฟิยา (*Ambiphrya* spp.) รักษาโรคเหงือกและแผลหลุมจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา รักษาโรคซิคลิโดไจริเอซิส (Cichlidogyrasis) ในปลานิล ออกซิไดซ์สารอินทรีย์และตะกอนก้นบ่อ ช่วยลดค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลชีพใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Biological Oxygen Demand: BOD) และปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังกำจัดสาหร่ายซึ่งมีผลทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำลงได้ ดังนั้นควร

เตรียมเครื่องต้นน้ำให้พร้อมเมื่อมีการใช้สารนี้และไม่ใช่บ่อยจนเกินไป ต่างทับทิมเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรง อาจทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนัง ดวงตา และส่วนอื่น ๆ ของร่างกายมนุษย์ บริเวณที่สัมผัสจะเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นผู้ที่ทำงานกับสารนี้ควรใช้อุปกรณ์ป้องกัน เช่น ถุงมือ แวนตาเสื้อผ้าป้องกัน และหน้ากากอนามัย เพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้น (Marking and Bills, 1975) ปริมาณสารที่แนะนำคือ 1) 2 ppm หรือละลายต่างทับทิมในน้ำแล้วได้เป็นสีชมพูอ่อนในบ่อเลี้ยง (กรณีที่มีสีขุ่นให้ทำการไทเทรตเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสม) และหลังการทำปฏิกิริยาภายใน 24 ชั่วโมง น้ำควรเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของ MnO_2 กรณีที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของน้ำแสดงว่าปริมาณของต่างทับทิมมากเกินไป 2) 4-8 ppm เพื่อกำจัดแพลงก์ตอน (Tucker and Boyd, 1977) ความเป็นพิษที่สามารถทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ที่ 96 ชั่วโมง ในปลาดุก (Channel catfish: *Ictalurus punctatus*) ความเข้มข้น 0.750 ppm ปลาทอง (*Carassius auratus*) 3.60 ppm และยังพบว่าความเป็นพิษของต่างทับทิมจะสูงขึ้นถ้าละลายในน้ำกระด้างหรือมีความเป็นกรดต่ำสูง (Marking and Bills, 1975) การใช้ต่างทับทิมความเข้มข้น 4 ppm สามารถใช้กำจัด *Flexibacter columnaris* ในปลา Fathead minnows (*Pimephales promelas*) (Jee and Plumb, 1981) ในขณะที่ต่างทับทิมความเข้มข้น 20 ppm 20 นาที 22°C. ลดการติดปรสิต *Pseudodactylogyrus* spp. ในปลาไหลญี่ปุ่น (*Anguilla japonica*) (Chan and Wu, 1984)

กรดน้ำส้มสายชู (Acetic acid) เป็นสารฆ่าเชื้อและมีประโยชน์ในทางสัตว์น้ำโดยการกำจัดเชื้อปรสิตภายนอกของปลา (Ruangpan, 1988) รวมทั้งเห็บระฆังออกฤทธิ์โดยแตกตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) ซึ่งสามารถทำให้โปรตีนและไขมันเกิดการเสียสภาพได้นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ทำให้ปฏิกิริยาในเซลล์ปรสิตเสียสมดุล ปริมาณสารที่แนะนำ คือ 1:500 แช่นาน 1 นาที และ 1:4,000 หรือ 1:6,000 แช่นาน 1 ชั่วโมง

(Leitritz and Lewis, 1980) กรดน้ำส้มสายชู ความเข้มข้น 2 มิลลิตรต่อลิตร แช่นาน 30-40 วินาที สามารถใช้ในการรักษาโรคในปลาทองที่ติดเชื้อได้ (Wildgoose and Lewbart, 2001)

