วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 39(3):78-88

รูปแบบการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบเพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายใน
Culture Technique for Frog-breeder (*Hoplobatrachus rugulosus*) to Prevent Bacteria (*Mycobacterium* spp.) Infection on Internal Organs

สมเกียรติ ตันตา

Somkiat Tanta

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง 52000

Faculty of Sciences and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna Lampang Lampang, Thailand 52000

*Corresponding author: superherokiat@hotmail.com

Received: *June 18, 2020*
Revised: *June 08, 2021*
Accepted: *September 16, 2021*

Abstract

The objective of this study aims to reduce *Mycobacterium* spp. infection on intimal organs of the frog-breeder. The experimental trials were triplicate divided into five groups, T1: Dry rounded cement tank, T2: Rounded cement tank with water 60:40, T3: Dry squared cement tank, T4: cage on land with water, T5: Floating cage in concrete tank. All experimental group were challenged in the *Mycobacterium* spp. dissemination place. The frog-breeders were stocked at fifteen frogs per square meter. The frog-breeders; the overall weight percentages increase of flog broodstock in the different rearing type were 0.00±20.99, 44.25±56.34, 0.26±5.16, 20.00±6.78 and 16.23±8.10, respectively. There was a significant difference in weight gain of group 1 compared to group 2, 4 and 5 ($p<0.05$). The survival rate of frog-breeder in the different environments were 90.63±6.25, 100±0.00, 93.47±7.53, 97.91±1.39 and 97.91±1.39%, respectively. The highest survival rate was observed in group which frog-reared in the half-water rounded cement tank (Group 2) and it had a significant difference from reared groups 1 and 3 ($p<0.05$). The biopsy results, there was no detected of *Mycobacterium* spp. In the group 2 by PCR method. Furthermore, the frog tadpoles of the frog breeding in group 2 were showed a normally growth rate.

Keywords: *Mycobacterium* spp., frog, tadpole, frog-breeder technique

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. ในอวัยวะภายในของพ่อแม่พันธุ์กบ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในบ่อซีเมนต์กลมแบบทั่วไป (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในบ่อซีเมนต์กลมครึ่งบกครึ่งน้ำสัดส่วน 60:40 ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในบ่อสี่เหลี่ยม ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในกระชังบก ชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในกระชังลอยน้ำในบ่อซีเมนต์ ทำการทดลองในสถานที่ที่มีการระบาดของเชื้อ *Mycobacterium* spp. โดยปล่อยพ่อแม่พันธุ์กบนาลงเลี้ยงในอัตราส่วน 15 ตัวต่อตารางเมตร ภายหลังการทดลอง 3 เดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักรวมของพ่อแม่พันธุ์กบที่เลี้ยงในรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกัน มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 0.00±20.99, 44.25±56.34, 0.26±5.16, 20.00±6.78 และ 16.23±8.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชุดการทดลองที่ 1 มีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ 2, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการศึกษาอัตราการรอดตายของพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกัน มีค่าเท่ากับ 90.63±6.25, 100±0.00, 93.47±7.53, 97.91±1.39 และ 97.91±1.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดตายของพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในบ่อกลมครึ่งบกครึ่งน้ำไม่พบการตายของพ่อแม่พันธุ์ ทำให้มีอัตราการรอดตายที่สูงที่สุด และเมื่อนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชุดการทดลองที่ 2 มีความแตกต่างจากชุดการทดลองที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการตรวจชิ้นเนื้อเพื่อหาเชื้อ *Mycobacterium* spp. จากห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ปรากฏว่าไม่พบเชื้อ *Mycobacterium* spp. ในชุดการทดลองที่ 2 และเมื่อนำพ่อแม่พันธุ์กบจากชุดการทดลองที่ 2 ไปเพาะขยายพันธุ์ พบว่าลูกอ๊อดมีอัตราการเจริญเติบโตเป็นปกติ

คำสำคัญ: ไมโครแบคทีเรีย กบนา ลูกอ๊อด รูปแบบการเลี้ยง

คำนำ

กบนาเป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทยและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เนื่องจากเนื้อกบเป็นอาหารโปรตีนที่มีรสดี เป็นที่นิยมบริโภคทั่วไปและมีประโยชน์หลายประการ เช่น ใช้ในการศึกษาค้นคว้าวิจัยทางชีววิทยา การแพทย์และมีความสำคัญต่อสภาวะแวดล้อมในการควบคุมและกำจัดแมลง (Amatayakool *et al*., 1995)

