



การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของคลอรีนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันใน น้ำทะเลสำหรับการเลี้ยงปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

วรรณิ ศิริมานะพงษ์^{1,*} นัฐริกา ยิ่งบุญ² ณัฏชา ทองเรือง² ทศพล บัวแก้ว² ธนาวิ หมั่นเทียนติพันธ์²
และรดา รังสิติยากร²

¹ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข; ²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170 ประเทศไทย

บทคัดย่อ: น้ำทะเลจัดเป็นแหล่งน้ำสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาน้ำกร่อยและปลาทะเล น้ำทะเลธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคลอรีนที่ความเข้มข้น (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm) ในการใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลก่อนนำมาเลี้ยงลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) พบว่าน้ำทะเลที่ใส่คลอรีนความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm จะสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น (40, 50 และ 60 ppm) หลังจากการเตรียม 24 ชั่วโมง สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า 80% เมื่อนำน้ำทะเลที่มีเปอร์เซ็นต์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (40, 50, และ 60 ppm) มาใช้ในการทดสอบเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนก่อนการเลี้ยงปลากะพงขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลก่อนการเลี้ยงปลากะพงขาวคือ 60 ppm เนื่องจากกำจัดแบคทีเรียในน้ำทะเลได้มากกว่า 99% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำทะเลธรรมชาติที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ($P < 0.05$) และควรพักน้ำอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อป้องกันการเกิดพิษจากการตกค้างของคลอรีนในน้ำทะเล

คำสำคัญ: ปลากะพงขาว คลอรีน การฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเล

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2563. 15(1): 81-92.

E-mail address: wanna.sir@mahidol.edu

Comparing the Bactericidal Effect of Different Chlorine Concentrations in Seawater for Giant perch (*Lates calcarifer*) Culturing

Wanna Sirimanapong^{1,#}, Nattika Yingbun², Natcha Thongrueang², Todsapon Buakaew²,
Tanawalee Mantiantipan², and Rata Rungsitayakorn²

¹Department of Clinical Science and Public Health; ²Faculty of Veterinary Science, Mahidol University,
Salaya Sub-District, Phutthamonthon District, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Abstract: Seawater is generally resource of water for brackish or marine fish aquaculture. The natural seawater composed of many microorganism's cause of disease in aquaculture. This study aimed to compare efficiency of chlorine at various concentrations (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 ppm) to kill bacteria in seawater before culturing fingerling giant perch (*Lates calcarifer*). The amount of bacteria in the seawater were significantly reduce in 10, 20, 30, 40, 50 and 60 ppm of chlorine concentrations ($P<0.05$). Moreover, 80% bactericidal effect was found in the treated seawater at 40, 50 and 60 ppm after 24 hours of water preparation. The effective bactericidal concentration (40, 50 and 60 ppm) of the seawater was used for culturing fingerling giant perch for 24 hours. After 24 hours of fish culturing, the number of bacteria increased in the chlorine treated group when compared to the treated seawater before fish culturing ($P<0.05$). Therefore, the optimal concentration for killing bacteria in seawater before culturing giant perch was 60 ppm when compared to the number of bacteria in the untreated natural seawater with significantly different ($P<0.05$). Since, it eliminated more than 99% bacteria in the seawater. More than 24 hours treated seawater should be consideration for culturing giant perch to prevent chlorine toxicity.

Keywords: Giant perch, Chlorine, Seawater disinfection

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2020 15(1): 81-92.

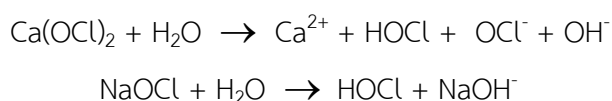
E-mail address: wanna.sir@mahidol.edu

บทนำ	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเล หากแต่การนำน้ำทะเล
น้ำทะเลจากธรรมชาติประกอบไปด้วยแร่ธาตุ	จากธรรมชาติมาใช้นั้นมีความเสี่ยงที่จะพบเชื้อจุลินทรีย์
ต่างๆ ที่อุดมสมบูรณ์เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ใน	อื่น ๆ ปนเปื้อนมาด้วย เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว และ