ไตรคลอร์ฟอน (Trichlorfon: Dipterex®) เป็นสารในกลุ่มออกาโนฟอสเฟต (Organophosphate) ที่มีราคาถูก ซึ่งถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในทางสัตว์น้ำสามารถกำจัดแมลง ปลิงใส หนอนตัวกลม หนอนสมอปปลิง เห็บปลา หอยทาก และไฮดรา (*Hydra*) (Lopes et al., 2006) โดยยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) แบบไม่ผันกลับ ทำให้มีการสะสมเอนไซม์นี้ที่บริเวณปมประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic ganglion) ปมประสาทพาราซิมพาเทติก (Parasympathetic ganglion) และรอยต่อระหว่างเส้นประสาทต่อกับกล้ามเนื้อ (Neuromuscular junction) เกิดการเพิ่มขึ้นของกระบวนการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ให้เป็นขั้วบวกมากขึ้น (Depolarization) ของเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทหลังไซแนปส์ (Postsynaptic membrane) ตลอดเวลา ส่งผลให้มีการกระตุ้นเซลล์ประสาทอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะระบบประสาทพาราซิมพาเทติก และระบบประสาทที่ควบคุมการเคลื่อนไหวของร่างกาย (Bassleer, 1998) สารนี้ค่อนข้างมีความรุนแรงทั้งต่อแมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ปลา รวมทั้งมนุษย์ ไตรคลอร์ฟอนจะสลายตัวได้ดีในน้ำที่มีความเป็นด่างซึ่งจะสลายตัวได้ประมาณ 99% ภายใน 2 ชั่วโมง แต่จะเสถียรในน้ำที่เป็นกรด เมื่อผสมไตรคลอร์ฟอนลงในน้ำจะแตกตัวได้สารไดคลอร์วอส (Dichlorvos) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะมีความคงทนในน้ำอุณหภูมิ 20°C. สารไดคลอร์วอสที่ได้จะมีปริมาณที่สามารถตรวจวัดได้ถึง 526 วัน (Lopes et al., 2006) ปริมาณสารที่แนะนำ คือ 0.25-1 ppm (Bassleer, 1998) มีการศึกษาในปลาไหลญี่ปุ่นที่ติดปรสิต *Pseudodactylogyrus* spp. สามารถใช้ไตรคลอร์ฟอนความเข้มข้น 0.27-1.0 ppm แช่ 24 ชั่วโมง ทุก 2 วัน 2 ครั้ง (Chan and Wu, 1984) ขณะที่ไตรคลอร์ฟอนความเข้มข้น 0.2-0.4 ppm แช่ 48 ชั่วโมง สามารถลดการติดเชื้อ

Lactococcus garvieae ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chang *et al.*, 2006)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาภาคสนามในฟาร์มที่เพาะเลี้ยงปลานิล เพื่อมุ่งประโยชน์ในการเลือกใช้สารเคมีที่ถูกต้องและเหมาะสม สำหรับการกำจัดปรสิตที่เกิดขึ้นภายในฟาร์ม และจากข้อมูลข้างต้นทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฟอร์มาลิน จุนสี กรดน้ำส้ม ด่างทับทิม และไตรคลอโรฟอน ต่อการกำจัดเห็บระฆังในปลานิล เพื่อนำมาปรับใช้ในฟาร์มต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฟอร์มาลิน จุนสี กรดน้ำส้ม ด่างทับทิม และไตรคลอโรฟอน ต่อการกำจัดเห็บระฆังในปลานิลที่เลี้ยงในบ่อดิน

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การใช้สัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาจาก Mahidol University-Institute Animal Care and Use Committee (MU-IACUC) รหัสโครงการ MU-IACUC 2017/010

ลูกปลานิลขนาด 8.2 ± 2.3 ซม. จำนวน 180 ตัว ถูกสุ่มจากบ่อดินที่มีการระบาดของเห็บระฆัง โดยการสุ่มชุดบริเวณผิวหนัง และเหงือก (Skin and gill scraping examination) แต่ละกลุ่มการทดลองจะมีปลานิลทั้งหมด 30 ตัว เลี้ยงในบ่อไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร จำนวน 6 บ่อ เติมน้ำจากบ่อเลี้ยงปริมาตร 300 ลิตร ในแต่ละบ่อ

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

กลุ่มการทดลองทั้งหมด 6 กลุ่ม โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ 1 ฟอร์มาลิน 37% (Formalin) ปริมาณ 30 ppm (9 มิลลิลิตร/300 ลิตร) กลุ่มที่ 2 จุนสี (CuSO_4) ปริมาณ 0.25 ppm (75 มิลลิกรัม/300 ลิตร) กลุ่มที่ 3 กรดน้ำส้มเข้มข้น 98% ปริมาณ 25 ppm (7.5 มิลลิลิตร/300 ลิตร) กลุ่มที่ 4 ด่างทับทิม (KMnO_4) ปริมาณ 2 ppm (600 มิลลิกรัม/300 ลิตร) กลุ่มที่ 5 ไตรคลอโรฟอน (Dipterex®) ปริมาณ 0.25 ppm (75 มิลลิกรัม/300 ลิตร) กลุ่มที่ 6

เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) ไม่เติมสารใด ๆ ลงในน้ำที่เลี้ยงปลาตลอดการทดลอง (Figure 1)

การทดลอง

หลังจากแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง ทำการสุ่มตรวจปรสิตก่อนการใส่สารเคมี และเตรียมสารเคมีตามปริมาณที่ต้องการ นำสารเคมีเตรียมไว้ทำการแช่ (Bath) ตามกลุ่มต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการเติมอากาศภายในบ่อให้เพียงพอตลอดเวลา

