

โปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ในเพรียงเจาะไม้ (*Bactronophorus thoracites*)
จากป่าชายเลน อำเภอลำลูกกา จังหวัดจันทบุรี

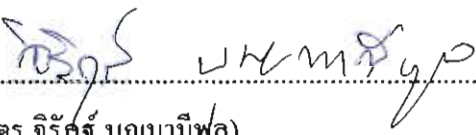
จรรยา ช่อนกลาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ธันวาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ จริยา ช่อนกลาง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

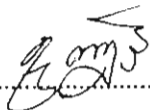
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

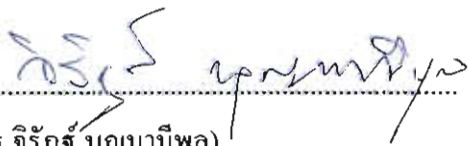

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนวิวัฒน์ ตันติวรานูรักษ์)

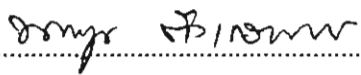

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.จิรัฏฐ์ บุญมามีพูล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

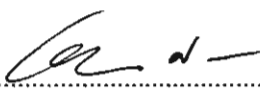

..... ประธาน
(ดร.พิศิษฐ์ พลธนะ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนวิวัฒน์ ตันติวรานูรักษ์)


..... กรรมการ
(ดร.จิรัฏฐ์ บุญมามีพูล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัตน์ ศรีสุข)

วันที่ 12 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2559

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีการศึกษา 2558

54910066: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: *Nematopsis*/ Protozoa/ Shipworm/ Oocyst/ *Bactronophorus thoracites*

จริยา ช่อนกลาง: โพรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ในเพรียงเจาะไม้ (*Bactronophorus thoracites*) จากป่าชายเลน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี (THE PROTOZOA PARASITE *Nematopsis* IN SHIPWORM (*Bactronophorus thoracites*) FROM KHLUNG DISTRICT, CHANTHABURI PROVINCE, THAILAND) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนวัฒน์ ตันติวรานุรักษ์, ปร.ด., จิรัฏฐ์ บุญมามีพูล, ปร.ด. 83 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

งานวิจัยนี้ถือเป็นครั้งแรกที่ศึกษาการระบาดของโพรโตซัวปรสิต *Nematopsis* sp. บริเวณเหงือกของเพรียงเจาะไม้ *Bactronophorus thoracites* จากพื้นที่ป่าชายเลน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนมีนาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 จำนวน 195 ตัวอย่าง พบว่าค่าความซุกของ *Nematopsis* sp. เฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 78.5 เมื่อศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาด พบเซลล์เกิดการเสียรูปทรงส่งผลต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์ เกิดการรวมกลุ่มของ haemocytes ขึ้นหลายชั้นล้อมรอบเนื้อเยื่อที่มีการระบาด เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการระบาดไปยังเนื้อเยื่อบริเวณอื่น

การศึกษาลักษณะวิทยาพบปรสิตในระยะ oocyst มีลักษณะกลมรี ผนัง oocyst (oocyst wall) หนา แต่ละ oocyst มีขนาดความกว้าง $13.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ความยาว $17.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($n=15$) ภายในพบตัวอ่อน single vermiform sporozoite มีลักษณะเป็นทรงกระบอกคล้ายหนอนขดอยู่ parasitophorous vacuole (PV) ขนาด $20.3-25.1 \mu\text{m}$ ล้อมรอบอยู่ภายในถุง phagocyte เมื่อศึกษาค้นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบว่า บริเวณ โดยรอบ oocyst wall แสดงลักษณะ dense network และ adherent microfibrils กระจายตัวอยู่บริเวณ parasitophorous vacuole และไปยึดเกาะกับ protein particle ที่อยู่ใน cytoplasm ของ Phagocyte อีกทั้งยังพบ nucleus และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์แทรกอยู่ภายใน บริเวณด้านปลายของ oocyst พบ operculum ปกคลุมอยู่เชื่อมต่อกับ dense cord และบริเวณเชื่อมต่อ parasitophorous vacuole ประกอบด้วย circular micropyle ที่ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของ sporozoite พบ glycogen particle ภายใน cytoplasm ของเซลล์ phagocyte ซึ่งบางครั้งเซลล์บริเวณนี้อาจเชื่อมต่อกับ PV microfibrils ได้โดยตรง

54910066: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)

KEYWORDS: *Nematopsis*/ Protozoa/ Shipworm/ Oocyst/ *Bactronophorus thoracites*

JARIYA SONKLANG: THE PROTOZOA PARASITE *Nematopsis* IN SHIPWORM (*Bactronophorus thoracites*) FROM KHLUNG DISTRICT, CHANTHABURI PROVINCE, THAILAND. ADVISORY COMMITTEE: CHANAWAT TUNTIWARANURUK, Ph.D., JIRAT BOONMAMEEPOOL, Ph.D. 83 P. 2015.

This is the first record infected oocysts of *Nematopsis* sp. and the morphological characteristics in the shipworm (*Bactronophorus thoracites*) were collected from the coast of Thailand, since March 2013 to March 2014. All samples studied found that prevalence throughout the year, average was 78.5%. The oocysts were examined by light microscopy. The oocysts mostly found at the distal margin of the gill filaments were engulfed by cytoplasm of phagocytes, each phagocyst containing 1-20 oocysts. Each parasitophorous vacuole (PV) measuring 20.3-25.1 μm contained a single ellipsoidal oocyst and each oocyst was $17.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$ long and $13.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ wide (n=15) within have a single vermiform sporozoite. The TEM showed the oocyst wall was 0.97 μm thick. The complex network of anastomosing microfibrils that formed a wall-like structure around the oocyst wall and connected with glycogen particle in the PV membrane. The apical portion of the oocyst contained a circular micropyle 0.9 μm in diameter covered by conical operculum was 0.34-0.54 μm thick attached to the PV membrane by a dense cord. Suggest that high infection effect on deforming and irregular arrangement of epithelium cell and found have large number of haemocytes. On the basic of data morphology differences and host specificity, we identified the present *Nematopsis* sp. is a new species. The lack of molecular data and complete life cycle for the identification of *Nematopsis*.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
สมมติฐานการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
สถานที่ทำการวิจัย.....	4
ระยะเวลาทำการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
อนุกรมวิธานของเพรียงเจาะไม้ (<i>Bactronophorus thoracites</i>).....	5
ชีววิทยาทั่วไปของเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>).....	6
ชีววิทยาทั่วไปของ protozoa parasite <i>Nematopsis</i>	9
อนุกรมวิธานของ <i>Nematopsis</i>	10
สัณฐานวิทยาของ <i>Nematopsis</i>	11
วงจรชีวิตของ <i>Nematopsis</i>	29
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของ <i>Nematopsis</i>	31
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
วัสดุและอุปกรณ์.....	35
สารเคมี.....	35
วิธีดำเนินการ.....	37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	42
การศึกษาค่าความชุกและความหนาแน่นของ <i>Nematopsis</i> sp.....	42
การศึกษาสัณฐานวิทยาของ <i>Nematopsis</i> sp.....	53
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	60
การศึกษาความชุกของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>).....	60
การศึกษาความหนาแน่นของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>).....	61
การศึกษาสัณฐานวิทยาของ <i>Nematopsis</i> sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	62
การศึกษาสัณฐานวิทยาของ <i>Nematopsis</i> sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด ส่องผ่าน (TEM).....	65
การศึกษาพยาธิสภาพเหงือกของเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาดของ <i>Nematopsis</i> sp.....	67
สรุปผล.....	67
ข้อเสนอแนะ.....	68
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	79
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	83

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว (μm) ของ oocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเหงือกหอยกะพง (<i>Arcuatula arcuatula</i>) หอยแครง (<i>Anadara granosa</i>) หอยแมลงภู่ (<i>Perna viridis</i>) และหอยลาย (<i>Paphia undulata</i>)..... 32
2	ดัชนีคุณภาพน้ำและวิธีการหรือเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง..... 36
3	แสดงความหนาแน่นและร้อยละค่าความชุกของ <i>Nematopsis</i> sp. บริเวณเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>) ในรอบปี..... 42
4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม spss..... 44
5	แสดงค่าความหนาแน่น ความชุกของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>) และค่าอุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเลในรอบปี..... 46
6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกของ <i>Nematopsis</i> sp. กับอุณหภูมิ ความเค็ม และค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม spss ด้วยวิธีการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน..... 47
7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ <i>Nematopsis</i> sp. กับอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม spss ด้วยวิธีการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน..... 49
8	เปรียบเทียบขนาดโปรโตซัวปรสิต <i>Nematopsis</i> ในระยะ oocyst ที่พบในเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>) กับหอยทะเลสองฝาชนิดอื่น ๆ..... 63
9	แสดงขนาดของ <i>Nematopsis</i> sp. ในระยะ oocyst ที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>)..... 77
10	แสดงขนาดของ parasitophorous vacuole และผนังของ oocyst (wall) ที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>)..... 78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สัณฐานวิทยาภายนอกของเพรียงเจาะไม้ (<i>Bactronophorus thoracites</i>).....	5
2	ลักษณะทางกายภาพของเพรียงเจาะไม้ (<i>B. thoracites</i>).....	6
3	กายวิภาคศาสตร์ของ Family Teredinidae.....	7
4	ระยะ metamorphosis ของ <i>B. thoracites</i>	8
5	ลักษณะ trophozoite ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในกึ่งทราย (<i>Metapenaeosis</i> sp.).....	12
6	ลักษณะ syzygy ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในกึ่งทราย (<i>Metapenaeosis</i> sp.).....	12
7	ลักษณะ gametocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในกึ่งขาว (<i>Penaeus setiferus</i>).....	13
8	ลักษณะสัณฐานวิทยาของ <i>N. mytella</i> ระยะ oocyst.....	14
9	ลักษณะทั่วไปของ oocyst ที่มี sporozoite อยู่ภายใน.....	14
10	ลักษณะ trophozoite ของ <i>N. messor</i> , <i>N. quadratum</i> และ <i>N. annulipes</i>	15
11	ลักษณะ trophozoite ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในกึ่งกุลาดำ (<i>Penaeus monodon</i>).....	16
12	สัณฐานวิทยาภายนอกของ <i>Gregarina garnhami</i> ระยะ trophozoite ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	17
13	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในกึ่งกุลาดำ (<i>Penaeus monodon</i>) ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	18
14	สัณฐานวิทยาภายนอกของ <i>Gregarina polymorpha</i> ระยะ trophozoite ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	19
15	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Cephaloidophora communis</i> ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	20
16	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Heliospora caprellae</i> ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	21

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Heliospora longissima</i> ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	22
18	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Gregarina cuneata</i> ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	23
19	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Gregarina polymorpha</i> ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	24
20	สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ <i>Gregarina steini</i> ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	25
21	ลักษณะของ <i>Nematopsis</i> sp. ทั้ง 3 ระยะ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	26
22	แสดงลักษณะของ <i>Nematopsis</i> sp. ระยะ syzygy ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	27
23	สัณฐานวิทยาภายนอกของ <i>Nematopsis</i> ระยะ gametocyst ในกึ่ง <i>Penaeus monodon</i>	28
24	วงจรชีวิตของโปรโตซัวปรสิต <i>N. ostrearum</i>	30
25	แผนที่บริเวณทะเลตะวันออกไทย อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี ที่ทำการสำรวจโปรโตซัวปรสิต <i>Nematopsis</i> ในเพรียงทะเล.....	37
26	กราฟแสดงอุณหภูมิ, ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเลในแต่ละเดือน	43
27	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของ <i>Nematopsis</i> sp. กับอุณหภูมิ, ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล.....	48
28	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ <i>Nematopsis</i> sp. กับอุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล.....	50
29	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นกับความชุก (Prevalence) ของ <i>Nematopsis</i> sp.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
30 แสดงลักษณะ oocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ <i>(B. thoracites)</i> กำล้างขยายสูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	52
31 แสดงลักษณะ oocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. กำล้างขยายสูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสงในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ <i>(B. thoracites)</i> ซึ่งผ่านการเตรียม เนื้อเยื่อด้วย paraffin section technique และย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin.....	54
32 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา oocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเนื้อเยื่อเหงือก เพรียงเจาะไม้ <i>(B. thoracites)</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM).....	56
33 ภาพตัดตามขวาง ultrathin section แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา oocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ <i>(B. thoracites)</i> ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM).....	57
34 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา oocyst ของ <i>Nematopsis</i> sp. ในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะ ไม้ <i>(B. thoracites)</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM).....	58