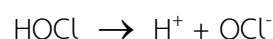
ไวรัส (Austin, 1988; Suttle, 2007) ซึ่งเชื้อจุลชีพบางชนิดสามารถก่อโรคในสัตว์น้ำทะเลที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ ยกตัวอย่างเช่น โรค vibriosis (Vibriosis) ที่ถือเป็นโรคที่พบได้บ่อยในกุ้ง หอย และปลา อันเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. (Martinez-Picado et al., 1996) โดยในปลาจะมีอาการติดเชื้อในกระแสเลือด ก่อให้เกิดจุดเลือดออกและเนื้อตายตามอวัยวะต่างๆ และอาจพบแผลหลุมตามลำตัว (Egidius, 1987) นอกเหนือจากโรค vibriosis แล้ว ยังมีโรคอื่น ๆ อีก เช่น โรค streptococcosis (Streptococcosis) อันเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* spp. โรคแผลตามลำตัว (Ulcerative disease) อันเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. โรคจุดขาว (White spot disease) อันเกิดจากโปรโตซัวในสกุล *Cryptocaryon* หรือโรคอิริโดไวรัส (Iridovirus disease) อันเกิดจากไวรัสในกลุ่ม iridovirus เป็นต้น (Sudthongkong et al., 2002) ซึ่งการเกิดโรคต่าง ๆ เหล่านี้ขึ้นในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจตามมา (Lafferty et al., 2015)

ดังนั้นการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อลดจำนวนเชื้อจุลชีพที่ปนเปื้อนในน้ำก่อนจะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเล ซึ่งวิธีการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต การใช้ก๊าซโอโซน การใช้ระบบกรอง การใช้ความร้อน และการใช้ยาปฏิชีวนะ (Chang et al., 1998; Frerichs et al., 2000; Liltved and Cripps, 1999; Whipple and Rohovec, 1994) อย่างไรก็ตามวิธีการต่างๆ เหล่านี้มีข้อเสียค่อนข้างมาก เช่น มีราคาสูง ใช้เครื่องมือที่

ยุ่งยากซับซ้อน หากผิดพลาดอาจเกิดความเป็นพิษกับสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยง หรือทำให้เกิดเชื้อดื้อยา เป็นต้น (Bullock et al., 1997; Liltved et al., 1995; Reilly and Käferstein, 1997) ด้วยเหตุนี้การใช้คลอรีนในการฆ่าเชื้อจึงถือเป็นวิธีที่นิยมมากกว่า เนื่องจากมีราคาถูก อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อทั้งแบคทีเรีย โปรโตซัวและไวรัส (Arimoto et al., 1996) คลอรีนที่นิยมใช้โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของ hypochlorite ได้แก่ calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) และ sodium hypochlorite (NaOCl) ซึ่งเมื่อเติมสารประกอบเหล่านี้ในน้ำจะเกิดปฏิกิริยาดังสมการ



โดย hypochlorous Acid (HOCl) บางส่วนจะสามารถแตกตัวได้ hypochlorite ion (OCl^-) ดังสมการ



ความสามารถในการออกฤทธิ์ของคลอรีนจะขึ้นอยู่กับปริมาณของคลอรีนอิสระ (free available chlorine) อันได้แก่ HOCl และ OCl^- ซึ่ง HOCl จะออกฤทธิ์ได้รุนแรงกว่า OCl^- 80-200 เท่า โดยที่การเปลี่ยนจาก OCl^- เป็น HOCl นั้นจะขึ้นกับ pH ของน้ำ ถ้า pH ของน้ำยังต่ำ OCl^- ก็จะเปลี่ยนไปเป็น HOCl มากขึ้น การออกฤทธิ์ของคลอรีนโดยทั่วไปคือยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่ถือเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ นอกจากนี้ยังสามารถทำลายผนังเซลล์ รวมถึงยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ส่งผลให้เชื้อจุลชีพไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Benarde et al., 1967) ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของคลอรีนที่ 5 ppm จึงจะ

สามารถฆ่าเชื้อในน้ำทะเลได้ใกล้เคียงหรือมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ (Petrucchi and Rosellini, 2005)

ปลากระพงขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* ชื่อสามัญว่า Sea bass หรือ Giant perch จัดเป็นปลากระดูกแข็งที่อยู่ในวงศ์ Latidae และเป็นปลาน้ำกร่อยที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม ลักษณะโดยทั่วไปมีรูปร่างลำตัวหนาและด้านข้างแบน หัวโต จะงอยปากค่อนข้างยาวและแหลม นัยน์ตาโต ปากกว้างยืดหดได้ มุมปากอยู่เลยไปทางหลังนัยน์ตา ฟันเป็นฟันเขี้ยวอยู่บนขากรรไกรบนและล่าง ขอบกระดูกแก้มเป็นหนามแหลม ขอบกระดูกกระพุ้งเหงือกแข็งและคม คอดหางมีขนาดใหญ่และแข็งแรง เกล็ดใหญ่มีขอบหยักเป็นหนาม เมื่อลูบจะสากมือ (ctenoid) พื้นลำตัวสีขาวยเงินปนน้ำตาล แนวสันท้องสีขาวยเงิน เมื่อโตเต็มที่จะมีความยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร พบและอาจพบมากที่สุดถึง 2 เมตรหนักได้ถึง 60 กิโลกรัม (Kungvankij et al., 1986) ปลาชนิดนี้นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในเขตจังหวัดชายทะเลของไทยและจัดเป็นปลาเศรษฐกิจที่กรมประมงส่งเสริมให้เลี้ยงเนื่องจากเลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดีและขายได้ราคาสูง ซึ่งหลายๆ ฟาร์มก็ได้ได้นำน้ำทะเลมาใช้ในการเพาะเลี้ยง และมีการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนก่อนนำมาใช้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของคลอรีนที่เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลก่อนนำมาใช้เลี้ยงลูกปลากระพงขาว