การเก็บตัวอย่าง และการตรวจวินิจฉัย

การเก็บตัวอย่างโดยสุ่มปลาจากบ่อทดลองขึ้นมาตรวจจำนวน 5 ตัว คิดเป็นร้อยละ 15 จากจำนวนปลาทั้งบ่อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ก่อนการชุดตรวจปรสิตมีวางยาซึมปลาด้วยน้ำมันกานพลู (อัตราส่วน 1 ต่อ 9 ในเอทานอล) ด้วยขนาดยา 40 ppm หลังจากปลาไม่สามารถรักษาสมดุลการทรงตัว จึงนำปลาขึ้นมาทำการเก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างโดยการใช้แผ่นปิดสไลด์ชุดบริเวณผิวหนังและเหงือก ซึ่งจะทำทั้งก่อน (ชุดด้านซ้ายของตัวปลา) และหลังการรักษา (ชุดด้านขวาของตัวปลา) โดยตำแหน่งที่ชุดบริเวณผิวหนังจะชุดที่บริเวณลำตัว ถัดจากแผ่นปิดเหงือกได้ครีบอก ขนาดกว้าง 2.2 ซม. ยาว 2.2 ซม. และบริเวณเหงือกจะชุดที่เหงือกชั้นบนสุด (Figure 1) ซึ่งตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดจะแยกเก็บด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตัวอย่างละแผ่น หลังจากนั้นหยด 0.9% NaCl ลงบนแผ่นสไลด์ 2 จุด และวางแผ่นปิดสไลด์ที่มีตัวอย่างลงไป โดยหันแผ่นปิดสไลด์ด้านที่ใช้ชุดเข้าหากระจกฝานำปลาไปฟั่นสลบในถังที่มีออกซิเจน

ส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายขนาด 50 เท่า (เลนส์วัตถุ 5X และเลนส์ตา 10X) ซึ่งจะส่องตรวจเฉพาะด้านที่ชุดกระจกฝาจานวน 3 แถวและนับจำนวนปรสิตที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่างแยกกัน ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบในแต่ละกลุ่ม (Figure 1) โดยนำจำนวนปรสิตที่นับได้มาคำนวณหาค่าจำนวนปรสิตต่อจำนวนปลาที่ติดปรสิต (Mean Intensity: MI) ยกตัวอย่างเช่น มีปรสิตทั้งหมด 5 ตัว มีจำนวนปลาที่ติดปรสิตทั้งหมด 6 ตัว จะได้ $MI = 5/6 = 0.83$ และค่าความชุกของโรค

(Prevalence: P) ยกตัวอย่างเช่น ปลาที่สุ่มมาตรวจมีทั้งหมด 10 ตัว มีตัวที่เจอปรสิตทั้งหมด 8 ตัว จะได้ $P = 8 \times 100 / 10 = 80\%$ บันทึกผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับในแต่ละกลุ่ม

การตรวจคุณภาพน้ำ

น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำจากบ่อดินที่ใช้ในฟาร์มที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพใด ๆ ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำก่อนและหลังการทดลอง พารามิเตอร์ที่ตรวจ ได้แก่ ออกซิเจน (มิลลิกรัม/ลิตร) อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส: °ซ.) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไนโตรเจน (มิลลิกรัม/ลิตร) ไนเตรท (มิลลิกรัม/ลิตร) แอมโมเนีย (มิลลิกรัม/ลิตร) ความเค็ม (ppt) ความเป็นต่าง (มิลลิกรัม/ลิตร) ความกระด้าง (มิลลิกรัม/ลิตร)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 6 กลุ่ม การทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ฟอรัมาลิน 37% (Formalin) กลุ่มที่ 2 จุนสี (CuSO_4) กลุ่มที่ 3 กรดน้ำส้มเข้มข้น 98% กลุ่มที่ 4 ด่างทับทิม (KMnO_4) กลุ่มที่ 5 ไตรคลอร์ฟอน (Dipterex®) กลุ่มที่ 6 กลุ่มควบคุม ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance) แบบทางเดียว (One-way analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS version 19.0