อาชีพการเพาะเลี้ยงกบในปัจจุบันสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างมากมาย (Kusuma Na Ayudhya, 2020) และกำลังเป็นที่สนใจของผู้ประกอบการรายใหม่ที่ต้องการมีอาชีพและรายได้เหมือนกับกลุ่มคนที่ประสบผลสำเร็จ ทั้งนี้มีเกษตรกรอีกไม่น้อยที่ต้องพบกับปัญหาในการเพาะเลี้ยงสัตว์ชนิดนี้เนื่องจากโรคระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงซึ่งเชื้อโรคในปัจจุบันก็มีการพัฒนาด้านความรุนแรงมากขึ้น (Thip-uten *et al*., 2019) สวนทางกับเกษตรกรที่ยังมีความรู้และความเข้าใจในการจัดการด้านสุขาภิบาลน้อยมากอาจเป็นเพราะมุ่งเน้นในเชิงธุรกิจมากกว่าความยั่งยืนทำให้มีการปล่อยพันธุ์กบลงเลี้ยงหนาแน่นเกินไป บางรายก็มีการจัดการด้านสุขาภิบาลฟาร์มอย่างไม่ถูกต้องหรืออาจเลี้ยงกบผิดวิธีซึ่งปัจจัยเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคตามมาหลายโรค บางโรคสามารถติดต่อสู่คนได้ถ้าไม่มีความรู้ความเข้าใจในการป้องกันตัวเอง ยกตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium* spp. (Koanantakool *et al*., 2002) มีรายงานการระบาดของเชื้อนี้ครั้งแรกในจังหวัดลำปาง ปีพุทธศักราช 2557 (Tanta, 2017) อีกทั้งเชื้อ *Mycobacterium* spp.

ยังสามารถถ่ายทอดทางสายเลือดได้ด้วย (Chinabut *et al.*, 1994) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ลูกอ๊อดตายหลังจากการฟักตัว 7-10 วัน โดยจะแสดงอาการเบื่ออาหาร (anorexia) ผอมโซ (emaciation) กระดูกสันหลังผิดรูป (vertebral deformities) สีของตัวกบซีดลง (loss of normal coloration) และมีภาวะตาขาว คอเอียงร่วมด้วย พบก้อนเนื้อเยื่ออักเสบหรือตุ่มก้อน (granuloma) สีขาวขุ่นตามอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น ตับ ม้าม ไต ปอด และระบบทางเดินอาหาร การวินิจฉัยโรคทำได้โดยสังเกตจากอาการและรอยโรค และมีการเพาะแยกพร้อมทั้งพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย (Tanta, 2017) โรคที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium* spp. ได้สร้างความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันเชื้อตัวนี้ได้แพร่ระบาดไปทั่วประเทศโดยเฉพาะจังหวัดพิจิตร สุพรรณบุรี ชัยนาท พระนครศรีอยุธยา กรุงเทพมหานคร ชลบุรี ลำพูน พะเยา อุบลราชธานี และสุรินทร์ ดังนั้นงานวิจัยเรื่องนี้จะช่วยให้เกษตรกรทั่วประเทศปรับเปลี่ยนวิธีการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบให้ถูกต้อง โดยการนำรูปแบบการเลี้ยงแบบใหม่นี้ไปใช้กับฟาร์มเพาะเลี้ยงกบต่อไป

ลักษณะอวัยวะภายในของกบที่มีการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ซึ่งรอยโรคปรากฏชัดเจนบริเวณอวัยวะภายในที่พบคือ ตับมีลักษณะเป็นจุดสีขาวครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร กระจายอยู่ทั่วบริเวณตับ (Figure 1)