วิธีการดำเนินงาน

สัตว์ทดลอง

โครงการนี้ได้ผ่านการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากมหาวิทยาลัยมหิดล รหัส MU-IACUC 2017/020 ลูกปลากระพงขาวขนาด 1 นิ้ว (ปลากระพงขาวที่รอด

ผ่านรูกระชังร้อนเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรได้) จำนวน 84 ตัว

การทดสอบประสิทธิภาพของคลอรีนในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียน้ำทะเล

การเตรียมน้ำทะเล น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่สูบมาจากทะเลโดยตรง นำมาฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วย 65 เปอร์เซ็นต์คลอรีน (Deemclor™, Thailand) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm ใส่ในถังน้ำขนาด 50 ลิตร ความเข้มข้นละ 3 ถัง จำนวน 21 ถัง และถังน้ำทะเลที่ไม่เติมคลอรีน จำนวน 3 ถัง หลังจากเติมคลอรีนตามความเข้มข้นดังกล่าวทำการเปิดหัวทรายพร้อม ๆ กัน เพื่อช่วยให้ผงคลอรีนเกิดการละลายในน้ำที่มีการเคลื่อนไหวจากแรงดันอากาศผ่านหัวทราย และทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบปริมาณคลอรีน (Sera®, USA) โดยกำหนดให้วัดปริมาณความเข้มข้นของคลอรีนจนกว่าจะตรวจไม่พบคลอรีนในน้ำ จึงนำน้ำที่ได้ไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป ซึ่งหลังใส่คลอรีนจะมีการนำน้ำไปทดสอบเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Thiosulfate- citrate- bile salts- sucrose agar (TCBS; Merck, USA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. และ Plate count agar (PCA; Difco®, USA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั่วไป) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml) ทั้งก่อนและหลังการใส่คลอรีนและบันทึกผล

การทดสอบน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนหลังจากการเลี้ยงปลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบนี้จะเลือกกลุ่มการทดลองจากการเตรียมน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยคลอรีนและสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียเมื่อ

เปรียบเทียบกับน้ำที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยคลอรีนได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของคลอรีนที่สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์คือ 40 ppm, 50 ppm และ 60 ppm

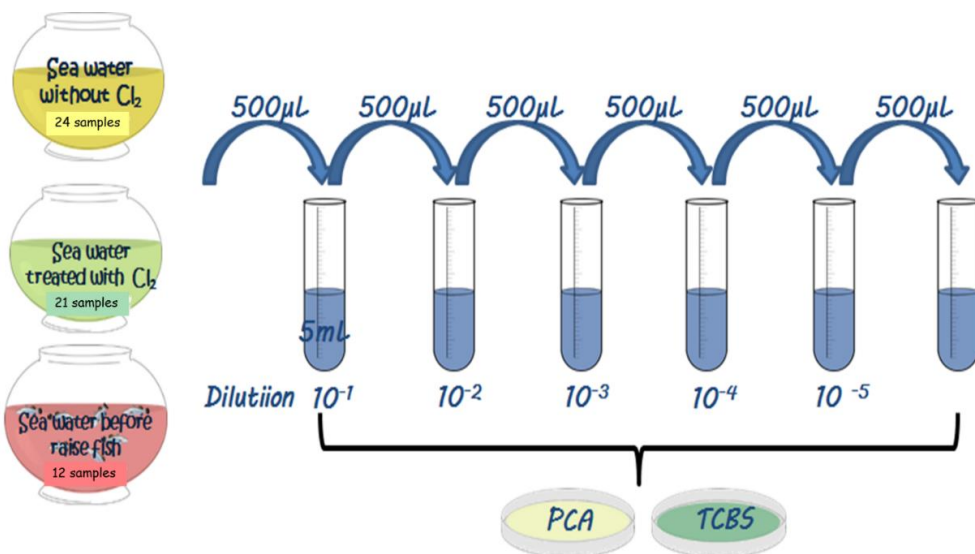
เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบปริมาณคลอรีนและตรวจไม่พบคลอรีนในน้ำ ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มๆ ตามระดับความเข้มข้นของน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm และน้ำที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน จำนวนกลุ่มละ 3 ถึง ปริมาตรน้ำในถัง 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่ปลาลงในถังจำนวน 7 ตัวต่อถัง รวมทั้งหมด 12 ถัง มีปลาทั้งหมด 84 ตัว โดยจำนวนปลาที่ใช้นี้มาจากการข้อมูลความหนาแน่นของกรเลี้ยงปลากะพงขาวในฟาร์มที่ทำการศึกษารั้งนี้ พบว่าอัตราส่วนลูกปลาขนาด 1 นิ้ว จำนวน 42,000 ตัวจะสามารถเลี้ยงได้ในน้ำทะเลปริมาตร 3,000 ลิตร เมื่อเทียบสัดส่วนจะพบว่าปริมาตรน้ำ 500 มิลลิลิตรสามารถเลี้ยงลูกปลาได้ 7 ตัวต่อถัง ทำการเลี้ยงปลาในถังน้ำตามกลุ่มต่าง ๆ (น้ำไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และน้ำ

ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน 40 ppm, 50 ppm และ 60 ppm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวอ้างอิงตามระยะเวลาเปลี่ยนน้ำของฟาร์มที่ทำการศึกษารั้งนี้โดยการเพาะเลี้ยงลูกปลากะพงขาวจะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำปริมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์ทุกวัน เมื่อเลี้ยงลูกปลากะพงขาวครบ 24 ชั่วโมง จึงนำน้ำก่อนที่จะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำมาเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (TCBS และ PCA) ทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (CFU/ml) และบันทึกผล

การทดสอบเพาะเชื้อแบคทีเรียจากน้ำที่ทำการทดลอง

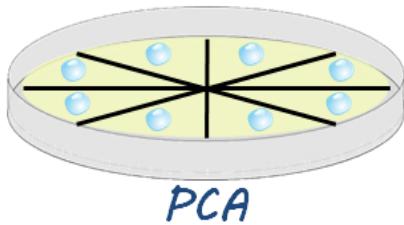
น้ำทะเลก่อน-หลังทำการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน และน้ำทะเลหลังจากเลี้ยงปลาจะถูกนำมาทดสอบเพาะเชื้อด้วยวิธีการดังนี้

- 3.1 เตรียมหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร โดยใส่น้ำเกลือลงในหลอดทดลองหลอดละ 4.5 มิลลิลิตร
- 3.2 นำน้ำตัวอย่างมาทำ Ten-fold serial dilutions ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} (รูปที่1)



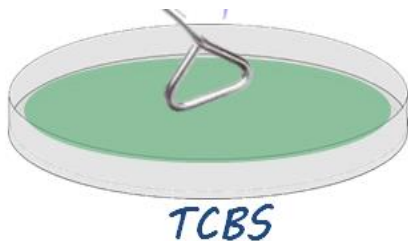
รูปที่ 1 แผนผังขั้นตอนการทำ Ten-fold serial dilutions และการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) และ Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS)

- 3.3 ดูดน้ำตัวอย่างจากหลอดทดลองแต่ละหลอดมา ทำ drop plate ลงบน PCA plate ที่ทำการขีดแบ่งช่องไว้เป็น 8 ช่อง โดยจะทำการหยดลงแต่ละช่อง ช่องละ 20 ไมโครลิตร (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 การทำ Drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

- 3.4 ดูดน้ำตัวอย่างจากหลอดทดลองแต่ละหลอดมา 100 ไมโครลิตร หยดลงบน TCBS plate และทำการ spread plate โดยการใช้ spreader จนเห็นว่าน้ำตัวอย่างซึมลงอาหารเลี้ยงเชื้อจนหมด (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การทำ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate- citrate- bile salts- sucrose agar (TCBS)

- 3.5 นำ plate ทั้งหมดไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3.6 ทำการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ คิดเป็น CFU/ml แล้วบันทึกผล

การประเมินผลและการคำนวณทางสถิติ

ค่าพารามิเตอร์ที่สังเกตของแต่ละทรีตเมนต์จะถูกทดสอบการกระจายตัวแบบปกติ (Normal distribution) โดยใช้ Shapiro-wilk test และความเท่ากันของความแปรปรวน (homogeneity of variance) โดยใช้ Levene test หลังจากนั้นจะมีการคำนวณค่าทางสถิติต่างๆ ตามวิธี General Linear Model Procedure ตามแบบแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ จะถูกเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan test ค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดจะถูกกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ การคำนวณค่าทางสถิติทั้งหมดจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 20.0