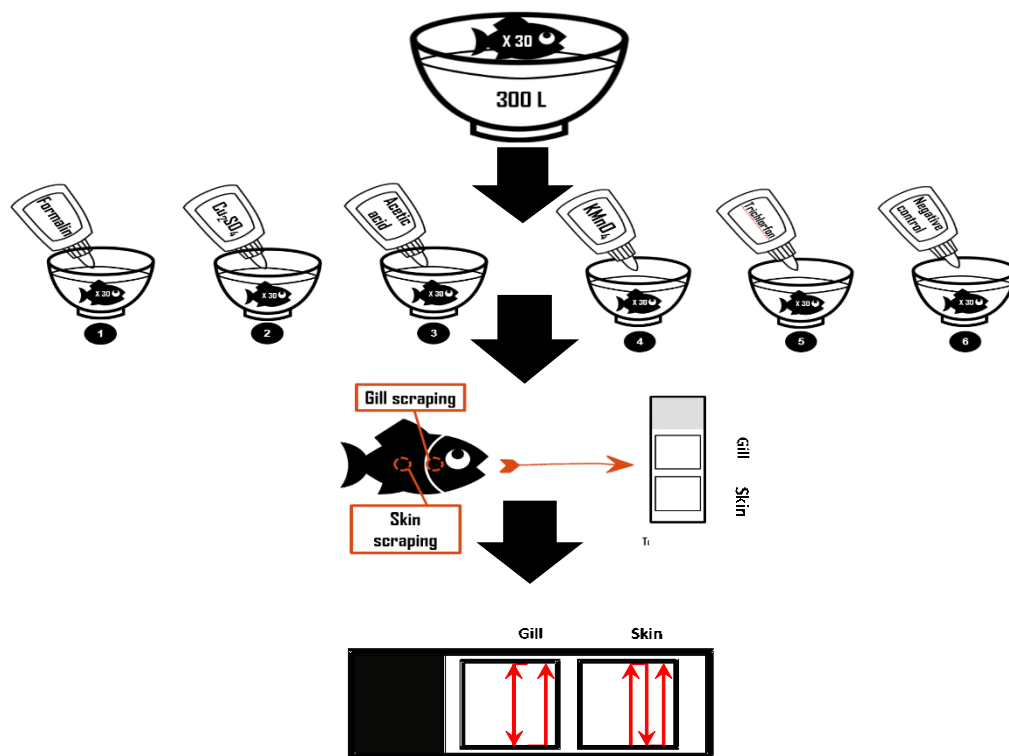


Figure 1 The sampling location and examination position under the light microscope

ผลการวิจัย

การเปรียบเทียบระหว่างจำนวนปรสิตต่อจำนวนปลาที่ติดปรสิตหรือที่เรียกว่า Mean Intensity (MI) และค่าความชุกของโรค หรือที่เรียกว่า Prevalence (P) พบว่าหลังจากมีการใช้ฟอร์มาลิน จุนสี กรดน้ำส้ม ต่างทับทิม ไตรคลอโรฟอน (Dipterex®) และกลุ่มควบคุม มีค่า MI และ P ดังแสดงใน Table 1 และ Figure 1 และ 2

ค่าความชุกของการเกิดโรค (Prevalence) และจำนวนปรสิตต่อจำนวนปลาที่ติดปรสิต (Mean intensity) ของการพบเห็บระฆังที่ผิวหนังและเหงือกปลา พบว่าก่อนรักษาในบ่อการทดลองมีค่า Prevalence และ Mean intensity เฉลี่ยทุกบ่อ เท่ากับ 0.77 และ 4.275 ตามลำดับ หลังจากทดลองให้สารเคมี 6 ชนิด ได้แก่ ฟอร์มาลิน จุนสี

กรดน้ำส้ม ต่างทับทิม และไตรคลอโรฟอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มทดลองที่พบปรสิตลดลงอย่างชัดเจน ได้แก่ ฟอร์มาลิน กรดน้ำส้ม และต่างทับทิม ในขณะที่กลุ่มที่ใช้จุนสี ไตรคลอโรฟอน และกลุ่มควบคุม พบปรสิตมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลตรวจก่อนการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ฟอร์มาลิน กรดน้ำส้ม และต่างทับทิม สามารถกำจัดเห็บระฆังจากตัวปลาได้ โดยการพบและจำนวนเห็บระฆังเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการรักษาด้วยสาร 3 ชนิดนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเห็บระฆังของสารทั้ง 3 ชนิดนี้ กับจุนสีและไตรคลอโรฟอน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (Figure 1 และ 2)

Table 1 Comparison of mean intensity (MI) and prevalence (P) between before and after bath groups with formalin, copper sulfate, acetic acid, potassium permanganate, trichlorfon (Dipterex®) or negative control

Times		Formalin		Copper sulfate		Acetic acid		Potassium permanganate		Trichlorfon (Dipterex®)		Negative control	
		MI	P	MI	P	MI	P	MI	P	MI	P	MI	P
1	Before	2.00	20	1.50	40	4.33	60	2.00	60	1.67	60	1.33	60
	After	0	0	1.80	50	1.00	10	0	0	5.50	100	5.13	80
2	Before	3.50	100	3.00	80	2.70	100	2.56	90	4.11	90	4.22	90
	After	0	0	13.50	100	1.00	40	1.50	40	15.80	100	4.80	100
3	Before	6.75	80	4.14	70	11.20	100	10.44	90	5.60	100	5.90	100
	After	0	0	5.80	50	0	0	2	10	6.50	80	4.22	90