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Nematopsis (Apicomplexa: Porosporidae) เป็นโปรโตซัวปรสิตที่มีลักษณะลำตัวแบ่งเป็นปล้องชัดเจน (septatorina) ซึ่งโปรโตซัวกลุ่มนี้เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในลำไส้ หรือ ช่องว่างบริเวณทางเดินอาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะกลุ่ม arthropods ได้แก่ กุ้ง, ปู (crustacean), หนอนปล้องและแมลง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในเหงือกของสัตว์จำพวกหอยสองฝา (mollusk) *Nematopsis* นั้นต้องการเจ้าบ้านหลายชนิด เพื่อให้มีวงจรชีวิตที่สมบูรณ์ โดยมีกุ้งและปู (crustacean) เป็นเจ้าบ้านตัวสุดท้าย (definitive host) ขณะที่หอย หรือ หนอนปล้อง (annelid worm) เป็นเจ้าบ้านตัวกลาง (intermediate host) จึงทำให้รูปร่างของ *Nematopsis* ที่พบนั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตและเซลล์เจ้าบ้านที่อาศัยอยู่ (จิราพร เกสรจันทร์, 2556) จากรายงานการศึกษาพบว่าปรสิตชนิดนี้มีการระบาดไปทั่วโลก เช่น รายงานของ Canestri-Trotti, Paesanti, and Turolla (2000) มีการระบาดในหอยสองฝาร้อยละ 39.7 รายงานของ Jimenez, Barniol, and Machuca (2002) พบการระบาดในฟาร์มกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ประเทศอิตาลี ร้อยละ 50-80 พบปรสิต 10-5,000 ตัวต่อกุ้ง 1 ตัว จากรายงานของ Carballal, Iglesias, Santamarina, Ferrosoto, and Villalba (2001) ทำการเก็บตัวอย่างหอยแครง 34 แห่ง พบการระบาดในทุก ๆ แห่ง จากประเทศสเปน นอกจากนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ยังมีการสำรวจหอยนางรมและหอยแมลงภู่ โดย Kim, Powell, Wade, Presley, and Sericano (1998) สำรวจตัวอย่างหอย 125 ตัวอย่าง จาก 67 แห่ง พบการระบาดบริเวณชายฝั่งด้านตะวันออกและอ่าวเม็กซิโกมากกว่าทางฝั่งตะวันตก ที่มีรายงานในประเทศไทย พบ *Nematopsis* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งแช่บ๊วย ค่าการระบาดคิดเป็นร้อยละ 92.7 (ชนวัฒน์ ต้นดิวานุรักษ์ และศรีัญญา สุขพร โภมล, 2545) บริเวณซึ่งเหงือกของกุ้งแช่บ๊วยมีอัตราการพบปรสิตในฤดูฝนสูงสุดร้อยละ 100 ฤดูร้อนและฤดูหนาวพบร้อยละ 95 (ธิดาพร นวิภักดิ์, ลีลา เรืองแป้น และวริษฐา หนูปิ่น, 2549) ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่รวบรวมได้จากบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี คิดเป็นร้อยละ 68.85 โดยพบ *Nematopsis* ตั้งแต่ 1-454 ตัวต่อกุ้ง 1 ตัว (Nunoy, Tantiwaranuruk, Noparat-Arpakul, & Meepool, 2011) และพบ *Nematopsis* spp. ในทางเดินอาหารของกุ้งทราย

Metapneustes sp. จากชายฝั่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอ่าวไทย ณ แหล่งสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี มีค่าการระบาดร้อยละ 82.4 (ชนวัฒน์ ต้นติวานุรักษ์ และชนัญญา เสมศรี, 2548) อีกทั้งยังสำรวจพบการระบาดของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ระยะ oocysts ในหอยแครงและหอยแมลงภู่ บริเวณพื้นที่เลี้ยงหอยในจังหวัดชลบุรี (ชนวัฒน์ ต้นติวานุรักษ์, 2009) ในหอยแมลงภู่ บริเวณอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี (ปภาศิริ บาร์เนท, วิชชุดา ประสาทแก้ว และบุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2005) เช่นเดียวกับฉันทนา (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) พบ *Nematopsis* ระยะ oocysts ในหอยแมลงภู่ บริเวณแหล่งเลี้ยงหอยจังหวัดภูเก็ต ในปี 2550-2553 และในปี 2552-2553 พบที่จังหวัดพังงาและกระบี่ ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกันกับรายงานของ Azevedo and Cachola (1992) และ Johns (1975) ที่พบระยะ oocysts ในเหงือกหอยทะเลสองฝา ซึ่งปัจจุบันโปรโตซัวปรสิตชนิดนี้มีการแพร่ระบาดในวงกว้าง ก่อให้เกิดความเสียหาย ส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น รายงานของ Fajer-Avila et al. (2005) พบว่า *N. penaeus* เป็นสาเหตุในการทำลาย midgut, mucosal epithelium และเป็นเชื้อฉวยโอกาสลำดับที่ 2 ทำให้เกิดการตายในกุ้ง (*Litopenaeus stylirostris*), อาการจืดขาวที่เกิดจากกริการินยิดเกาะและทำลายผนังลำไส้ของกุ้ง ทำให้ส่วนต่าง ๆ ของระบบทางเดินอาหาร เช่น midgut anterior, midgut caecum, ตับ, กระเพาะอาหารส่วนท้าย และลำไส้ส่วนต้น (Lightner, 1996) ในหอยสองฝา พบว่าเนื้อเยื่อส่วน epithelial cell และ connective tissue ที่มีการระบาดของ *Nematopsis* ปริมาณมาก เซลล์มีการจัดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ (ทิพย์สุดา ผลภายี, 2550) อีกทั้งยังทำให้เนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ ของหอยเสียหาย ทำให้สัตว์น้ำมีภูมิต้านทานต่ำลง เกิดภาวะโรคแทรกซ้อนได้ง่าย นอกจากนี้โปรโตซัวปรสิตอาจเป็นตัวแย่งอาหาร ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตช้า และมีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ลดลง (Carballal et al., 2001)

เพรียงเงาะไม้ (*Bactronophorus thoracites*) เป็นสัตว์ในกลุ่มหอยสองฝา (bivalves) จัดอยู่ในไฟลัมมอลลัสกา (mollusca) พบได้ในเขตพื้นที่ป่าชายเลนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดจันทบุรี จังหวัดตราด และพื้นที่ภาคใต้ชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ซึ่งหอยชนิดนี้มีลักษณะลำตัวยาวคล้ายไส้เดือน ผิวมีสีขาวขุ่น บริเวณส่วนหัวเปลือกจะลดรูปให้เหลือขนาดเล็กกลาง แต่เปลือกมีลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยม ในระยะตัวอ่อนสามารถปรับตัวอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำกร่อย กินแพลงก์ตอนเป็นอาหาร เมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ภายในเนื้อไม้ กินอาหารจำพวกเซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลที่สะสม

อยู่ในเซลล์ของเนื้อไม้ ตามสภาพธรรมชาติแล้วเพรียงเจาะไม่มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้เกือบตลอดทั้งปี แต่พบมากในช่วงฤดูฝนโดยอาศัยอยู่ในต้น โกงกางและ ตะบูน ซึ่งในบริเวณที่พันธุ์ไม้ชนิดนี้เจริญเติบโตพบว่ามีสัตว์หน้าดินอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น สัตว์จำพวกหอย, กุ้ง, ปู และปลา จัดได้ว่าสัตว์เหล่านี้เป็นตัวกลางสำคัญหรือเป็นทางผ่านของ ปรสิตรหลายชนิด ทำให้มีการแพร่ระบาดของปรสิตรในระดับสูง

จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวพบว่า ยังไม่พบข้อมูลการศึกษา *Nematopsis* sp. ในเพรียงเจาะไม้ ทั้ง ๆ ที่เป็นสัตว์ในกลุ่มหอยสองฝาเช่นกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเพรียงเจาะไม้ อาจจะเป็น host ของโปรโตซัวกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาระบาด พยาธิสภาพ และสัณฐานวิทยาบางประการ ของ *Nematopsis* บริเวณป่าชายเลน อำเภอลง จังหวัดจันทบุรี เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน หรือ เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปรสิตรในด้านอื่นและใช้เป็นข้อมูลเฝ้าระวังการระบาด ในสัตว์น้ำที่เป็นพาหะ นอกจากนี้ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยายังสามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนก ชนิดของ *Nematopsis* ได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจถึงความชุก (prevalence) และความหนาแน่น (intensity) ของ *Nematopsis* ในเพรียงเจาะไม้ เปรียบเทียบกับอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล
2. เพื่อศึกษาพยาธิสภาพบริเวณเหงือกของเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาดของ *Nematopsis* โดยวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา
3. เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา oocyst ของ *Nematopsis* ที่พบในเพรียงเจาะไม้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

สมมติฐานของการวิจัย

โปรโตซัวปรสิตร *Nematopsis* sp. สามารถระบาดในเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) โดยเฉพาะบริเวณเหงือก ซึ่งอาจก่อให้เกิดพยาธิสภาพแก่เหงือกของเพรียงเจาะไม้ได้ อาจมี ลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกับที่พบการระบาดในหอยแครง (*Anadara granosa*), หอยกะพง (*Arcuatula arcuatula*), หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) หรือ หอยลาย (*Paphia undulata*)

ประโยชน์ที่ได้รับ

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงค่าความชุก (prevalence) และความหนาแน่น (intensity) เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยาบริเวณเหงือกของโปรโตซัวปรสิตในเพรียงเจาะไม้ นอกจากนี้ค่าการระบาดของ *Nematopsis* sp. ในแต่ละฤดู อาจสอดคล้องกับอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่บ่งบอกคุณภาพของน้ำและสภาพแวดล้อมได้ ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ ส่งผลต่อแนวทางการป้องกันและจัดการกับการระบาดของโปรโตซัวปรสิตชนิดนี้ เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ หรือสัตว์น้ำที่มีการเพาะเลี้ยงตามชายฝั่งของประเทศไทยให้สูงขึ้นในอนาคต

ขอบเขตการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างเพรียงเจาะไม้จากบริเวณป่าชายเลน อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี หาค่าความชุก (prevalence) ค่าความหนาแน่น (intensity) เปรียบเทียบกับอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล จากนั้นทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* และพยาธิวิทยาของเหงือกโดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

สถานที่ทำการวิจัย

- ป่าชายเลน อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี
- ห้องปฏิบัติการ Invertebrate Zoology (BS 2104) ภาควิชาชีววิทยา อคารวิทยาศาสตร์
ชีวภาพ และศูนย์ปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ อคาร
วิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

ระยะเวลาของการวิจัย

ทำการสำรวจและศึกษาตั้งแต่เดือนมีนาคม 2556 ถึง เดือนมีนาคม 2557 เป็นระยะเวลา 13 เดือน โดยทำการสำรวจเดือนละ 1 ครั้ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การสำรวจโปรโตซัวปรสิตส่วนใหญ่นิยมสำรวจสัตว์ที่อาศัยอยู่ในทะเล เช่น กุ้ง ปู และหอย เป็นต้น จัดเป็นตัวกลางที่สำคัญของปรสิตหลายชนิด ซึ่งบริเวณที่สัตว์เหล่านี้อาศัยอยู่พบการระบาดของปรสิตอยู่ในระดับสูง โดยปรสิตบางชนิดอาจแพร่ระบาดเข้าไปเจริญในเพรียงเจาะไม้ หรือบางชนิดอาศัยเพรียงเจาะไม้เป็นเจ้าบ้านตัวกลาง (intermediate host) พบว่ามีระยะตัวอ่อนของโปรโตซัวปรสิตในสกุล *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Porosporidae) อาศัยที่บริเวณเหงือกและแมนเทิล (mantle) โปรโตซัวปรสิตสกุลนี้จะอาศัยอยู่ในหอยจนกว่าจะถูกกินเป็นอาหาร จากนั้นจะมีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเข้าไปในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง หรือ ปูต่อไป

อนุกรมวิธานของเพรียงเจาะไม้ (Turner, 1966)

Phylum Mollusca

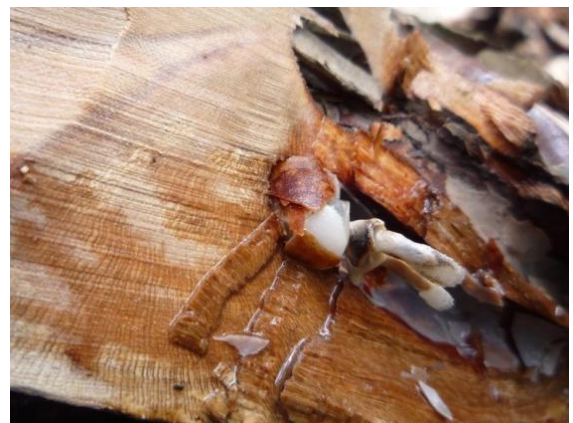
Class Bivalvia

Order Myoida

Family Teredinidae

Genus *Bactronophorus*

Species *thoracites*

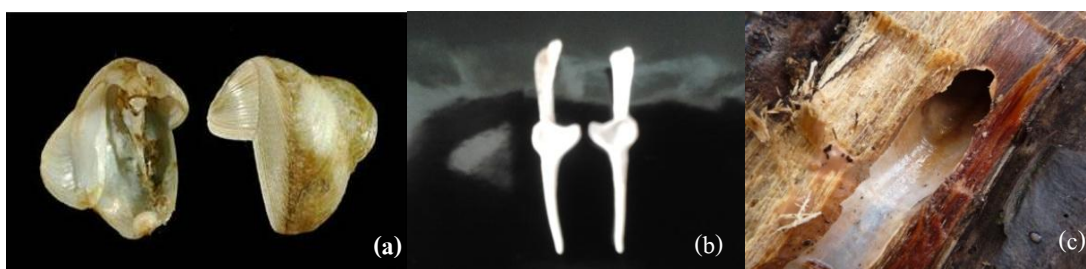


ภาพที่ 1 สันฐานวิทยาภายนอกของเพรียงเจาะไม้ (*Bactronophorus thoracites*)