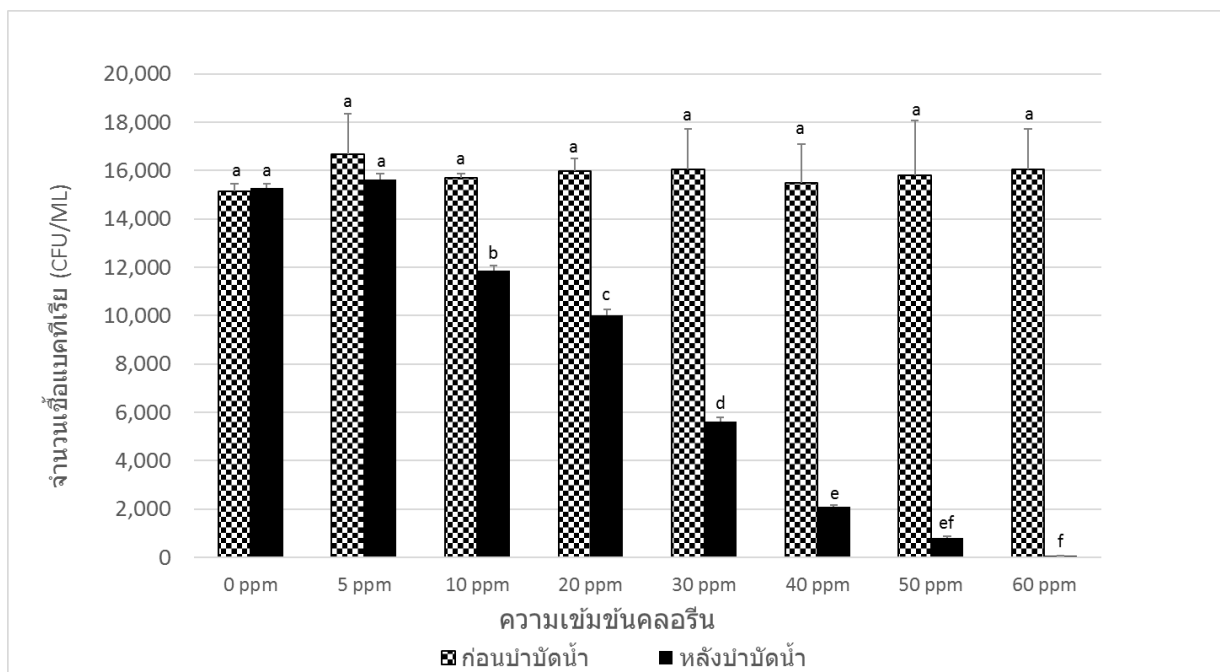
ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้นของคลอรีนที่แตกต่างกัน มีผลต่อการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm พบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ลดลงเมื่อเทียบกับน้ำทะเลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่น้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเข้มข้น 5 ppm พบว่ามีแนวโน้มจำนวนเชื้อแบคทีเรียลดลงแต่ไม่แตกต่างกับน้ำทะเลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ($P > 0.05$) และเมื่อความเข้มข้นของน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 10 ppm ขึ้นไป จะพบจำนวนเชื้อแบคทีเรียบน PCA plate ลดน้อยลงตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของคลอรีน 60 ppm นั้นสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียบน PCA

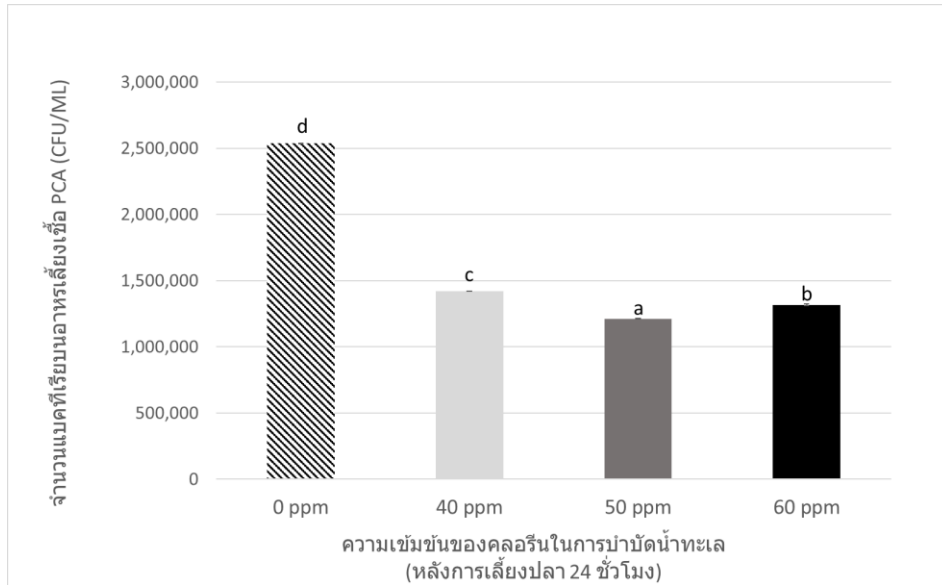
plate ได้มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับจำนวนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในน้ำทะเลที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ($P<0.05$) (รูปที่ 4) อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั่วไป นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของคลอรีนตั้งแต่ 5 ppm ขึ้นไป สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective agar) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย กลุ่ม *Vibrio* spp. แต่ก็มีเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ได้ เช่น *Proteus* spp., *Enterococci* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Aeromonas* spp.