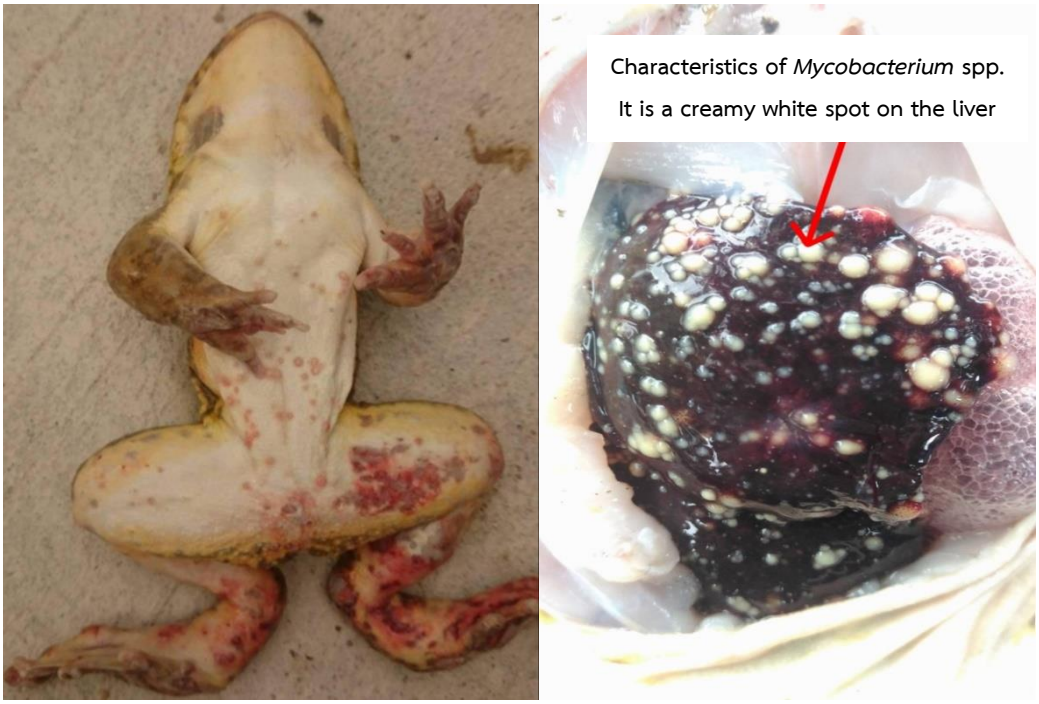


Figure 1 Frog disease caused by *Mycobacterium* spp. infection showed white nodules in internal organs

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในรูปแบบที่ต่างกันโดยทำการทดลอง 5 ชุด ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในบ่อซีเมนต์กลมแบบทั่วไป (ชุดควบคุม) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เมตร

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในบ่อซีเมนต์กลมครึ่งบกครึ่งน้ำสัดส่วน 60:40 ทำการเทพื้นบ่อในส่วนของพื้นที่บกให้สูงขึ้น 2 นิ้ว

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในบ่อสี่เหลี่ยมซีเมนต์ ขนาด 1.4×1.25 เมตร

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในกระชังบก ขนาด 1.4×1.25 เมตร

ชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบในกระชังลอยน้ำในบ่อซีเมนต์ ขนาด 1.4×1.25 เมตร

การเตรียมสัตว์ทดลอง ใช้พ่อแม่พันธุ์กบอายุ 10 เดือน จำนวน 15 ตัวต่อตารางเมตรที่ปลอดเชื้อ (น้ำหนักเฉลี่ย 10.63±1.63 กิโลกรัม) โดยการสุ่มตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* spp. ด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นการสกัดสารพันธุกรรม DNA ของเชื้อที่ต้องการจากตัวอย่างที่ส่งตรวจ โดยการสกัด DNA จากเนื้อเยื่อลำไส้และตับ) (Sritan *et al.,* 2013) จากนั้นทำการปล่อยพ่อแม่พันธุ์ลงเลี้ยงในอัตราส่วน 15 ตัวต่อตารางเมตร โดยเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบ 26 ตัวต่อ 1 หน่วยการทดลอง ทำการเก็บข้อมูลและบันทึกผลด้านการเพิ่มขึ้นของน้ำหนัก อัตราการรอดตายและภาวะการติดเชื้อ ทำการศึกษา ในสถานที่เกิดการระบาดของเชื้อ *Mycobacterium* spp. สาขาวิชาประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง

การเตรียมพื้นที่ทดลอง เนื่องจากพื้นที่ในการทดลองมีการระบาดของเชื้อ *Mycobacterium* spp. โดยทำความสะอาดบ่อและสถานที่เลี้ยงด้วยกรดเกลือ HCl และผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างห้องน้ำให้ทั่วบริเวณและตากบ่อให้แห้งหลังจากนั้น 2-3 วัน ทำการปล่อยพ่อแม่พันธุ์กบลงเลี้ยง ให้อาหารกบแบบกินจนอิ่ม (ad libitum) วันละ 1 ครั้ง เป็นอาหารกบสำเร็จรูป เปอร์เซ็นต์โปรตีน 30% และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำก่อนและหลังให้อาหารทุกวัน ในการทดลองใช้น้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยคลอรีนจากระบบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง

การตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักและอัตราการรอดตาย ก่อนปล่อยพ่อแม่พันธุ์กบลงเลี้ยงในแต่ละชุดการทดลองทำการชั่งน้ำหนักรวมในแต่ละหน่วยการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการนับจำนวนพ่อแม่พันธุ์กบที่รอดตายและนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้ 1) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Percent weight Gain) 2) อัตราการรอดตาย (Survival rate)

สูตรการคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น} = \frac{\text{น้ำหนักกบเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกบเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{น้ำหนักกบเริ่มการทดลอง}} \times 100$$

สูตรการคำนวณอัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{อัตราการรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนกบเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกบเริ่มต้น}} \times 100$$

การตรวจสอบการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ทำการสุ่มตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์กบทุก ๆ 1 เดือน เดือนละ 1 ตัว ไปตรวจชิ้นเนื้อ โดยการสุ่มตัวอย่างจากการนำพ่อ-แม่พันธุ์กบในบ่อ 1 ตัว ทุกชุดการทดลอง ด้วยการจับใส่ถุงพลาสติกขนาด 18×28 นิ้ว แล้วอัดออกซิเจนลงในถุงพลาสติดนำส่งตัวอย่างไปตรวจ ณ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการทดลอง 3 เดือน จากการสุ่มตรวจและการนำกบไปชันสูตรโรค มีการทำอย่างระมัดระวังส่งผลให้ไม่มีผลต่ออัตราการตายของกบ

การวิเคราะห์ข้อมูล เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการรอดตายมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วย Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ลักษณะภายในบ่อซีเมนต์กลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เมตร ซึ่งได้ทำแท่นซีเมนต์สูง 2 นิ้ว สัดส่วนพื้นที่บกต่อน้ำเท่ากับ 60:40 เปอร์เซ็นต์เพื่อให้กบขึ้นมาพักบนพื้นที่บก (ชายหาด) ป้องกันไม่ให้กบพ่อแม่พันธุ์แช่น้ำตลอดเวลา (Figure 2)

Figure 2 Unseen internal rounded cement tank for frog-breeder

ลักษณะภายนอกของบ่อซีเมนต์กลมที่ออกแบบมาใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. โดยได้ทำการต่อที่ระบายน้ำทิ้งพร้อมทั้งใส่วาล์วปิดเปิดน้ำเพื่อควบคุมการไหลของน้ำ และลดการสัมผัสภายในบ่อกบโดยตรง (Figure 3)

Figure 3 External appearance of rounded cement tank for decease frog touching rate

ผลการวิจัยและวิจารณ์

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักรวมที่เพิ่มขึ้นของพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงด้วยรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกัน พ่อแม่พันธ์กบนาที่เลี้ยงในรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกัน มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย เท่ากับ 0.00±20.99, 44.25±56.34, 0.26±5.16, 20.00±6.78 และ 16.23±8.10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักรวม (หน่วยต่อผลผลิต) ในชุดการทดลองที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ (Table 1) พบว่าบ่อซีเมนต์กลมครึ่งบกครึ่งน้ำมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมากที่สุด กบพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์กลมธรรมดาพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเนื่องจากมีการตายในระหว่างการทดลอง โดยการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบนาในรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกันมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของพ่อแม่พันธุ์กบนามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 1) สอดคล้องกับงานทดลองของ (Upnanchai *et al*., 2005) ได้ศึกษาการเลี้ยงกบนาในบ่อซีเมนต์ด้วยความหนาแน่นที่แตกต่างกันคือ 10, 20, 30, 40 และ 50 ตัวต่อตารางเมตรพบว่าการเลี้ยงกบนาตัวเต็มวัยที่อัตราความหนาแน่นที่ 10 ตัวต่อตารางเมตรมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวที่มากที่สุดซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 1 The weight of frog brood stock in different rearing type

Experimental sets	Percent weight gain
T1 (Dry rounded cement tank)	0.00 ± 20.99^{b}
T2 (Rounded cement tank with water 50%)	44.25 ± 56.34^{a}
T3 (Dry squared cement tank)	0.26 ± 5.16^{b}
T4 (Cage on land with water)	20.00 ± 6.78^{ab}
T5 (Floating cage in concrete tank)	16.23 ± 8.10^{ab}

The different of English alphabets showed the different values by significant with $p<0.05$.