ชีววิทยาทั่วไปของเพรียงเจาะไม้

ลักษณะทางกายภาพ

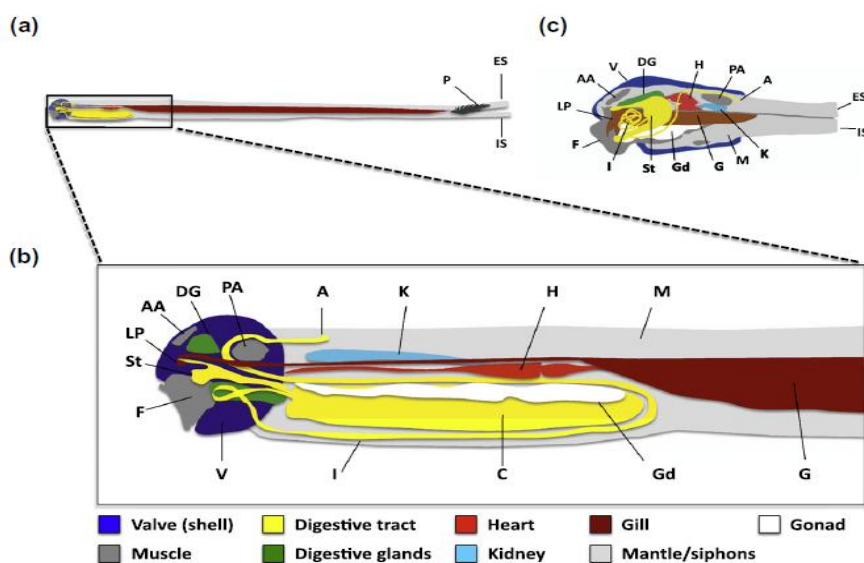
เพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) หรืออาจเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า shipworm เป็นสัตว์ประเภทหอยสองฝา (bivalves) มีลักษณะลำตัวยาวคล้ายไส้เดือน (worm-like shape) อาศัยอยู่ภายในเนื้อไม้ บริเวณส่วนหัวมีเปลือกที่ลดรูปเหลือขนาดเล็กน้อย (helmet-like shape) แต่ละเปลือกมีลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยม มีสีขาวแกมสีน้ำตาล บริเวณผิวชั้นนอกสุดของเปลือกมี concentric ridge จำนวนมาก ด้านในเปลือกจะมี styloid apophysics ซึ่งมีลักษณะแหลม ทำหน้าที่เจาะเนื้อไม้โดยการหมุนตัวให้เกิดรู เมื่อเข้าสู่ระยะตัวอ่อนเริ่มเกาะกับพื้นผิวไม้ บริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นช่องทางน้ำเข้า (inhalant siphon) และช่องทางน้ำออก (exhalant siphon) ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊สและกรองอาหาร มีส่วนของ pallets ทำหน้าที่ยึดเกาะกับเนื้อไม้และเปิด-ปิดรูเมื่อช่องทางน้ำเข้า-ออกเกิดการหดตัว นอกจากนั้น pallets ยังเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเพรียงเจาะไม้ บริเวณลำตัวจะมีส่วนของแมนเทิล (mantle) ปกคลุม ทำหน้าที่รับความรู้สึกและหลังสารจำพวกแคลเซียมมาเคลือบผิวตลอดความยาวของลำตัว (ภาพที่ 2) ภายในลำตัวประกอบไปด้วยก้อนอวัยวะภายใน เช่น หัวใจ, digestive gland, ridge gut, crystalline style sac, caecum และ anus ส่วนบริเวณเหงือกเป็นแผ่นแบนบางขนานข้างก้อนอวัยวะภายในตลอดความยาวของลำตัว (ภาพที่ 3) พบ brood pouch บริเวณท้องของเพรียงเพศผู้ ใช้สำหรับเป็นที่วางไข่ กินอาหารจำพวกอินทรีย์สารจากน้ำและแพลงก์ตอน นอกจากนี้ยังกินเซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ลิกนิน (lignin) ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของเนื้อไม้



ภาพที่ 2 (a) เปลือกมีขนาดเล็ก ผิวชั้นนอกสุดของเปลือก มี concentric ridges จำนวนมาก
ด้านในเปลือกจะมี styloid apophysics

(b) pallets ทำหน้าที่ยึดเกาะกับเนื้อไม้

(c) รอยเพรียงเจาะไม้ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อไม้ และมีการหลังสารจำพวกแคลเซียมมาเคลือบผิวเพื่อป้องกันการฉีกขาด



ภาพที่ 3 กายวิภาคศาสตร์ของ Family Teredinidae (Daniel et al., 2011) มีดังนี้

(a) pallet (P), excurrent siphon (ES), incurrent siphon (IS)

(b) anus (A), anterior adductor (AA), caecum (C), digestive gland (DG), foot (F), gill (G), gonad (Gd), heart (H), intestine (I), kidney (K), labial palps (LP), mantle (M), posterior adductor (PA) และ stomach (St)

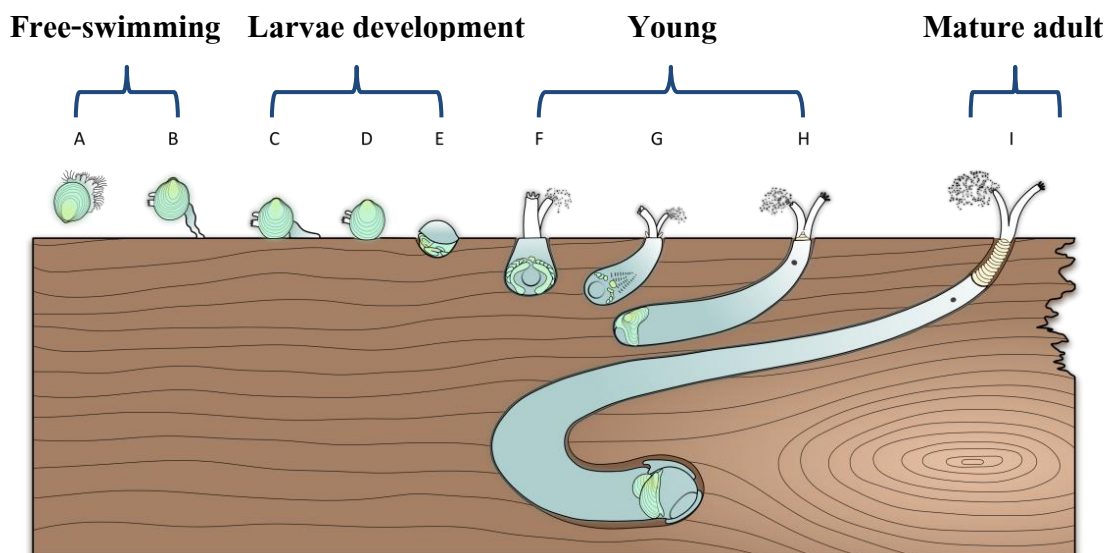
การสืบพันธุ์ (Reproduction)

เกิดขึ้นในช่วงฤดูร้อนเป็นการสืบพันธุ์แบบ viviparous ระยะเวลาเพียง 8 สัปดาห์ larvae จะโตเต็มที่สำหรับสืบพันธุ์ ซึ่งเพศส่วนใหญ่เป็นเพศแยกในตัวเต็มวัย แต่ไม่สามารถแยกให้เห็นถึงความแตกต่างจากภายนอกได้ ส่วนระยะตัวอ่อนจะเป็น protandric hermaphrodite ในช่วงระยะ metamorphosis เปรียงจะเข้าสู่เพศผู้ และเริ่มมีพัฒนาการหลังจากนี้ 6 สัปดาห์ จากนั้นเข้าสู่ช่วง free-swimming เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศเมีย 8-10 สัปดาห์

วงจรชีวิต (Life cycle)

ไข่ได้รับการผสมพันธุ์ 6-12 ชั่วโมง จะแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ trochophore ว่ายน้ำโดยอาศัยแฟงซิเลียที่เรียงเป็นวงอยู่กลางตัว เรียกว่า prototroch ภายใน 24-96 ชั่วโมง จากนั้นพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ veliger ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอน มีส่วนหัว ตา ปากขนาดเล็ก ไม่มีหนวด และมีแผ่นรูปครึ่งวงกลมบาง ๆ ยื่นออกมา 2 ข้างของลำตัวเหมือนปีกผีเสื้อ เรียกว่า velum มีหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำ สร้างเปลือกและการจมตัวลงกับพื้น หลังจากนั้น 2-10 วัน เข้าสู่ระยะ pediveliger มีการพัฒนาอวัยวะคล้ายเท้า อาจมีการว่ายน้ำสลัดกับยึดเกาะกับพื้น เริ่มมีการสร้าง byssus เพื่อยึด

ติดกับพื้นและเข้าสู่ระยะ metamorphosis จากนั้น velum จะเริ่มหลุดออก ในระยะเวลา 6 สัปดาห์จะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ระยะ metamorphosis ของ *B. thoracites* (Nair & Saraswathy, 1971)

- A-B. มีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ veliger มีแผ่นรูปครึ่งวงกลมบาง ๆ ยื่นออก 2 ข้างของลำตัวเหมือนปีกผีเสื้อเรียกว่า velum ทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำและมีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอน
- C-E. หลังจากนั้น 15 วัน เริ่มพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ pediveliger สร้างอวัยวะคล้ายเท้า, gill, siphon และเริ่มมีการสร้างสารเหนียวเพื่อยึดเกาะกับพื้นผิวไม้ ซึ่งระยะตัวอ่อนจะเป็นเพศ protandric hermaphrodite
- F-H. เริ่มเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยประมาณ 6 สัปดาห์ velum จะหลุดออก เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว กินอาหารที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของเนื้อไม้
- I. ระยะตัวเต็มวัย 8 สัปดาห์ เจริญเติบโตเต็มที่สำหรับสืบพันธุ์ มีช่วงชีวิตเฉลี่ย 1-2 ปี เพศส่วนใหญ่เป็นเพศแยกในตัวเต็มวัย แต่ไม่สามารถแยกให้เห็นความแตกต่างจากภายนอกได้

การแพร่กระจาย

เพรียงเจาะไม้มีหลายชนิดแพร่กระจายกันอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีน้ำเค็มเข้าถึง แม้กระทั่งทะเลแถบขั้วโลก สำหรับในประเทศไทยพบได้ทั้งในเขตน้ำเค็มและน้ำกร่อย บริเวณป่าชายเลนอาศัยอยู่ตามต้นตะบูนและ โกงกาง ในภาคตะวันออก เช่น จังหวัดจันทบุรี ตราด และภาคใต้ เช่น จังหวัดสงขลา เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายให้กับเรือและสะพานไม้ โดยจะกัดกินผิวนอกของไม้ให้เป็นรูทำให้เกิดการกร่อนเมื่อถูกกระแสน้ำ

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ปัจจุบันเพรียงเจาะไม้นั้นหาได้ยาก มีราคาค่อนข้างแพง และเป็นที่ยอมรับมารับประทานสด ๆ หรือนำมาประกอบอาหาร ชาวบ้านจึงได้มีการเลี้ยงเพรียงแบบธรรมชาติในเขตพื้นที่ป่าชายเลน โดยการตัดไม้เนื้ออ่อนออกเป็นท่อน ๆ เช่น โกงกางและตะบูน เป็นต้น นำไปวางยังจุดที่น้ำทะเลท่วมถึง จากนั้นระยะตัวอ่อนของเพรียงเจาะไม้จะเข้ามาอาศัยโดยการเกาะและเจาะรูกินเนื้อไม้เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ปี จึงเก็บขายได้ในราคากิโลกรัมละ 800-1000 บาท ทำให้ชาวบ้านยึดเป็นอาชีพที่สามารถทำรายได้ให้กับครอบครัวได้เป็นอย่างดี

ความสัมพันธ์กับชุมชน

ชาวบ้านในจังหวัดจันทบุรี และตราด นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย โดยเชื่อว่าเพรียงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง บริโภคแล้วร่างกายจะแข็งแรง บำรุงสมอง ส่วนมากนิยมบริโภคกันในช่วงเดือน 5-6 เพราะตัวเพรียงจะอ่อน หวาน อร่อย แต่ในช่วงเดือน 8-10 เป็นช่วงที่ตัวเพรียงมีไข่ รสชาติจะขมไม่อร่อย และช่วงเดือน 12 เดือนอ้าย เพรียงจะแก่ ตัวจะมีสีเขียวและออกจากรูเนื้อไม้ว่ายน้ำตามชายฝั่ง เมื่อไปสัมผัสตัวจะขาดเป็นท่อน ๆ