ในส่วนการทดสอบน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนหลังจากการเลี้ยงปลา 24 ชั่วโมง โดยนำน้ำ

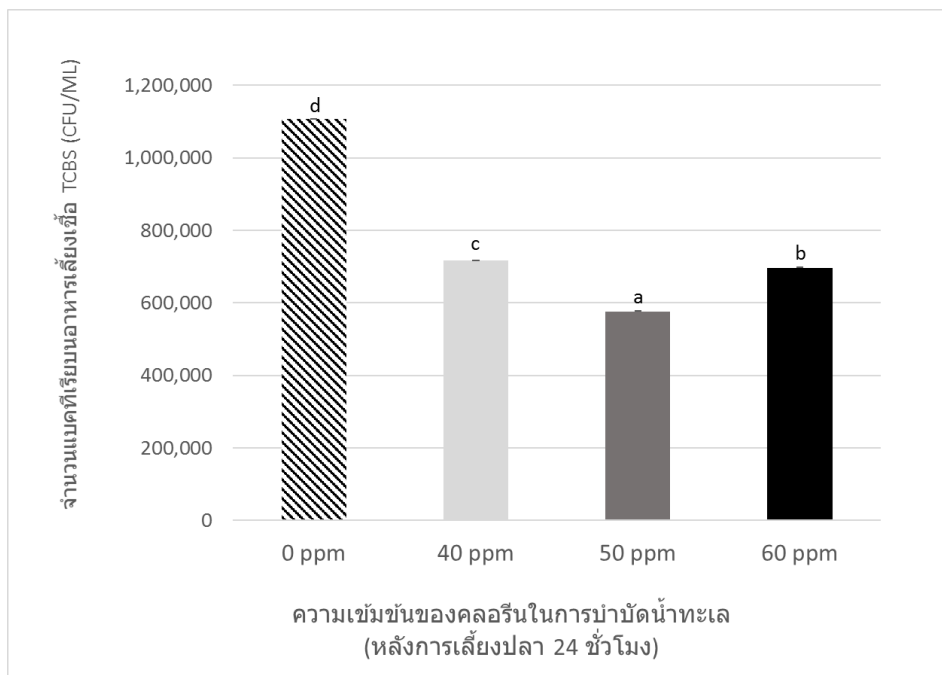
ทะเลที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 0, 40, 50, 60 ppm มาเลี้ยงปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ TCBS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 5 และ 6) และจำนวนเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่า ตัวอย่างน้ำทะเลที่ได้รับการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนความเข้มข้น 0, 40, 50, 60 ppm ก่อนการนำไปเลี้ยงปลากะพงขาวมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนตั้งแต่ความเข้มข้น 5 ppm จะไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ในขณะที่น้ำทะเลที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนจะพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ปริมาณ $2,000\pm600$ CFU/ml



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อน และหลังการฆ่าเชื้อน้ำทะเลด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm ตามลำดับ ($n=3$), (Mean $\pm$ SD) โดยตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 5 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียหลังการฆ่าเชื้อน้ำทะเลด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ppm ตามลำดับ (n=3), (Mean±SD) นำไปเลี้ยงปลากระพงขาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate count agar) โดยตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียหลังการฆ่าเชื้อน้ำทะเลด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 0, 40, 50 และ 60 ppm ตามลำดับ (n=3), (Mean±SD) นำไปเลี้ยงปลากระพงขาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar) โดยตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

อภิปรายผลการทดลอง

การใช้คลอรีนเพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้จะต้องเป็นความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดโดยใช้ปริมาณคลอรีนน้อยที่สุด จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของคลอรีน 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ 22, 34, 63, 86 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของคลอรีนที่สูงขึ้นทำให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และพบว่าความเข้มข้นของคลอรีนเริ่มต้นที่ 60 ppm มีความสามารถกำจัดแบคทีเรียในน้ำทะเลได้ดีที่สุด โดยสามารถกำจัดได้มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้นี้มีความแตกต่างจากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Huang และคณะ (1997) ที่พบว่าความเข้มข้นของคลอรีนเริ่มต้นที่ 5 ppm สามารถกำจัดแบคทีเรียในน้ำทะเลได้ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเกิดขึ้นเนื่องจากแหล่งน้ำทะเลที่ใช้ศึกษาเป็นคนละแหล่งกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำตั้งต้นที่แตกต่างกัน อีกทั้งการทดลองของงานวิจัยนี้ยังเป็นการทดลองที่ทำการเพาะเชื้อในสถานที่จริง (Field experiment) ซึ่งแม้ว่าผู้วิจัยจะดำเนินการทดลองทุกขั้นตอนด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และควบคุมให้มีปัจจัยรบกวนน้อยที่สุด แต่การทดลองในสถานที่จริงย่อมมีข้อจำกัดบางประการที่อาจส่งผลกระทบต่อผลการทดลองได้ เช่น ประสิทธิภาพในการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ ความไม่แน่นอนของอุณหภูมิที่ใช้เพาะเชื้อ ความเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