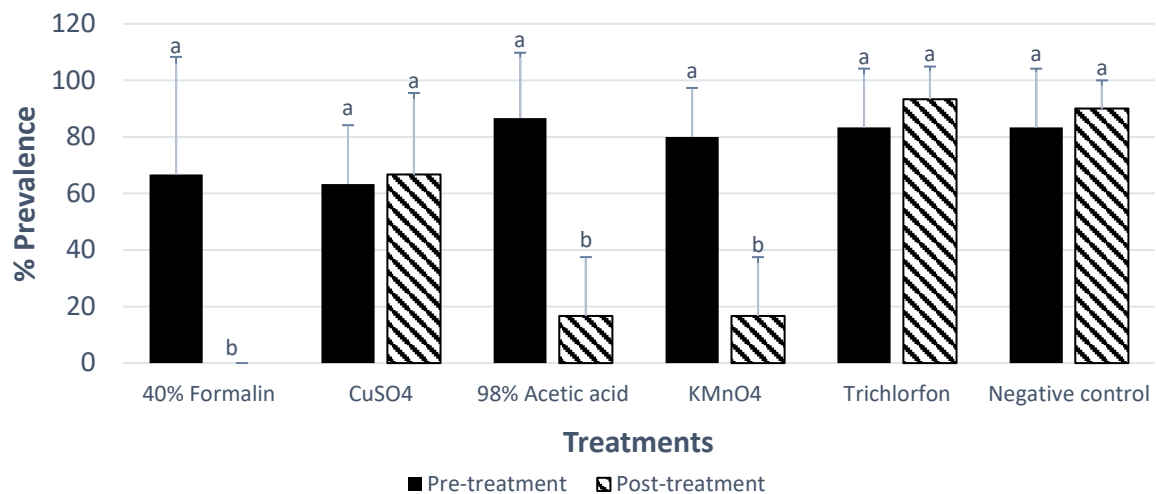


Figure 1 Comparison of prevalence (P) between before and after bath groups with formalin, copper sulfate, acetic acid, potassium permanganate, trichlorfon (Dipterex®) or negative control (mean±SD, n=30); Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups for a given time point.

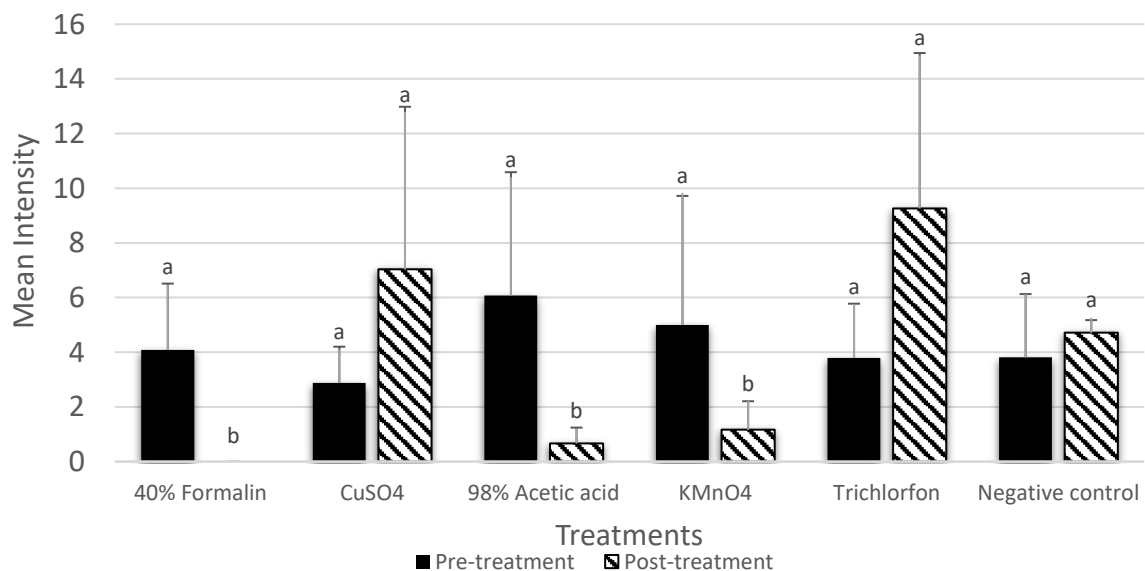


Figure 2 Comparison of mean intensity (MI) between before and after bath groups with formalin, copper sulfate, acetic acid, potassium permanganate, trichlorfon (Dipterex®) or negative control (mean±SD, n=30); Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups for a given time point.