ชีววิทยาทั่วไปของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis*

Nematopsis ได้มีการสำรวจพบครั้งแรกที่ประเทศฝรั่งเศส โดย Schneider (1892) พบระยะ oocysts ใน mantle ของหอยกาบ (*Solen vagina*) *Nematopsis* จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม apicomplexa สมาชิกในไฟลัมนี้มีมากกว่า 4,000 ชนิด จัดเป็นโปรติสตา (protista) โบราณกลุ่มหนึ่ง อยู่ในคลาส sporozoa ซึ่งสิ่งมีชีวิตในคลาสนี้ มีการดำรงชีวิตเป็นปรสิตทั้งหมด sporozoite มีหรือไม่มีผนังหุ้ม เมื่อเข้าไปอยู่ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านจะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็น เซฟฟาริน กริการิน (cephaline gregarine) และสปอร์ราดิน (sporadins) ซึ่งมี 1 อัน หรือ หลายอันเชื่อมติดกันและสร้างเกราะหุ้ม ในส่วนของนิวเคลียส, ไซโทพลาสซึม มีการแบ่งและสร้างจิมโนสปอร์ (gymnospore) จำนวนมาก วงศ์ porosporidae พบว่า มีอยู่ 2 ชนิด คือ *Porospora* และ *Nematopsis* ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นปรสิตภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เช่น กุ้งและปู เป็นต้น แต่ใน

ปัจจุบันมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ โดยปรสิตในกลุ่มนี้เป็นปรสิตที่พบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสีย คือ ข้อดี ปรสิตในกลุ่ม apicomplexa เป็นปรสิต พบในแมลง ซึ่งจะเป็นตัวที่ใช้ในการทดลองเพื่อควบคุมประชากรของแมลง ส่วนข้อเสียพบว่า ในปรสิตบางชนิดก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรง เช่น plasmodium ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง (ประไพศิริ สิริกาญจน, 2538)

อนุกรมวิธานของ *Nematopsis* sp. (Belofastova, 1996)

Phylum	Apicomplexa
Class	Sporozoa
Subclass	Gregarinida
Order	Eugregarinida
Family	Porosporidae
Genus	<i>Nematopsis</i>

ลักษณะทั่วไปของโปรโตซัวปรสิตใน phylum apicomplexa บางชนิดมีวงจรชีวิตแบบ direct cycle คือเจริญใน host ชนิดเดียว แต่ปรสิตบางชนิดต้องอาศัย host ตัวกลาง (intermediate host) พบลักษณะที่เป็น apical complex ในระยะ sporozoite และ merozoite ของวงจรชีวิต phylum apicomplexa ประกอบด้วยหลาย class ลักษณะสำคัญของ class sporozoa คือ ปรสิตในกลุ่มนี้จะมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะมีการสร้าง spore เรียกว่า ระยะ sporogony และลักษณะที่สำคัญของ subclass gregarinida คือ เป็นปรสิตที่มีระยะสืบพันธุ์โดยอาศัยอยู่ใน host สามารถเคลื่อนที่ได้โดยการ flexion หรือ gliding โดยอาศัยลักษณะของพื้นผิวลำตัว ที่มีลักษณะเป็นสัน โดยปรสิตที่อยู่ใน order eugregarinida จะพบระยะ gamogony และ sporogony ไม่พบระยะ merogony ปรสิตใน order eugregarinida ประกอบด้วย 3 suborder คือ blastogregarinorina, aseptatorina และ septatorina โดย suborder aseptatorina และ blastogregarinorina ไม่พบ septum ระหว่าง protomerite และ deutomerite ในระยะ gamont แต่ suborder septatorina พบ septum ระหว่าง protomerite และ deutomerite ในระยะ gamont suborder Septatorina ประกอบด้วย superfamily porosporicae ซึ่งโปรโตซัวที่จัดอยู่ใน superfamily นี้จะมีวงจรชีวิตอยู่ใน host 2 ชนิด สำหรับ family porosporidae ประกอบด้วย 3 genus คือ *Pachyporospora*, *Porospora* และ *Nematopsis* ในส่วนของ genus *Pachyporospora* ต่างจาก genus *Porospora* และ *Nematopsis* โดยระยะ gamont ประกอบด้วย

2-3 นิวเคลียส และ genus *Porospora* ต่างจาก genus *Nematopsis* โดยพบว่า sporozoites ที่พบในหอย ไม่มี sporocyst หุ้ม นอกจากนี้ genus *Porospora* ยังมีลักษณะเด่นอีก คือ sporozoite พบใน leukocytes และ mature trophozoites มีลักษณะยาวมักอยู่เดี่ยว ๆ (Clopton, 2000)

ลักษณะวิทยาของ *Nematopsis*

Nematopsis พบว่า แบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้ (บพิช และ นันทพร จารุพันธ์, 2540)

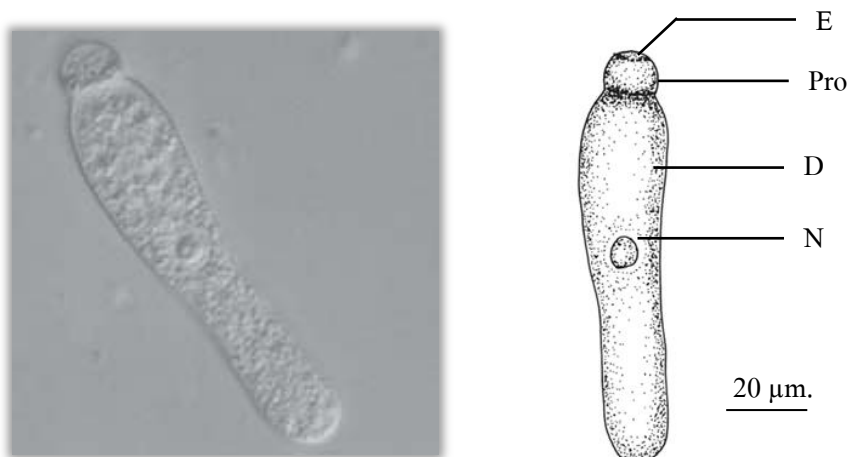
1. ระยะ trophozoite หรือที่เรียกว่าระยะ gamonts โดยส่วนหน้าและส่วนท้ายจะมีลักษณะกลมแต่ส่วนท้ายจะกลมน้อยกว่าส่วนหน้า มีนิวเคลียส 1 อัน รูปร่างกลมหรือรี ตั้งอยู่ส่วนที่ 1-3 ตามความยาวของลำตัว ระยะนี้มีส่วนหัวคือ ส่วน protomerite ประกอบด้วย granule จำนวนมากอาจจะมี หรือไม่มีส่วนของ epimerite ยื่นออกมาทางด้านหน้าของส่วนหัวก็ได้ และมีส่วนของ deutomerite เป็นส่วนของลำตัวซึ่งเป็นรูปทรงกระบอก (ภาพที่ 5)

2. ระยะ syzygy ซึ่งระยะนี้เป็นการเชื่อมต่อกันของ trophozoite ตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป เป็นการต่อกันแบบหัวต่อหาง อาจจะทำตามยาวหรือเชื่อมต่อบนสามง่ามก็ได้ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ (ภาพที่ 6)

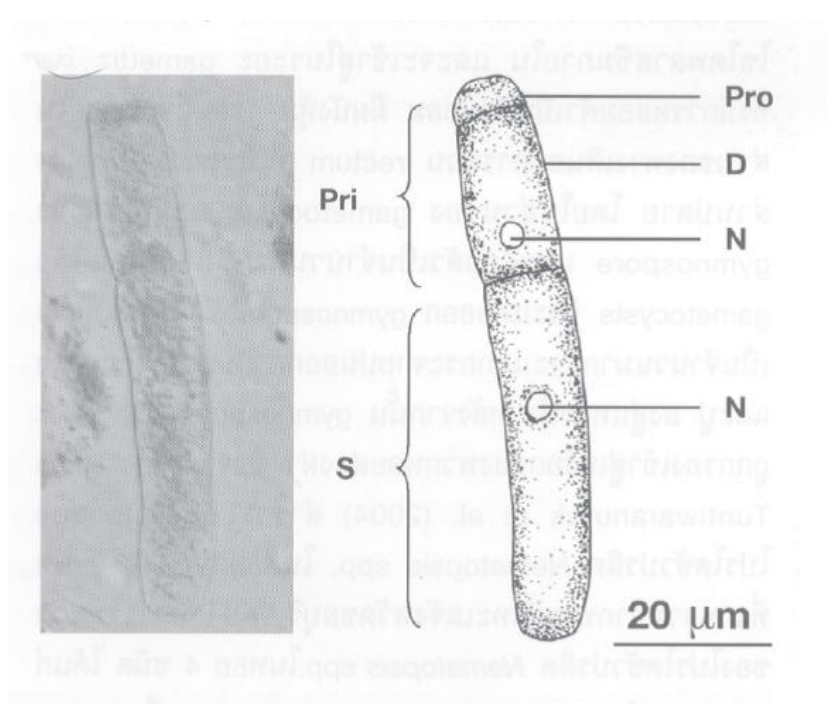
2.1 primite ประกอบด้วยส่วนหัว คือ protomerite รูปร่างกลมหรือรี ลำตัว คือ ส่วน deutomerite เป็นรูปทรงกระบอกยาว มีนิวเคลียส 1 อัน

2.2 satellite เป็นทรงกระบอก มีนิวเคลียส 1 อัน ค่อนไปทางด้านท้ายของลำตัว

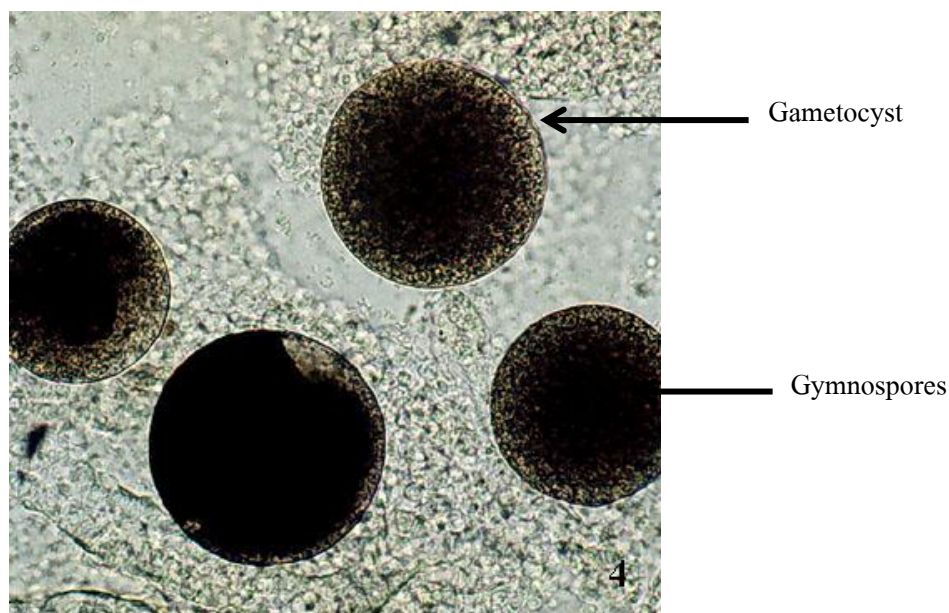
3. ระยะ gametocyst เป็นระยะที่มีการหลอมรวมกันของ syzygy เป็นวงกลมแล้วสร้างผนังหุ้มล้อมรอบ gametocyst มีสีดำหรือสีน้ำตาล ภายในมี gymnospires บรรจุอยู่จำนวนมาก เมื่อ gametocyst แตกออกก็จะปล่อย gametocyst สู่ออก (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 5 ลักษณะ trophozoite ของ *Nematopsis* sp. ในกึ่งทราเย (*Metapenaeosis* sp.) (ชนวัฒน์ ต้นติวรานูรักษ์ และชนัญญา เสมศรี, 2548) ประกอบด้วย epimerite (E), protomerite (Pro), deutomerite (D), satellite (S) และ nucleus (N)



ภาพที่ 6 ลักษณะ syzygy ของ *Nematopsis* sp. ในกึ่งทราเย (*Metapenaeosis* sp.) (ชนวัฒน์ ต้นติวรานูรักษ์ และชนัญญา เสมศรี, 2548) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ
 (a) primitive (Pri) ประกอบด้วย protomerite (Pro), deutomerite (D) และ nucleus (N)
 (b) satellite (S) ประกอบด้วย nucleus (N)