การศึกษานี้ทำการวัดปริมาณคลอรีนในน้ำทะเลหลังจากใส่คลอรีนที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ppm พบว่าระดับความเข้มข้นของคลอรีนที่สูงขึ้นในน้ำจะทำให้การสลายตัวของคลอรีนนานขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น คุณภาพน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และอุณหภูมิ ฯลฯ โดยพบว่าอุณหภูมิของน้ำต่ำจะทำให้การสลายของคลอรีนลดลง น้ำที่เป็นกรดจะทำให้การสลายของคลอรีนสูงขึ้น น้ำที่มีตะกอนสารแขวนลอยในน้ำสูงจะลดประสิทธิภาพการทำงานของคลอรีน และระยะเวลาในการแช่คลอรีนในน้ำที่ยาวนานจะทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานที่สูงขึ้นด้วย (Boyette et al., 1993) และจากการศึกษานี้พบว่าการใส่คลอรีนในน้ำทะเลที่มีการเปิดออกซิเจนเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจะไม่พบว่ามีคลอรีนเหลืออยู่ในน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ประสิทธิภาพของคลอรีนจะลดลงเมื่อมีการเติมสารโซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) ในน้ำ โดยโซเดียมไทโอซัลเฟต 7 มิลลิกรัม สามารถกำจัดคลอรีนได้ 1 มิลลิกรัม (Yanong et al., 2012)

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ถือเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทั้งในกุ้ง หอย และปลา โดยเชื้อชนิดนี้สามารถปนเปื้อนมากับแหล่งน้ำที่นำมาใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ อีกทั้งยังสามารถติดต่อสู่คนได้ ซึ่งถ้าหากเกิดการติดเชื้อ *Vibrio spp.* ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็จะนำมาสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากตามมา (Lafferty et al., 2015) ด้วยเหตุนี้การควบคุมป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio spp.* ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งผลการทดลองจากการวัดปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ซึ่งถือเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับเชื้อกลุ่มนี้ พบว่าความ

เข้มข้นของคลอรีนเริ่มต้นที่ 5 ppm ก็มีความเพียงพอสำหรับกำจัดเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ปนเปื้อนในน้ำทะเลได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าการใช้คลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide) สามารถใช้ในการควบคุมปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยง Brine shrimp (Puente et al., 1992)

จากการศึกษานี้พบว่าน้ำทะเลที่ใช้ในการเลี้ยงลูกปลากะพงขาวจะผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้ว แต่เมื่อนำมาเลี้ยงลูกปลากะพงขาวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก็สามารถที่จะพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำทะเลจำนวนเพิ่มขึ้นได้ และจากการศึกษานี้ยังพบว่าปริมาณเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่มีการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลด้วยคลอรีนก็ยังคงต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลด้วยคลอรีน ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในน้ำทะเลหลังเลี้ยงลูกปลากะพงขาวนั้น อาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น ลูกปลาติดเชื้อมาตั้งแต่ต้นจากพ่อแม่พันธุ์ มูล เชื้อปนเปื้อนมากับอาหารที่ให้ลูกปลากิน ได้แก่ ไรน้ำ โรติเฟอร์ อาร์ทีเมีย อาหารเม็ดสำเร็จรูป การเปลี่ยนถ่ายน้ำจะเป็นการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในบ่อเลี้ยงได้ส่วนหนึ่งเท่านั้น การป้องกันเชื้อที่ดีที่สุดคือการทำให้ปลากะพงขาวที่เลี้ยงมีสุขภาพดี มีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี เพื่อลดการติดเชื้อก่อโรค

สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นของคลอรีนที่ 60 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ในการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลก่อนที่จะใช้เลี้ยงปลากะพงขาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น คุณภาพน้ำ อุณหภูมิ การละลายของออกซิเจนในน้ำ และตะกอนสารแขวนลอยในน้ำ ฯลฯ ที่ต้องนำมาพิจารณาประกอบด้วย และควรพักน้ำ