ผลการศึกษาอัตราการรอดตายของพ่อแม่พันธุ์กบนา อัตราการรอดตายของพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกัน มีค่าเท่ากับ 90.63±6.25, 100±0.00, 93.48±7.53, 97.92±1.39 และ 97.92±1.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดตายของพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในบ่อกลมครึ่งบกครึ่งน้ำ (T2) มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด และการเลี้ยงในรูปแบบการเลี้ยงที่ต่างกันมีผลทำให้อัตราการรอดตายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 2) แตกต่างจากการทดลองของ Thonklongsy *et al.* (2011) ได้ศึกษาการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงกบลูกผสมในบ่อซีเมนต์กระชังและบ่อดิน พบว่ารูปแบบการเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและการเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ทำให้ลูกกบมีอัตรารอดดีที่สุด รองลงมาคือ การเลี้ยงในกระชังและบ่อดิน ตามลำดับ

Table 2 The survival rate of frog-breeder in the different environments

Experimental sets	The Survival rate
T1 (Dry rounded cement tank)	90.63±6.25[b]
T2 (Rounded cement tank with water 50%)	100±0.00[a]
T3 (Dry squared cement tank)	93.48±7.53[ab]
T4 (Cage on land with water)	97.92±1.39[b]
T5 (Floating cage in concrete tank)	97.92±1.39[b]

The different of English alphabets showed the different values by significant with $p<0.05$.

ผลการตรวจเชื้อ *Mycobacterium* spp. นำพ่อแม่พันธุ์กบนาทุกชุดการทดลอง ไปตรวจเชื้อ *Mycobacterium* spp. โดยหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในกระชังบก (T4) และพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในกระชังน้ำ (T5) มีการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. และไม่พบเชื้อ *Mycobacterium* spp.จากชุดการทดลองอื่น ๆ แต่จากการชันสูตรลักษณะผิดปกติของพ่อแม่พันธุ์กบที่ตายระหว่างการทดลองพบว่า การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบนาในบ่อซีเมนต์กลมธรรมดาชุดควบคุม (T1) บ่อสี่เหลี่ยม (T3) กระชังบก (T4) และกระชังน้ำ (T5) พบการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp.ของอวัยวะภายใน โดยจะพบจุดแดง ๆ ตามขา ใต้ท้อง หรือพบแผลที่เท้าและลำตัว นอกจากนี้ยังพบก้อนตุ่มสีขาวขุ่นที่อวัยวะภายใน บริเวณตับ กระเพาะอาหารและลำไส้ ในอัตราร้อยละ 38.4, 30.8, 15.4 และ 23.1 ตามลำดับ ส่วนบ่อครึ่งบกครึ่งน้ำ (T2) ไม่ปรากฏการตายและไม่พบเชื้อ *Mycobacterium* spp. จากการตรวจโรคโดยหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Table 3) จากผลการตรวจเชื้อ *Mycobacterium* spp. พบว่าพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในกระชังบกและกระชังน้ำมีการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. สาเหตุเกิดจากลักษณะการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบนามีการแช่น้ำในบ่อเลี้ยงที่มีการขับถ่ายของเสียตลอดเวลา ทำให้กบติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. ได้ง่ายกว่าการเลี้ยงในบ่อครึ่งบกครึ่งน้ำ เนื่องจากบ่อครึ่งบกครึ่งน้ำมีพื้นที่บกเพื่อให้กบอาศัย รวมทั้งมีการกำจัดของเสียได้ดีกว่า ลดการสะสมของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้กบมีอัตรารอดตายสูง

Table 3 Detection of *Mycobacterium* spp. infection in different rearing type of frog brood stock

Experimental sets	Disease examination results
T1 (Dry rounded cement tank)	Positive
T2 (Rounded cement tank with water 50%)	Negative
T3 (Dry squared Cement Tank)	Positive
T4 (Cage on land with water)	Positive
T5 (Floating cage in concrete tank)	Positive

Positive result mean *Mycobacterium* spp. infection, negative result mean non *Mycobacterium* spp. infection.