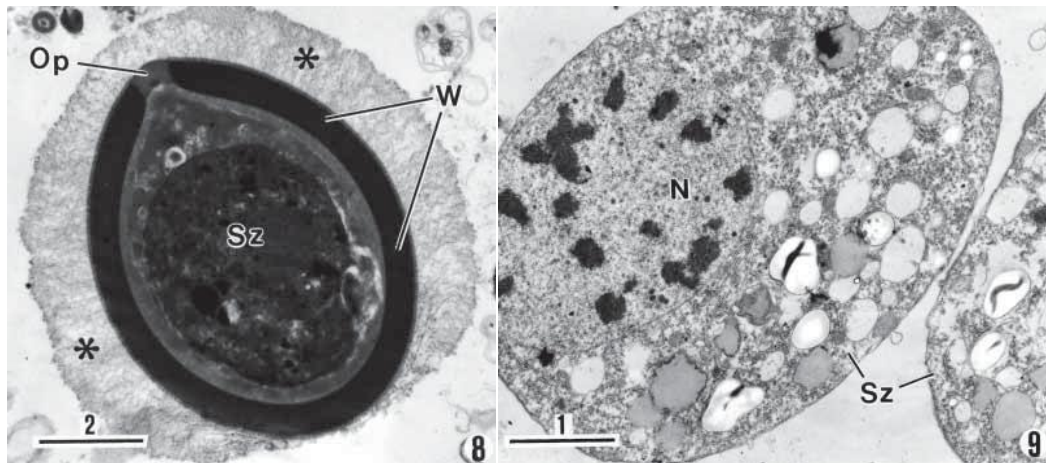


ภาพที่ 7 ลักษณะ gametocyst ของ *Nematopsis* sp. ในกุ้งขาว (*Penaeus setiferus*) (ชนวัฒน์ ตันติวรานุกรักษ์ และชนัญญา เสมศรี, 2548) ประกอบด้วยผนังหุ้มล้อมรอบ gametocyst ภายในมี gymnospires บรรจุอยู่

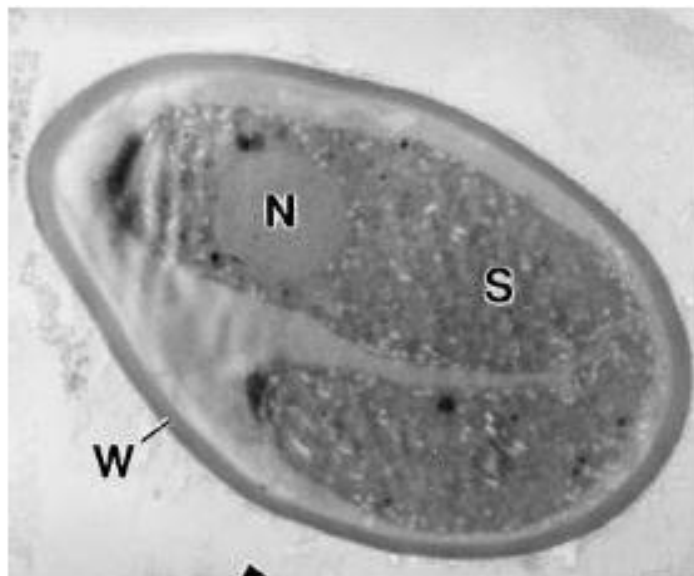
รายงานการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของ *Nematopsis* ที่พบในสัตว์กลุ่ม decapods มีลักษณะหลายรูปแบบในระยะต่างกัน เช่น oocyst, trophozoite, gamont, syzygy, gametocyst และ gymnospor โดยส่วนใหญ่จะศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

Nematopsis sp. ระยะ oocyst (ภาพที่ 8-9) (Azevedo & Cachola, 1992; Azevedo & Padovan, 2004) มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ผนังภายนอกมี microfibril เป็นตัวเชื่อมต่อกับเซลล์ของเจ้าบ้าน ภายในพบตัวอ่อน sporozoite ที่บริเวณปลายสุดด้านบนของเปลือกเป็นรูเปิดกลม เรียกว่า operculum

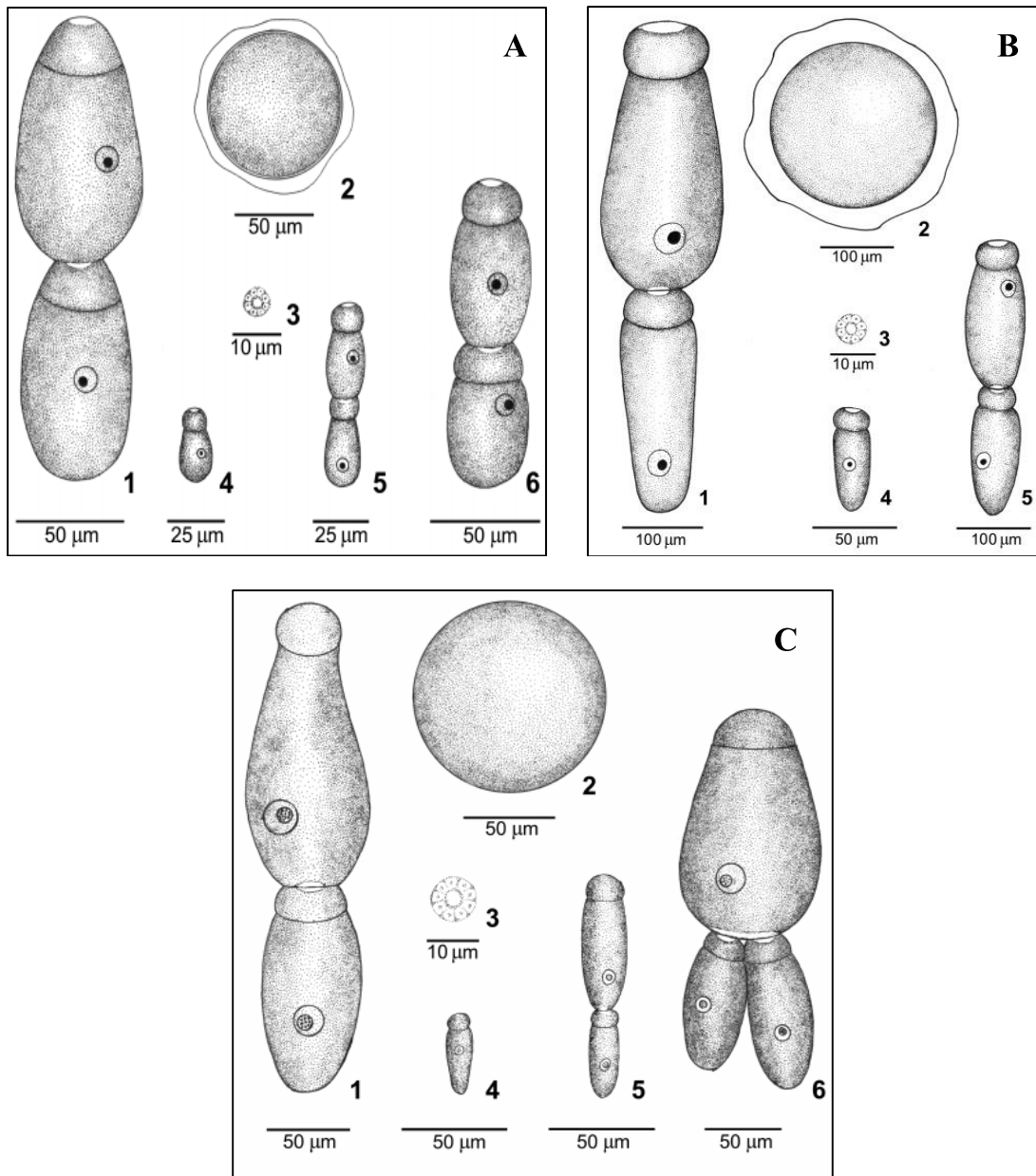
Nematopsis sp. ระยะ trophozoite (ภาพที่ 10-20) (Prasadan & Janardanan, 2001; Valigurova & Koudela, 2008; Poulpanich & Withyachumnarnkul, 2009; Valigurova, Michalkova, & Koudela, 2009; Rueckert, Simdyanov, Aleoshin, & Leander, 2011; Valigurova, Vaškovicova, Musilova, & Schrevel, 2013) บริเวณส่วนหัว (protomerite) จะมีลักษณะเป็นรูปทรงกรวยยื่นออกมาทางด้านหน้า และมี epimerite อยู่ส่วนหน้าสุด ส่วนลำตัว (deutomerite) รูปร่างคล้ายแท่งกระบอก มีนิวเคลียส 1 อัน ลักษณะทรงกลมอยู่ก่อนไปทางด้านท้ายของลำตัว มีเยื่อเกี่ยวพันระหว่างส่วนหัวกับส่วนของลำตัว



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของ *N. mytella* ระยะ oocyst (Azevedo & Cachola, 1992)
พบ wall (W), sporozoite (Sz) และผนังภายนอกมี microfibrils (*) ด้านบนเป็นรูเปิด operculum (Op)



ภาพที่ 9 ลักษณะทั่วไปของ oocyst ที่มี sporozoite อยู่ภายใน (Azevedo & Padovan, 2004)
ประกอบด้วย wall (W), nucleus (N) และ sporozoite (S)

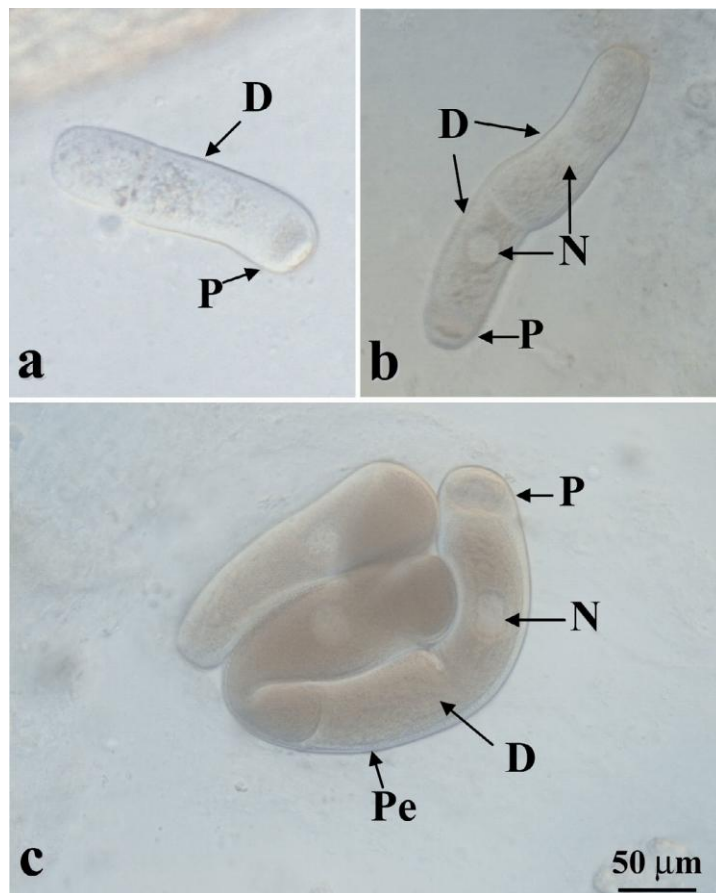


ภาพที่ 10 A. ลักษณะ trophozoite ของ *Nematopsis messor* B. *Nematopsis quadratum*

C. *Nematopsis annulipes* (Prasadan & Janardanan, 2001)

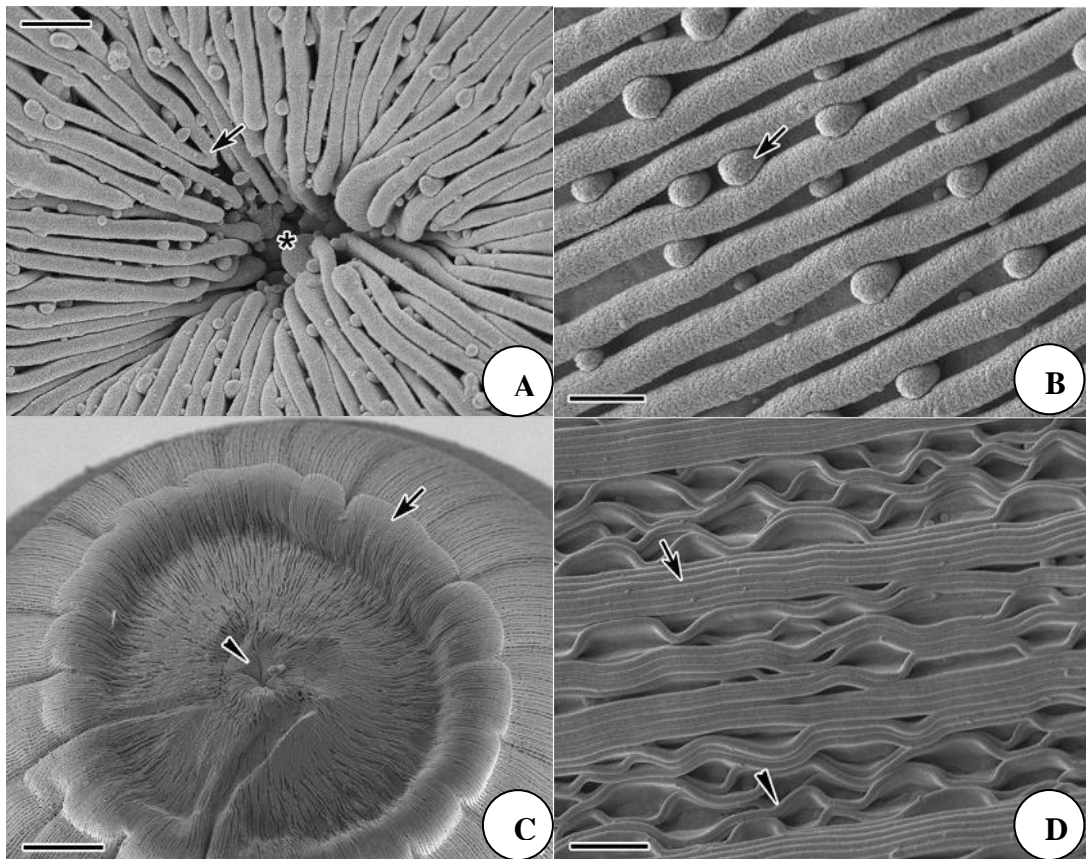
1. late association; 2. gametocyst; 3. gymnospor; 4. early trophozoite;