วิจารณ์ผลการวิจัย

การใช้สารเคมีในการกำจัดปรสิตในสัตว์น้ำมีคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปรสิต วงจรชีวิต และสิ่งแวดล้อม การศึกษานี้พบว่า การใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 30 ppm กรดน้ำส้ม 0.25 ppm และด่างทับทิม 2 ppm ในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดเห็บกระด้างที่พบบนตัวปลาได้ ซึ่งพบว่าสารเคมีเหล่านี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย (Tonguthai, 2000) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Rowland *et al.* (2006) ใช้ฟอร์มาลิน 30-40 ppm สามารถกำจัดปลิงในปลา Silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell) แต่ถ้าใช้ฟอร์มาลิน 20-25 ppm สามารถพบการติดเชื้อซ้ำในบ่อเลี้ยงได้ นอกจากนี้การใช้ด่างทับทิม 10-20 ppm แช่เป็นเวลา 30 นาที สามารถกำจัดโปรโตซัวในปลาเทราต์ได้ (Balta *et al.*, 2008)

เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองในพื้นที่จริง คือ ฟาร์มเพาะเลี้ยงปลานิล และใช้น้ำจากบ่อดินที่เลี้ยงปลานิลมาใส่ในบ่อทดลอง ซึ่งน้ำจากบ่อนั้นจะมีตะกอนสารแขวนลอยและอินทรียสารต่าง ๆ อยู่ในปริมาณมาก อาจส่งผลให้สารเคมีบางชนิดที่ใช้ออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงพบว่า ในกลุ่มที่มีการใช้จุลินทรีย์ไตรโคเดอร์มา และกลุ่มควบคุม ตรวจพบปรสิตมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจก่อนการทดลอง ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการทดลองอื่นที่มีการใช้จุลินทรีย์ 1, 2 และ 3 ppm โดยการแช่ที่ความเค็ม 30 ppt เป็นเวลา 10 นาที ในลูกปลานวลจันทร์ทะเล (*Chanos chanos*) ที่ติดปรสิต *Amyloodinium ocellatum* (Virgula *et al.*, 2017) และพบว่าไตรโคเดอร์มา 0.5 ppm สามารถรักษาการติดปลิง (*Myxobolus lugubris*) ในปลาตุ๊ก (*Ictalurus punctatus*) ที่เลี้ยงในบ่อดินได้ (Morrison *et al.*, 1993) ทั้งนี้การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดปรสิตในสัตว์น้ำนั้นควรคำนึงถึงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ รวมทั้งพารามิเตอร์คุณภาพน้ำที่อาจมีผลเกี่ยวข้องกับออกฤทธิ์ของสารเคมีที่ใช้ (Cruz-Lacierda, 2001)

การตัดสินใจเลือกใช้สารเคมีในการรักษาการติดเชื้อปรสิตที่เกิดขึ้นในฟาร์มนั้น นอกจากต้องคำนึงถึงความสำเร็จในการรักษาแล้ว อีกปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือ ราคา ซึ่งเป็นต้นทุนในการผลิตสัตว์น้ำ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบราคาสารเคมีที่ขายในท้องตลาดระหว่างสาร 3 ชนิดนี้ เพื่อประเมินราคาต้นทุนที่ฟาร์มต้องลงทุนเพื่อใช้ในการกำจัดเห็บกระด้าง โดยมีราคาสารเคมีที่ใช้ในการทดลองอ้างอิงจากราคาขายปลีกในท้องตลาด ดังนี้ ฟอร์มาลิน 37% ราคา 30 บาทต่อลิตร คิดเป็นต้นทุนในการใช้กำจัดปรสิตที่ 2.25 บาทต่อตัน จุนสี ราคา 311 บาทต่อกิโลกรัม คิดเป็นต้นทุนในการใช้กำจัดปรสิตที่ 0.07 บาทต่อตัน กรดน้ำส้มเข้มข้นราคา 36 บาทต่อกิโลกรัม คิดเป็นต้นทุนในการใช้กำจัดปรสิต 9 บาทต่อตัน ด่างทับทิม ราคา 130 บาทต่อกิโลกรัม คิดเป็นต้นทุนในการใช้กำจัดปรสิต 0.26 บาทต่อตัน และไตรโคเดอร์มา (Dipterex®) ราคา 250 บาทต่อกิโลกรัม คิดเป็นต้นทุนในการใช้กำจัดปรสิต 0.125 บาทต่อตัน จากราคาที่เปรียบเทียบพบว่าด่างทับทิมมีราคาถูกกว่าฟอร์มาลิน และกรดน้ำส้ม และนอกจากด้านราคาแล้วการตัดสินใจในการเลือกใช้สารเคมีแต่ละชนิดนั้น ยังต้องคำนึงถึงเรื่องของความปลอดภัย และการตกค้างของสารในสัตว์และสิ่งแวดล้อม รวมถึงอันตรายต่อผู้ใช้อย่างยิ่ง ซึ่งฟอร์มาลินเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) และเป็นแก๊สพิษ ดังนั้นผู้ที่ใช้สารเคมีต้องสวมอุปกรณ์ป้องกันและเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท (Ruth, 1996) ด่างทับทิมเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรง อาจทำให้เกิดอันตรายต่อผิวหนัง ดวงตา และส่วนอื่น ๆ ของร่างกายมนุษย์ ทำให้บริเวณที่สัมผัสเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นผู้ที่ทำงานกับสารนี้ควรใช้อุปกรณ์ป้องกัน เช่น ถุงมือ แว่นตา เสื้อผ้าป้องกัน และหน้ากากอนามัยเพื่อป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้น (Marking and Bills, 1975) กรดน้ำส้มสายชูสามารถทำอันตรายต่อผิวหนังและอวัยวะที่สัมผัสได้ ควรป้องกันเช่นเดียวกับการใช้ด่างทับทิม ซึ่งในการศึกษานี้ทางคณะผู้วิจัยจึงแนะนำให้เลือกใช้ด่างทับทิมในการรักษาเห็บกระด้างที่พบในฟาร์มเลี้ยงปลานิลในบ่อดิน เนื่องจากมีราคาถูก ได้ผลดีในการกำจัดเห็บกระด้าง และสลายได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