ผลของการเพาะขยายพันธุ์ หลังจากสิ้นสุดการการทดลองได้นำพ่อแม่พันธุ์กบนาที่พร้อมผสมพันธุ์ในชุดการทดลองที่ 1, 3, 4, และ 5 ที่ตรวจพบว่ามีการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ทั้งผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการและลักษณะผิดปกติหลังจากการตาย โดยทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์นำไปเพาะขยายพันธุ์ในบ่อซีเมนต์ขนาด 3×4 เมตร ผลปรากฏว่าลูกอ๊อดในชุดทดลองที่ 1, 3, 4, และ 5 มีการตายในช่วงระยะเวลา 7-10 วัน อัตราการตาย 100% ในส่วนของชุดทดลองที่ 2 ทำการคัดเลือกและเพาะขยายพันธุ์ พบว่าลูกอ๊อดมีอัตราการเจริญเติบโตปกติดี และเมื่อนำลูกอ๊อดจากทุกชุดการทดลองที่ 1, 3, 4, 5 ไปส่งตรวจโดยวิธี PCR เพื่อหาเชื้อ *Mycobacterium* spp. ผลปรากฏว่าลูกอ๊อดในชุดทดลองที่ 1, 3, 4, และ 5 มีการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp.

ลักษณะการตายของลูกอ๊อดระยะ 7-10 วัน หลังจากฟักเป็นตัวที่มีการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ก่อนการตายจะมีอาการว่ายน้ำทุรนทุราย ไม่ยอมกินอาหาร กัดกัน ตัวลีบ หัวโต หลังจากนั้นจะตายเกือบทั้งหมดภายใน 12 ชั่วโมง อาการตายของลูกอ๊อดตาย 100% จึงเรียกการตายแบบนี้ว่าตายด่วน ซึ่งอาการแบบนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง (Figure 4)