5-6. early association



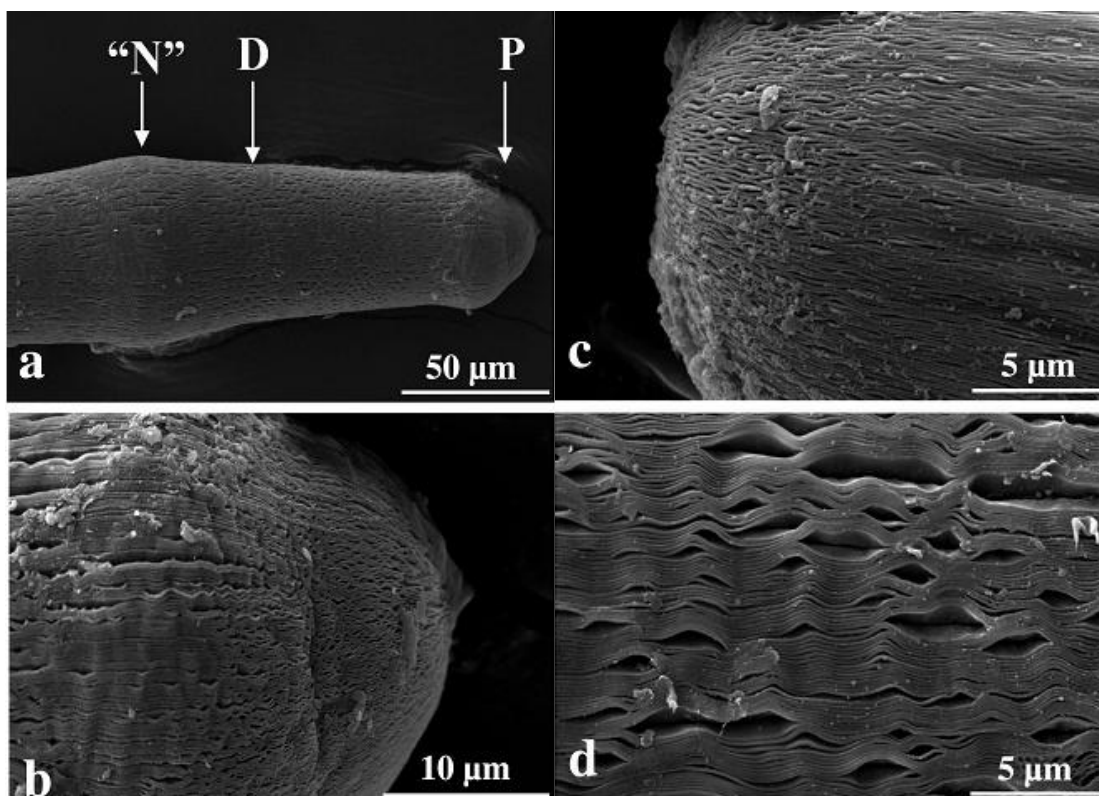
ภาพที่ 11 ลักษณะ trophozoite ของ *Nematopsis* sp. ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Poulpanich & Withyachumnarkul, 2009)

- a. immature trophozoite ประกอบด้วย protomerite (P), deutomerite (D)
- b. early association ประกอบด้วย protomerite (P), deutomerite (D) และ nucleus (N)
- c. lateral association ประกอบด้วย protomerite (P), deutomerite (D), nucleus (N) และ pellicle (Pe)



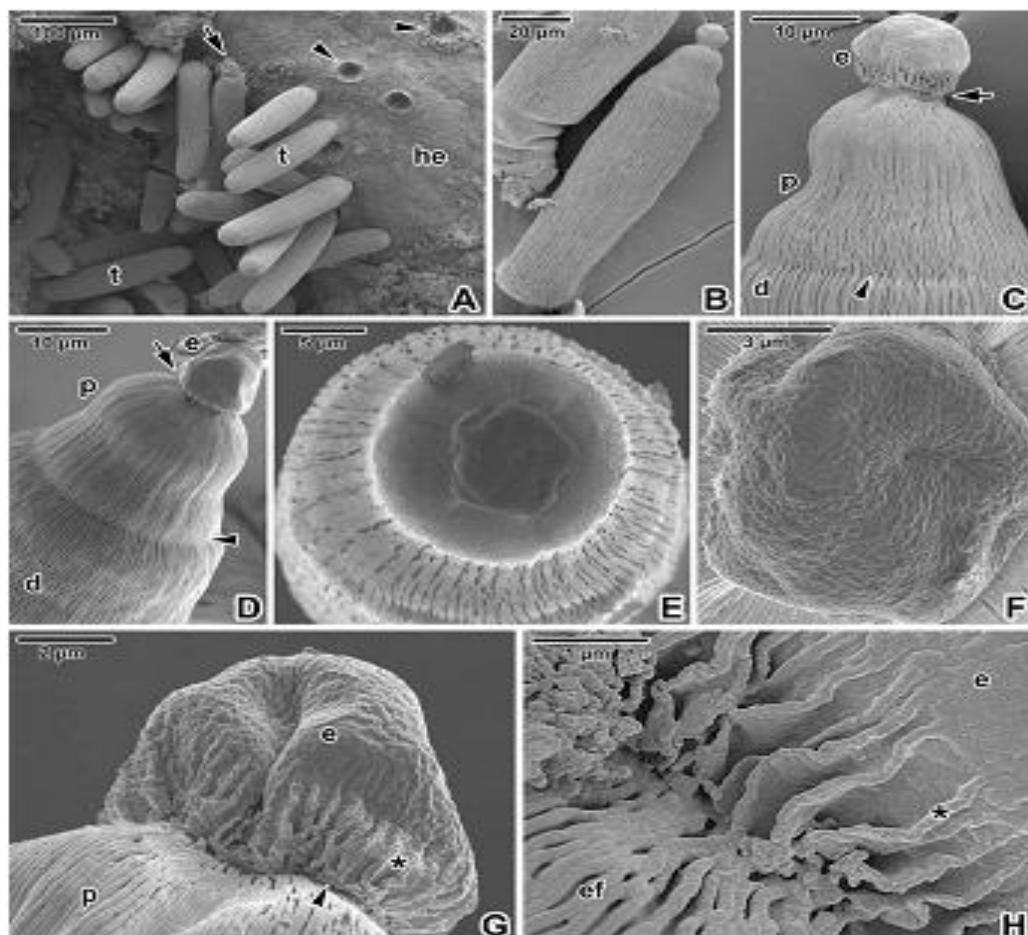
ภาพที่ 12 สัณฐานวิทยาภายนอกของ *Gregarina garnhami* ระยะ trophozoite ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Valigurova & Koudela, 2008)

- A. แสดงบริเวณปลายสุดของ protomerite มองเห็นเป็นหลุมลึกชัดเจน (*) และ epicytic fold (ลูกศรชี้) scale bar = 1 μ m
- B. แสดง protomerite epicytic folds และ mucus drops (ลูกศรชี้) scale bar = 500 nm
- C. บริเวณปลายสุดของ protomerite ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นเนิ่นชัดเจน (ลูกศรชี้) และมองเห็นหลุมชัดเจน (หัวลูกศร)
- D. แสดงบริเวณพื้นผิว ซึ่งมีลักษณะเป็นคลื่น (หัวลูกศร) และเป็นเส้นตรง (ลูกศรชี้) บริเวณ deutomerite



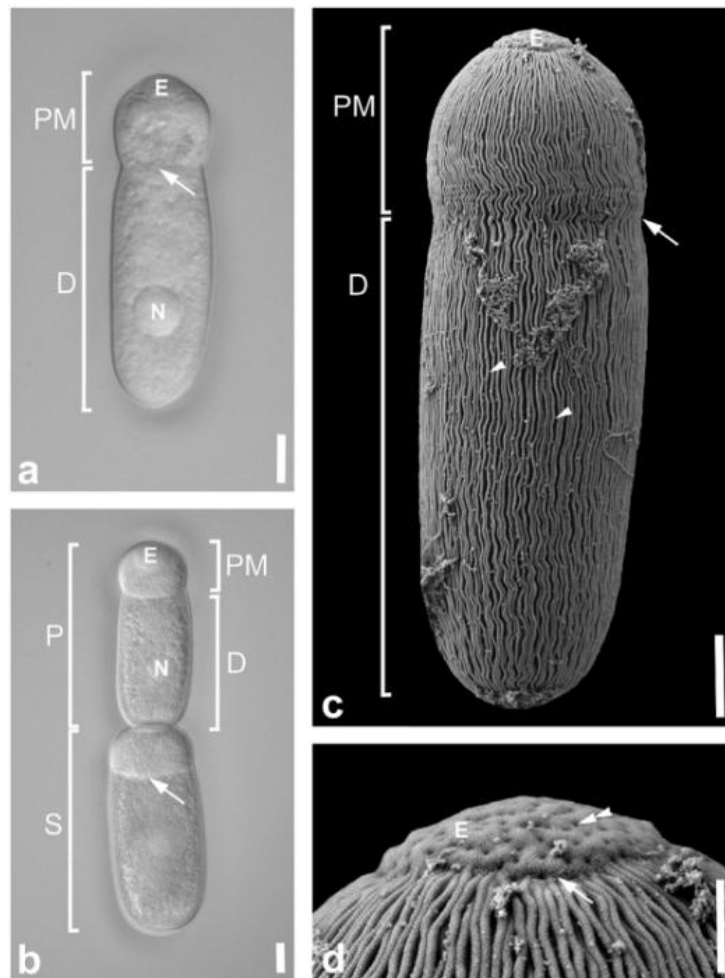
ภาพที่ 13 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Nematopsis* sp. ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Poulpanich & Withyachumnarnkul, 2009)

- a. แสดง protomerite (P) deutomerite (D) และ ตำแหน่งที่มี nucleus (N)
- b. แสดง protomerite
- c. แสดงปลายสุดของ trophozoite
- d. ภาพกำลังขยายสูงแสดงพื้นผิว epicytic fold



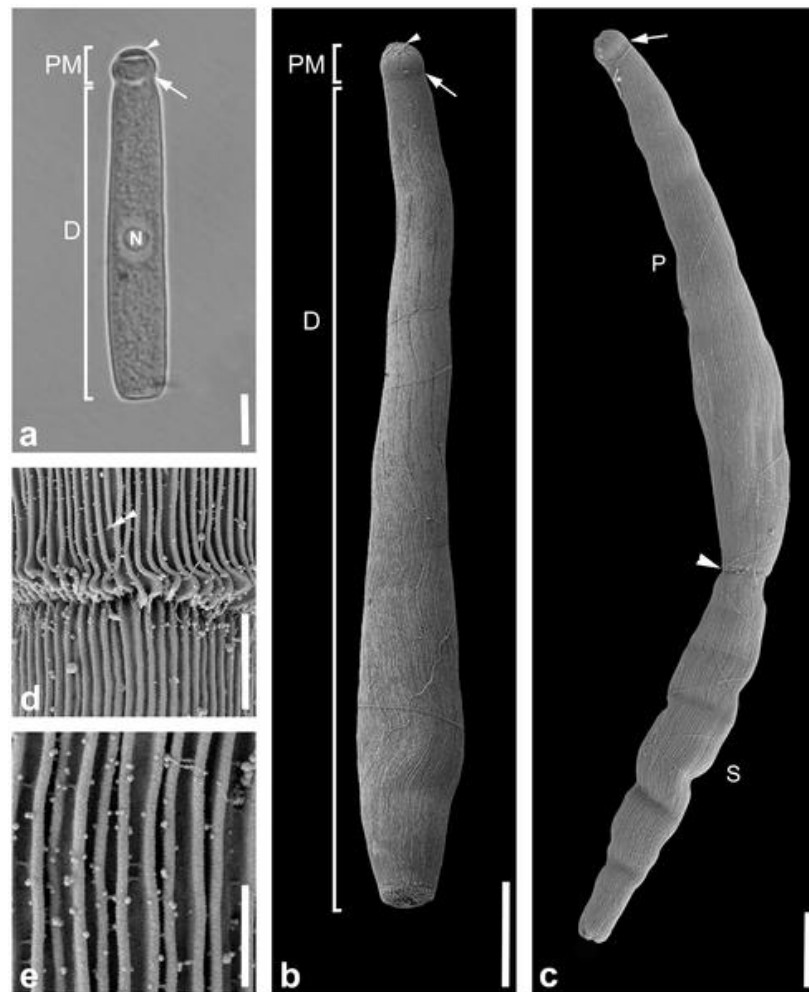
ภาพที่ 14 สัณฐานวิทยาภายนอกของ *Gregarina polymorpha* ระยะ trophozoite ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Valigurova et al., 2009)