หากต้องการควบคุม และกำจัดปรสิตให้ได้ผลนั้น ต้องมีการกักโรคอย่างน้อย 15 วัน ถึง 3 เดือน ก่อนที่จะปล่อยปลารวมฝูง สุ่มตรวจปลาทั้งก่อนและระหว่างการเลี้ยง (Assefa and Abunna, 2018) และตรวจคุณภาพน้ำอย่างสม่ำเสมอ หากคุณภาพน้ำไม่เหมาะสมควรรีบทำการแก้ไข เนื่องจากคุณภาพน้ำบางประการ เช่น ความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำสูงขึ้น หรือมีสารอินทรีย์ในน้ำเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเห็บระฆัง (Madsen *et al.*, 2000) สำหรับการป้องกันอาจทำได้โดยการลดปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ปลาเกิดความเครียด หรือมีภูมิคุ้มกันต่ำลง เช่น คุณภาพน้ำไม่ดี การเลี้ยงหนาแน่น อาหารคุณภาพต่ำ เป็นต้น (Madsen *et al.*, 2000) การกักโรคที่ดี และการลดปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้จะสามารถทำให้ปลามีสุขภาพดี แข็งแรง และลดการใช้สารเคมีในการผลิตสัตว์น้ำได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์ม และพนักงานเลี้ยงปลาประจำฟาร์ม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ และการปฏิบัติงานตลอดการทำงานวิจัย และหน่วยสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Assefa, A. and F. Abunna. 2018. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. **Veterinary Medicine International** 2018: 1-10.
- Balta, F.I.K.R.I., S. Kayis and I. Altinok. 2008. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: intensity, seasonality, and their treatments. **Bulletin European Association of Fish Pathologists** 28(4): 157-162.
- Bassleer, G. 1998. Diseases in marine aquarium fish: causes-symptoms-treatment. **The Journal of the Fish Veterinary Society** 2: 76-94.
- Cai, W.-q., S.-f. Li and J.-y. Ma. 2004. 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(1-4): 79-87.
- Chan, B. and B. Wu. 1984. Studies on the pathogenicity, biology and treatment of *Pseudodactylogyrus* for the eels in fish farms. **Acta Zoologica Sinica** 30: 173-180.
- Chang, C.C., P.P. Lee, C.H. Liu and W. Cheng. 2006. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish and Shellfish Immunology** 20(4): 574-585.