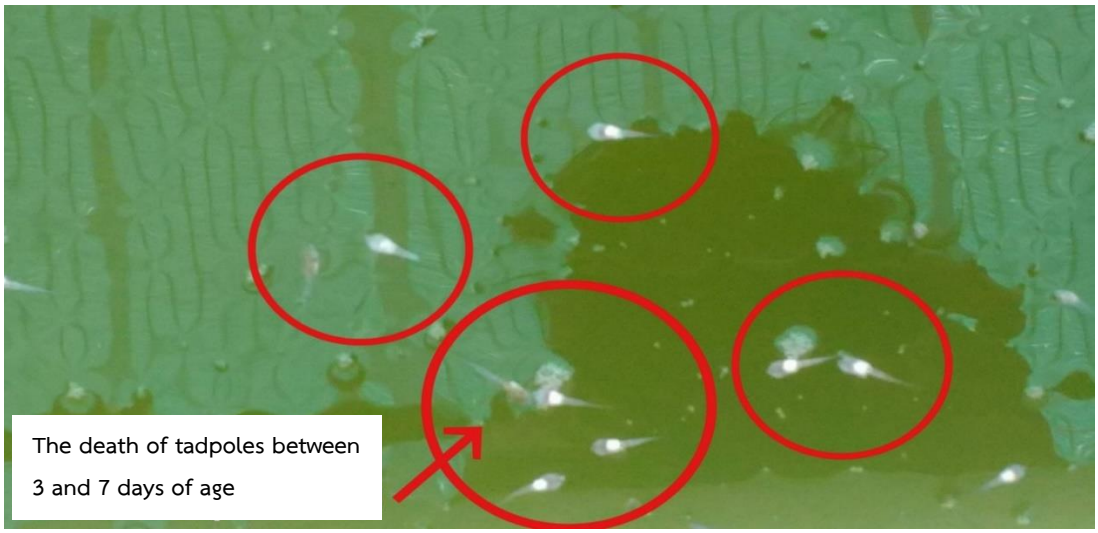
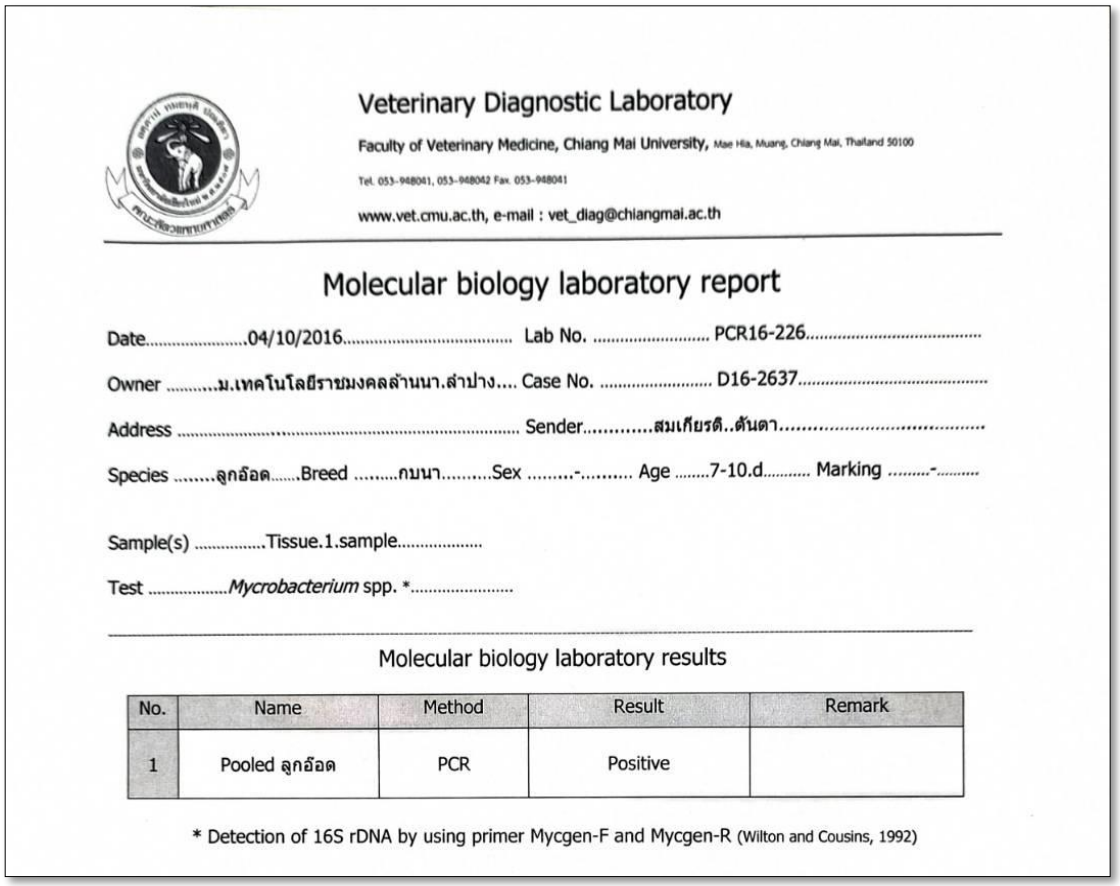


Figure 4 Death appearance of tadpoles after hatching 7-10 days

เมื่อนำตัวอย่างลูกอ๊อดไปตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) ผลปรากฏว่าตัวอย่างที่นำส่งตรวจมีผลเป็นบวก (Figure 5)



Veterinary Diagnostic Laboratory

Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Mae Hia, Muang, Chiang Mai, Thailand 50100

Tel. 053-948041, 053-948042 Fax. 053-948041

www.vet.cmu.ac.th, e-mail : vet_diag@chiangmai.ac.th

Molecular biology laboratory report

Date.....04/10/2016..... Lab No. ..... PCR16-226.....

Owner .....ม.เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.ลำปาง.... Case No. ..... D16-2637.....

Address ..... Sender.....สมเกียรติ..ต้นตา.....

Species .....ลูกอ๊อด.....Breed .....กบนา.....Sex .....-..... Age .....7-10.d..... Marking .....-.....

Sample(s) .....Tissue.1.sample.....

Test .....*Mycrobacterium* spp. *.....