- A. trophozoites (t) ยึดเกาะอยู่กับ host intestinal epithelium (he) และบริเวณที่มีการยึดเกาะ (ลูกศรชี้)
- B. Mature trophozoite
- C-D. ภาพกำลังขยายสูงบริเวณ epimerite (e) และ protomerite (p) บริเวณที่พื้นผิวเชื่อมต่อกัน (ลูกศรชี้) และ septum (หัวลูกศร) ระหว่าง protomerite และ deutomerite (d)
- E-F. ภาพด้านบนแสดงบริเวณ epimerite
- G. ภาพตามยาวแสดงบริเวณ epimerite (e) บริเวณที่พื้นผิวห่อรวมกัน (หัวลูกศร) และ epimerite plasmamembrane (*)
- H. ภาพกำลังขยายสูงบริเวณ epimerite (e) protomerite epicytic folds (ef) และ epimerite plasma membrane (*)



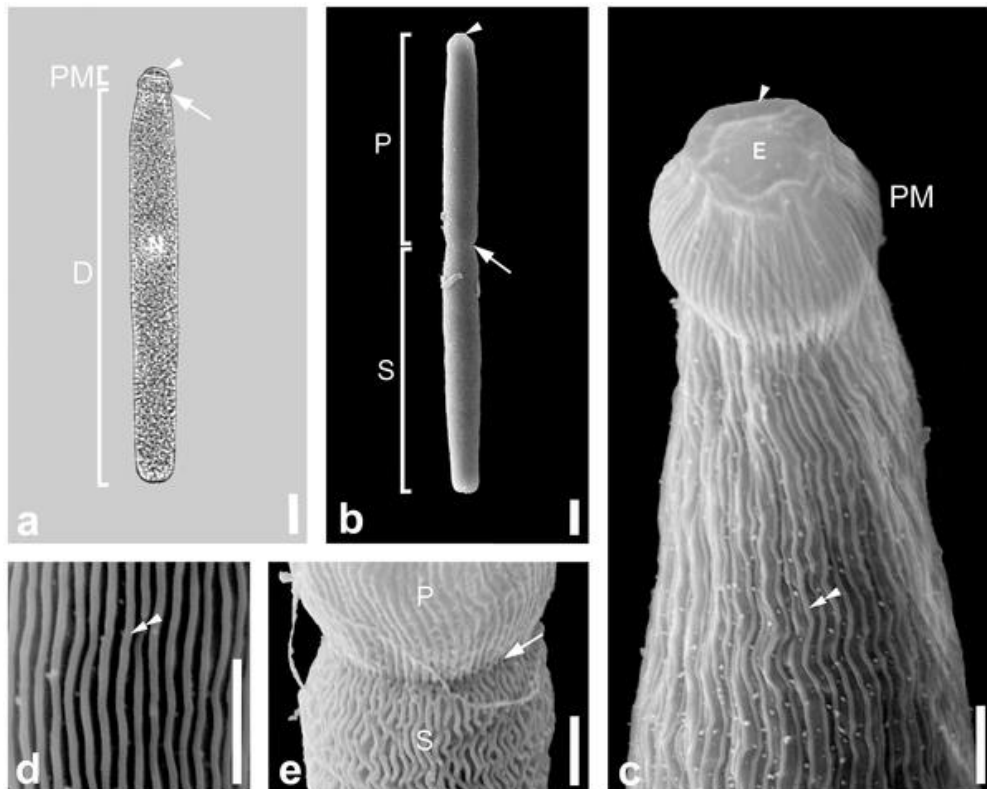
ภาพที่ 15 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Cephaloidophora communis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Rueckert et al., 2011)

- a-b. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงประกอบด้วย protomerite (PM), deutomerite (D), satellite (S), epimerite (E) และ nucleus (N) บริเวณลูกศรชี้แสดงให้เห็น septum ระหว่าง protomerite กับ deutomerite
- c-d. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วย protomerite (PM), deutomerite (D) และ epimerite (E)



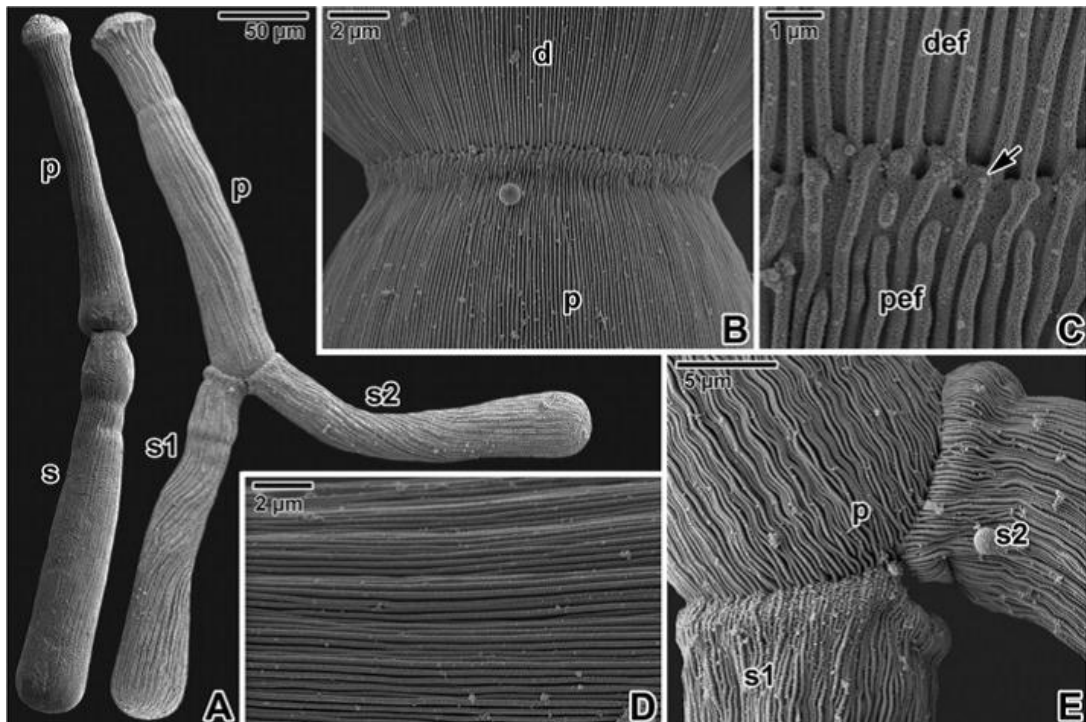
ภาพที่ 16 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Heliospora caprellae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Rueckert et al., 2011)

- a. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงประกอบด้วย protomerite (PM), deutomerite (D) และ nucleus (N) บริเวณปลายสุดของส่วน protomerite มี epimerite ขนาดเล็ก
- b-e. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
- b. แสดง protomerite (PM) ขนาดเล็ก และ deutomerite (D) ส่วนปลายของ deutomerite กว้างกว่าส่วนต้น
- c. แสดงการเชื่อมต่อของ trophozoite สองตัว ประกอบด้วย primite (P) และ satellite (S)
- d. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อระหว่าง primite (P) และ satellite (S)
- e. ภาพกำลังขยายสูงแสดงพื้นผิว membrane ที่มีลักษณะเป็น epicytic fold



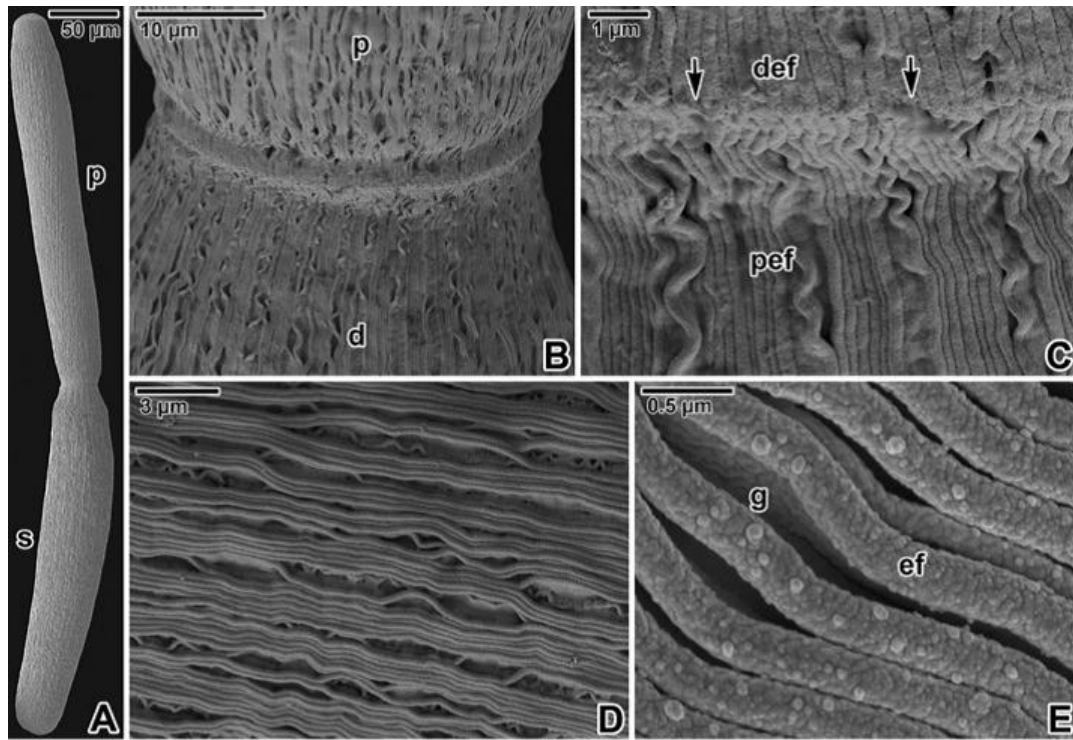
ภาพที่ 17 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Heliospora longissima* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Rueckert et al., 2011)

- a. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงประกอบด้วย protomerite (PM), deutomerite (D) และ nucleus (N)
- b-e. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
- b. แสดง primite (P) และ satellite (S)
- c. ภาพกำลังขยายสูงแสดงส่วน protomerite (PM) และ epimerite (E)
- d. ภาพกำลังขยายสูงแสดงพื้นผิว membrane ที่มีลักษณะเป็น epicytic fold (ลูกศรชี้)
- e. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อระหว่าง primite (P) กับ satellite (S)



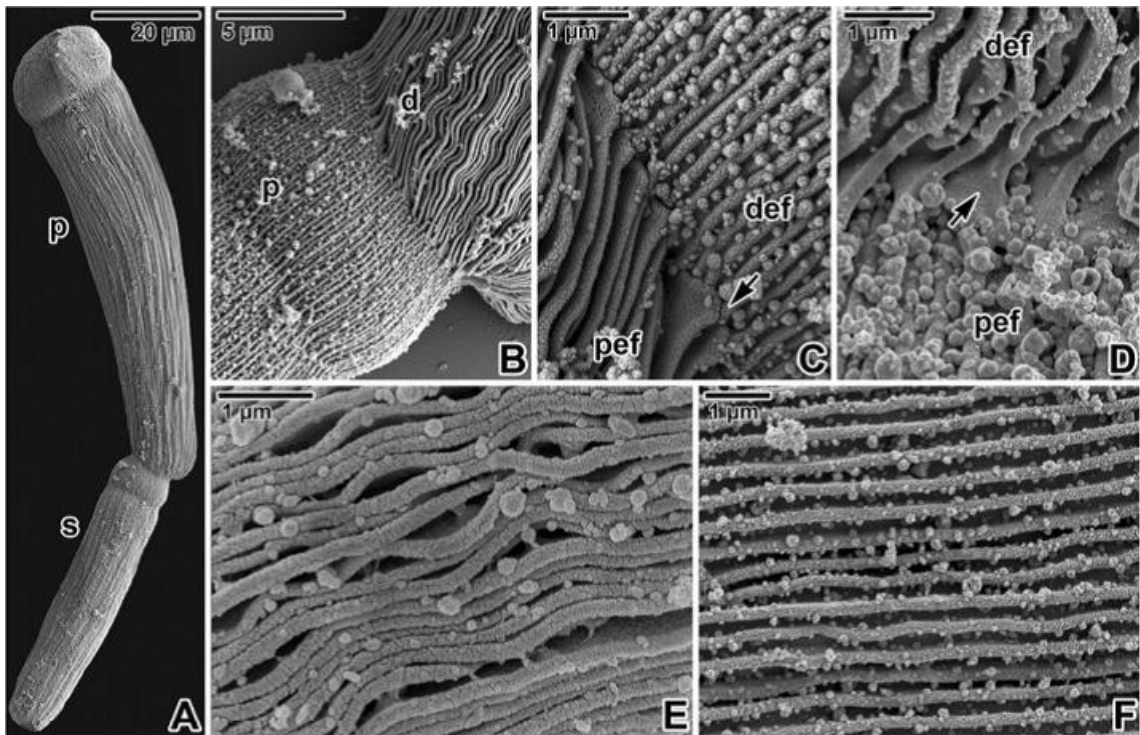
ภาพที่ 18 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Gregarina cuneata* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Valigurova et al., 2013)