- Cruz-Lacierda, E.R. 2001. Parasitic Diseases and Pest. pp. 55-74. *In* **Health Management in Aquaculture**. Tigbauan: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Eissa, A.E., M.M. Zaki and A.A. Aziz. 2010. *Flavobacterium columnare/ Myxobolus tilapiae* concurrent infection in the earthen pond reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during the early summer. **Interdisciplinary Bio Central** 2(2): 5.1-5.9.
- Jee, L.K. and J.A. Plumb. 1981. Effects of organic load on potassium permanganate as a treatment for *Flexibacter columnaris*. **Transactions of the American Fisheries Society** 110(1): 86-89.
- Koyuncu, C.E. and E. Tokşen. 2010. Ectoparasitic Diseases in Freshwater Ornamental Fish and Their Treatments. pp. 683-688. *In* **2nd International Symposium on Sustainable Development**. Sarajevo: International Burch Univerdity-IBU Campus.
- Leal, J.F., M.G.P. Neves and V.I. Esteves. 2018. Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. **Reviews in Aquaculture** 10(2): 281-295.
- Leitritz, E. and R.C. Lewis. 1980. Trout and Salmon Culture: Hatchery Methods. pp. 1-197. *In* **California Fish Bulletin 164**. Oakland: University of California, Division of Agriculture Sciences.
- Lopes, R.B., L.C. Paraiba, P.S. Ceccarelli, V.L. Tornisielo. 2006. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere** 64(1): 56-62.
- Madsen, H.C., K. Buchmann and S. Møllergaard 2000. Association between trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) and water quality in recirculation systems. **Aquaculture** 187(3-4): 275-281.
- Marking, L.L. and T.D. Bills. 1975. Toxicity of potassium permanganate to fish and its effectiveness for detoxifying antimycin. **Transactions of the American Fisheries Society** 104(3): 579-583.
- Morrison, J.R., S.R. Fox and W.A. Rogers. 1993. Control of an infestation of a fish leech (*Myxobdella lugubris*) on catfishes in tanks and earthen ponds. **Journal of Aquatic Animal Health** 5(2): 110-114.
- Natividad, J.M., M.G. Bondad-Reantaso and J.R. Arthur. 1986. Parasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Philippines. pp. 255-259. *In* **Asian Fisheries Forum 26-31 May 1986**. Manila: Asian Fisheries Society.

- Owatari, M.S., F.C. Sterzelecki, C.S. da Silva, C. Magnotti, J.L.P. Mouriño and V.R. Cerqueira. 2020. Amyloodiniosis in farmed *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879): case report of successful therapeutic control with copper sulfate. **Parasitology International** 76: 102091.
- Reardon, I.S. and R.M. Harrell. 1990. Acute toxicity of formalin and copper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. **Aquaculture** 87(3-4): 255-270.
- Rowland, S.J., M. Nixon, M. Landos, C. Mifsud, P. Read and P. Boyd. 2006. Effects of formalin on water quality and parasitic monogeneans on silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell) in earthen ponds. **Aquaculture Research** 37(9): 869-876.
- Ruangpan, L. 1988. Diseases of Cultured Seabass, *Lates calcarifer*. pp. 125-128. *In Training Course On Seabass (Lates calcarifer) Culture in Thailand 1-22 August 1988*. Satul: UNDP/FAO Regional Seafarming Project in Cooperation with the UNDP/FAO/ASEAN Small-scale Coastal Fisheries Development Project.
- Ruth, F. 1996. **Use of formalin to control fish parasites**. 3 p. *In* Research Report. Florida: Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Sharma, M., A. Shrivastav and G. Pandey. 2012. Overviews of the treatment and control of common fish diseases. **International Research Journal of Pharmacy** 3(7): 123-127.
- Shoemaker, C. and P. Klesius. 1997. Streptococcal Disease Problems and Control: A Review. pp. 671-182. *In* Fitzsimmons, K. (ed.). **Tilapia Aquaculture vol. 2**. Ithaca, NY: Northeast Regional Agricultural Engineering Service.
- Smith, S.A. and M.H Schwarz. 2009. Dealing with Trichodina and Trichodina-like Species. pp. 1-3. *In* **Commercial Fish and Shellfish Technology Fact Sheet, Virginia Cooperative Extension Publication 600-205**. Virginia Tech: Virginia State University.
- Tonguthai, K. 2000. The Use of Chemicals in Aquaculture in Thailand. pp. 207-220. *In* **Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996**. Tigbauan: Southeast Asian Fisheries Development Center, Philippines.
- Tucker, C.S. and C.E. Boyd. 1977. Relationships between potassium permanganate treatment and water quality. **Transactions of the American Fisheries Society** 106(5): 481-488.

- Virgula, J.C., E.R. Cruz-Lacierda, E.G. Estante and V.L. Corre Jr. 2017. Copper sulfate as treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida) on milkfish (*Chanos chanos*) fry. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation** 10(2): 365-371.
- Wani, A.A., J. Malik and S.M. Zuber. 2018. Determination of lethal toxicity of copper to *Clarias gariepinus*. **International Journal of Advance Research in Science and Engineering** 7(4): 1011-1018.
- Wildgoose, W.H. and G.A. Lewbart. 2001. Therapeutics. pp. 237-258. **In BSAVA Manual of Ornamental fish.** United Kingdom: BSAVA Library.
- Yanong, R.P. 2010. Use of Copper in Marine Aquaculture and Aquarium Systems. pp. 1-5. **In UF/IFAS Electronic Data Information System.** Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Yu, Y., X. Liu, Y. Lei, S. Zhou, S. Jin, D. Qian, X. Xie, F. Yin and C. Wang. 2020. Anti-parasitic effects and toxicity of formalin on the parasite *Mesanoophrys* sp. of the swimming crab *Portunus trituberculatus*. **Experimental Parasitology** 212: 107886.