Molecular biology laboratory results

No.	Name	Method	Result	Remark
1	Pooled ลูกอ๊อด	PCR	Positive	

* Detection of 16S rDNA by using primer Mycgen-F and Mycgen-R (Wilton and Cousins, 1992)

Figure 5 Detection of *Mycobacterium* spp. infection from laboratory test

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษารูปแบบการเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในพบว่า การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงในบ่อกลมครึ่งบกครึ่งน้ำมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมากที่สุด 44.25 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดตายของพ่อแม่พันธุ์กบนาในบ่อครึ่งบกครึ่งน้ำมีอัตราการรอดตายสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ การติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ในอวัยวะภายในของพ่อแม่พันธุ์กบนาในบ่อครึ่งบกครึ่งน้ำ ไม่พบการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ในอวัยวะภายใน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบนาที่เหมาะสมที่สุด เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายใน คือ การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบนาในบ่อซีเมนต์กลมแบบครึ่งบกครึ่งน้ำในสัดส่วนพื้นที่บกต่อพื้นที่น้ำเท่ากับ 60:40 พร้อมทั้งใช้เทคนิคการฆ่าเชื้อบ่อด้วยกรดเกลือ (HCl) และผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างห้องน้ำก่อนนำพ่อแม่พันธุ์กบนาลงบ่อเลี้ยงและใช้เทคนิคเปลี่ยนถ่ายน้ำก่อนและหลังให้อาหารทุกมื้อพร้อมกับรักษาความสะอาดสถานที่เลี้ยงโดยเฉพาะผู้ที่ดูแลจะต้องหลีกเลี่ยงสัมผัสพ่อแม่พันธุ์กบนาโดยตรง

การป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียในกบนา ทำได้โดยการไม่สัมผัสกับกบนาโดยตรงควรมีเครื่องป้องกัน เช่น ถุงมือ รองเท้าบู๊ทและต้องป้องกันการปนเปื้อนจากสัตว์อื่น เช่น นก หนู หรือสัตว์อื่น ๆ รวมทั้งควรเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กบนาในร่มเพื่อป้องกันการเทไข่เมื่อฝนตก และนำเทคนิควิธีการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ที่ได้ผลในการทดลองครั้งนี้ไปทดลองใช้กับฟาร์มที่ประสบปัญหาในภูมิภาคต่าง ๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้ให้ทุนในการวิจัยครั้งนี้ คกส.รหัส RMUTL-IACUC 004/2022

เอกสารอ้างอิง

Amatayakool, C., B. Chawpakanam, J. Udomkarn, S. Samanojitrakul, P. Sirpatprasit, A. Imsil and D. Nantamonkolul. 1995. ***Rana rugulosa* - Common Lowland Frog (*Rana rugulosa*, Wiegmann)**. Bangkok: Inland Fisheries Research and Development Division, Department of Fisheries. 130 p. [in Thai]

Chinabut, S., Y. Kanayati and T. Pungkachonboon. 1994. Study of Transovarian Transmission of Mycobacteria in Betta Splendens Regens. pp. 339-341. *In* **Proceedings of Third Asian Fisheries Forum, 26-30 October 1992**. Singapore: Asian Fisheries Society.

Koanantakool, K., T. Somsiri, S. Puthinawarat and S. Suntornwit. 2002. Contamination of *Mycobacterium* spp. in living feed. **Department of Fisheries Journal** 55(2): 107-119. [in Thai]

Kusuma Na Ayudhya, T. 2020. **Raising frogs to create jobs and make money at Phanom Sarakham, Chachoengsao.** [Online]. Available https://www.technologychaoban.com/fishery-technology/article_29777 (16 June 2021). [in Thai]

Sritan, J., K. Boonsri, A. Sirimalaisuwan and K. Pringproa. 2013. Mycobacterial infection (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*) in the parrot eclectus (*Eclectus roratus*). **Chiang Mai Veterinary Journal** 11(3): 271-276. [in Thai]

Tanta, S. 2017. *Mycobacterium* spp. found in frogs and tadpoles**. The Upper Northern Animal Health Newsletter**. (25 January 2018): 14-15. [in Thai]

Thip-uten T., S. Arungamol, S. Butdawong and S. Thip-uten. 2019. Frog raising condition and diseases finding in Sakon Nakhon and Nakhon Phanon Provinces. **Journal of Fisheries Technology Research** 13(1): 105-116. [in Thai]

Thonklongsy, T., W. Pomsema, W. Ratanawichai and C. Pukingngen. 2011. Development of a hybrid frog culture model in cement ponds, floating ponds and earthen ponds. pp. 38-43. *In* **Proceedings of Kon Kaen University, 27-29 January 2011**. Kon Kaen: Kon Kaen University. [in Thai]

Upnanchai, A., S. Sripat and P. Singsom. 2005. **Rearing of frogs in cement tanks at different density rates**. 38 p. *In* Academic Documents Issue 11/2005. Bangkok: In land Fisheries Research and Development Department. [in Thai]