ก่อนนำไปใช้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิดพิษจากการตกค้างของคลอรีนในน้ำทะเล ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถนำไปปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลชนิดอื่น ๆ รวมถึงเป็นแนวทางให้ผู้สนใจหรือต้องการศึกษาเกี่ยวกับความเข้มข้นของคลอรีนที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อน้ำทะเลสามารถนำไปเป็นตัวอย่างและศึกษาพัฒนาต่อไปได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้เป็นการทดลองที่ศึกษาตัวอย่างในน้ำทะเลในช่วงเวลาหนึ่ง และเป็นการทดลองที่ทำในสถานที่จริง อุปกรณ์หรือการตรวจวัดผลจึงอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้มากกว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นหากต้องการนำไปปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลชนิดอื่นในแต่ละพื้นที่ต้องมีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของคลอรีนตามความเหมาะสมของคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทะเลในแต่ละพื้นที่ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณฟาร์มทะเลทอง ที่สนับสนุนสัตว์ทดลองและสถานที่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ หน่วยวิจัยและดูแลสุขภาพสัตว์น้ำทางสัตวแพทย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับสารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ และ อ.ดร.สุรศักดิ์ จิตตะโคตร สำหรับการให้คำแนะนำทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

Arimoto, M., J. Sato, K. Maruyama, G. Mimura, and I. Furusawa. 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous

- necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*. 143(1): 15-22.
- Austin, B. 1988. *Marine microbiology*. Cambridge university press: New York, USA. p. 1-8.
- Benarde, M. A., W. B. Snow, V. P. Olivieri, and B. Davidson. 1967. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 15(2): 257-265.
- Boyette, M. D., D. F. Ritchie, S. J. Carballo, S. M. Blankenship, and D. C. Sanders. 1993. Chlorination and postharvest disease control. *Horttechnology*. 3(4): 395-400.
- Bullock, G. L., S. T. Summerfelt, A. C. Noble, A. L. Weber, M. D. Durant, and J. A. Hankins. 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. *Aquaculture*. 158(1-2): 43-55.
- Chang, P. S., L. J. Chen, and Y. C. Wang. 1998. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture*. 166(1-2): 1-17.
- Egidius, E. 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology, A review. *Aquaculture*. 67: 15-28.
- Frerichs, G., A. Tweedie, W. Starkey, and R. Richards. 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*. 185(1-2): 13-24.
- Huang, J., L. Wang, N. Ren, and F. Ma. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res.* 31(3): 607-613.
- Kungvankij, P., L. B. Tiro Jr, B. J. Pudadera Jr, and I. O. Potestas. 1986. Biology and culture of sea bass (*Lates calcarifer*). *Network of Aquaculture Centers in Asia*. Seafdec. p. 12-15.
- Lafferty, K. D., C. D. Harvell, J. M. Conrad, C. S. Friedman, M. L. Kent, A. M. Kuris, E. N. Powell, D. Rondeau, and S. M. Saksida. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7: 471-496.
- Liltved, H., and S. Cripps. 1999. Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquac Res.* 30(6): 445-450.
- Liltved, H., H. Hektoen, and H. Efraimsen. 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacult. Eng.* 14(2): 107-122.
- Martinez-Picado, J., M. Alsina, A. R. Blanch, M. Cerda, and J. Jofre. 1996. Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by

- selective culture and DNA Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 62(2): 443-449.
- Petrucci, G., and M. Rosellini. 2005. Chlorine dioxide in seawater for fouling control and post-disinfection in potable waterworks. Desalination. 182(1-3): 283-291.
- Puente, M. E., F. Vega-Villasante, G. Holguin, and Y. Bashan. 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated seawater. J. Appl. Bacteriol. 73(6): 465-471.
- Reilly, A., and F. Käferstein. 1997. Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. Aquac. Res. 28(10): 735-752.
- Sudthongkong, C., M. Miyata, and T. Miyazaki. 2002. Iridovirus disease in two ornamental tropical fresh-water fishes: African lampeye and dwarf gourami. Dis. Aquat. Organ. 48(3): 163-173.
- Suttle, C. A. 2007. Marine viruses-major players in the global ecosystem. Nat. Rev. Microbiol. 5(10): 801-812.
- Whipple, M., and J. Rohovec. 1994. The effect of heat and low pH on selected viral and bacterial fish pathogens. Aquaculture. 123(3-4): 179-189.
- Yanong, R. P., and C. Erlacher-Reid. 2012. Biosecurity in aquaculture, part 1: an overview. SRAC Publication No 4707. Stoneville (MS): Southern Regional Aquaculture Center. <http://fisheries.tamu.edu/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-4707-Biosecurity-in-Aquaculture-Part-1-An-Overview.pdf> (Accessed 1 January 2020)