- A. แสดงลักษณะ trophozoite ทั้งตัวประกอบด้วย primite (p) และ satellite (s, s1, s2)
- B. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อระหว่าง deutomerite ของ primite (d) กับ protomerite ของ satellite (p)
- C. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อ (ลูกศรชี้) ระหว่าง deutomerite ของ primite (def) กับ protomerite ของ satellite (pef)
- D. ภาพกำลังขยายสูงแสดง linear epicytic fold ของ deutomerite
- E. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อระหว่าง primite (p) กับ satellite (s1, s2) สองตัว



ภาพที่ 19 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Gregarina polymorpha* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Valigurova et al., 2013)

- A. แสดงลักษณะ trophozoite ทั้งตัวประกอบด้วย primite (p) และ satellite (s)
- B. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อระหว่าง deutomerite ของ primite (d) กับ protomerite ของ satellite (p)
- C. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อ (ลูกศรชี้) ระหว่าง deutomerite ของ primite (def) กับ protomerite ของ satellite (pef)
- D. ภาพกำลังขยายสูงแสดง linear epicytic fold ของ deutomerite
- E. ภาพกำลังขยายสูงแสดง epicytic fold (ef) และร่องระหว่าง lamina (g)

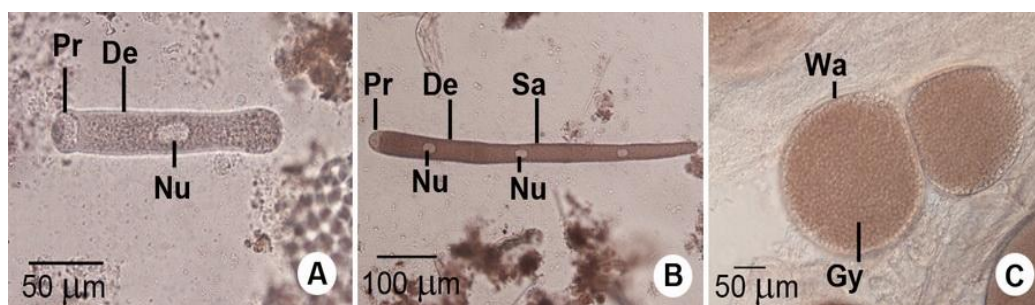


ภาพที่ 20 สัณฐานวิทยาภายนอกของ trophozoite ของ *Gregarina steini* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Valigurova et al., 2013)

- A. แสดงลักษณะ trophozoite ทั้งตัวประกอบด้วย primitive (p) และ satellite (s)
- B. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อระหว่าง deutomerite ของ primitive (d) กับ protomerite ของ satellite (p)
- C-D. ภาพกำลังขยายสูงแสดงรอยต่อ (ลูกศรชี้) ระหว่าง deutomerite ของ primitive (def) กับ protomerite ของ satellite (pef)
- E-F. ภาพกำลังขยายสูงแสดง linear epicytic fold ของ deutomerit

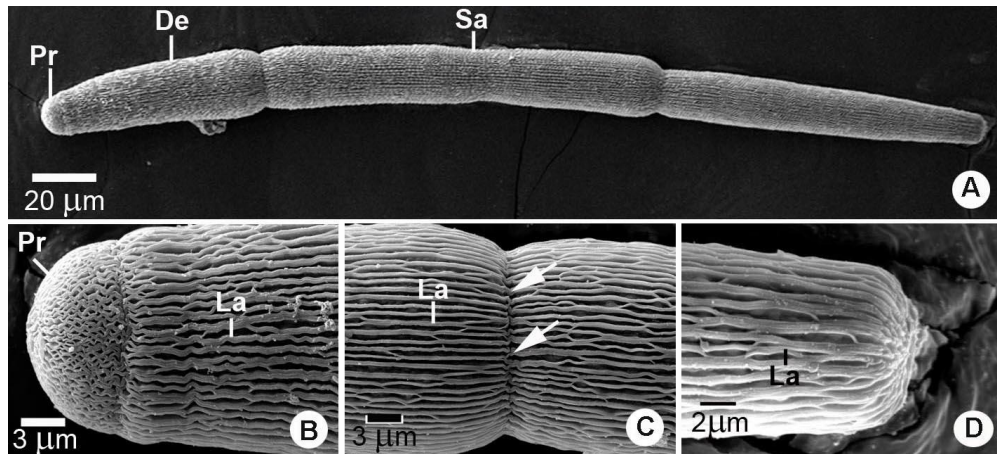
Nematopsis sp. ระยะ gamont (ภาพที่ 21) (ปณิธิ หนูน้อย, 2554) ลำตัวมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ส่วนบนโป่งออก ส่วนท้ายมีขนาดเล็กลง บริเวณส่วนหัว (protomerite) มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมรี หรือ pear-shaped บางชนิดมี epimerite อยู่ส่วนหน้าสุด ส่วนลำตัว (deutomerite) มีนิวเคลียส 1 อัน ลักษณะทรงกลมอยู่ก่อนไปทางด้านท้ายของลำตัว จะมีเยื่อเกี่ยวพันระหว่างส่วน protomerite และ deutomerite

Nematopsis sp. ระยะ syzygy (ภาพที่ 22) (ปณิธิ หนูน้อย, 2554) เป็นระยะที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่าง gamont ตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไป ลำตัวเป็นทรงกระบอก ผนังด้านนอกบาง ลำตัวแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ primite และ satellite ส่วนบนเรียกว่า primite ประกอบด้วยส่วน protomerite และ deutomerite โดย protomerite มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมรี ส่วน deutomerite มีลักษณะเป็นทรงกระบอกยาว ภายในพบมีนิวเคลียส 1 อัน ลักษณะทรงกลม ส่วนท้ายของ deutomerite มีลักษณะโปร่งออกตรงบริเวณที่ต่อกับ satellite โดยส่วนของ satellite มีลักษณะเป็นทรงกระบอกและยาวเรียวเล็กลงในตอนท้าย มีนิวเคลียส 1 อันก่อนอยู่ทางด้านท้ายของลำตัว



ภาพที่ 21 แสดงลักษณะของ *Nematopsis* sp. ทั้ง 3 ระยะ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ปณิธิ หนูน้อย, 2554)

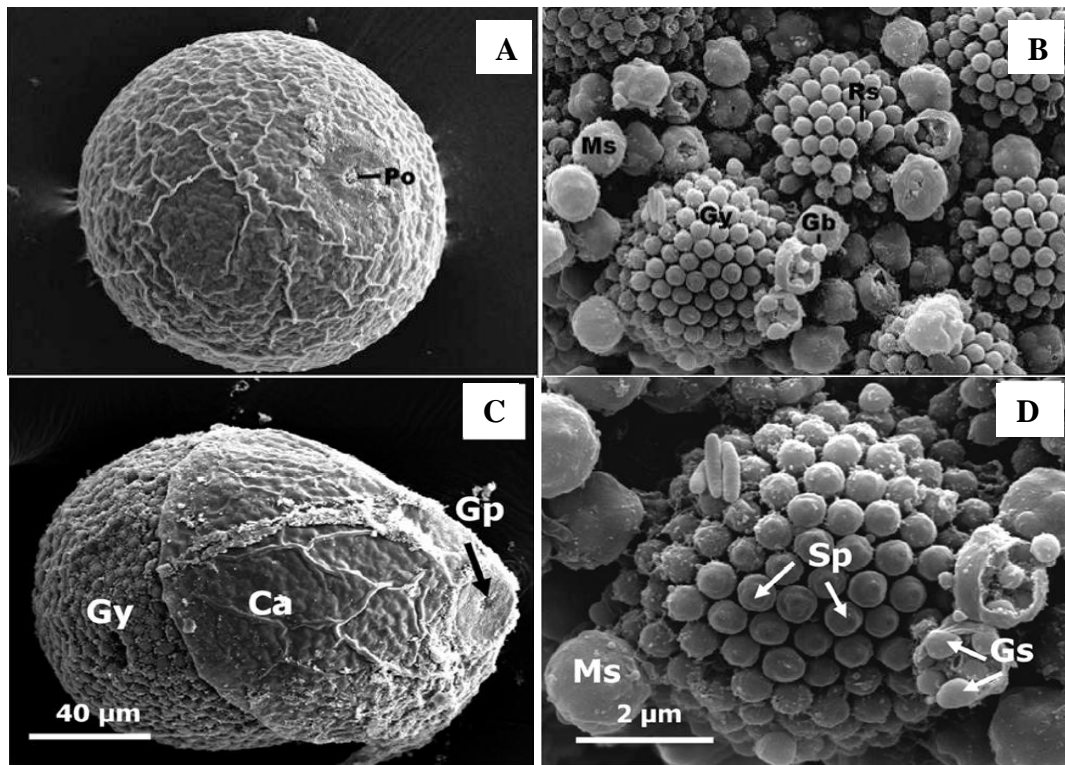
- A. แสดงลักษณะของ gamont ซึ่งประกอบด้วย protomerite (Pr), deutomerite (De) และ nucleus (Nu)
- B. แสดงลักษณะของ syzygy ซึ่งประกอบด้วย protomerite (Pr), deutomerite (De), satellite (Sa) และ nucleus (Nu)
- C. แสดงลักษณะของ Gametocysts ซึ่งประกอบด้วย ผนังเซลล์ของ gametocysts (Wa) และภายใน คือ gymnospores (Gy)



ภาพที่ 22 แสดงลักษณะของ *Nematopsis* sp. ระยะ syzygy ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (ปณิธิ หนูน้อย, 2554)

- A. แสดงลักษณะของ *Nematopsis* sp. ทั้งตัวประกอบด้วยส่วน protomerite (Pr), deutomerite (De) และ satellite (Sa)
- B-D. แสดงส่วน protomerite (Pr) (B), รอยต่อระหว่าง deutomerite และ satellite (C) ส่วนท้ายของ satellite (D) ซึ่งผิว membrane ของ syzygy ประกอบด้วย cytoplasmic lamella (La) ตั้งแต่ส่วน protomerite ไปจนถึงปลายสุดของ satellite

Nematopsis sp. ระยะ gametocyst (ภาพที่ 23) (Meepool et al., 2008; Tuntiwaranuruk, Boonmameepool, Noppharat-arphakul, & Upatham, 2015) เป็นระยะที่มีการหลอมรวมกันของ syzygy มีการขดตัวเป็นวงกลมเพื่อสร้างสปอร์ จากนั้นจะมีการสร้างผนังหุ้มล้อมรอบไว้ *Nematopsis* ระยะนี้เป็นช่วงที่มีการสืบพันธุ์และมีการสร้างสปอร์ขึ้นเป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 23 ลักษณะวิทยาภายนอกของ *Nematopsis* ระยะ gametocyst ในกิ้ง *Penaeus monodon* (Meepool et al., 2008; Tuntiwaranuruk et al., 2015)

- A. พื้นผิวด้านนอกของ gametocyst แสดงลักษณะของ cyst wall และ pore (Po)
- B. ลักษณะภายใน gametocyst ประกอบด้วย gymnospires (Gy) ซึ่งปกคลุมด้วย rod-like structures (Rs) และกลุ่มของ globular bodies (Gb) ซึ่งอยู่ภายใน membranous sac (Ms)
- C. gametocysts ของ *Nematopsis* sp. แสดงลักษณะพื้นผิวภายนอกของ cyst wall หรือ capsule (Ca), และ gymnospires (Gy) จำนวนมากภายใน interior ของ gametocysts
- D. interior gametocyst ของ *Nematopsis* sp. แสดง gymnospires (Gy) ประกอบด้วย sporozoites (Sp) จำนวนมาก membranous sacs (Ms) และมี globular structures (Gs)

วงจรชีวิตของ *Nematopsis*

วงจรชีวิตของ *Nematopsis* มีการสืบพันธุ์ทั้ง 2 แบบ เป็นการสืบพันธุ์แบบสลับกันในวงจรชีวิต (ภาพที่ 24)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือ การที่ตัวเต็มวัย (trophozoite) 2 ตัวมารวมกันโดยตัวที่อยู่ด้านบนเรียกว่า primite และตัวที่อยู่ด้านล่างเรียกว่า Satellite ซึ่งเกิดขึ้นในทางเดินอาหารของสัตว์ในกลุ่ม decapod ซึ่งเป็น definitive host

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นการแบ่งตัว แยกหน่อ ซึ่งเป็นการแบ่งตัวให้ได้จำนวนมากเรียกว่า schizogony เกิดขึ้นในหอยซึ่งเป็น intermediate host การสืบพันธุ์ทั้ง 2 แบบ สามารถแบ่งออกเป็น 14 ระยะ ดังนี้ (Lee, Hutner, & Bovee, 1985)

ระยะที่ 1 คือ ระยะที่ sporocyst มีตัวอ่อน sporozoite เจริญอยู่ใน oocyst ซึ่งอยู่บริเวณเหงือกของหอย

ระยะที่ 2 คือ ระยะที่ sporozoite เริ่มออกจาก sporocyst ทางรูเปิด (operculum) มีลักษณะเป็นทรงกระบอกยาวและมีขนาดเล็กตอนท้าย เมื่อเข้าไปอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์จำพวก decapods

ระยะที่ 3-7 คือ ตัวอ่อนระยะ sporozoite พัฒนาไปเป็น gamont ในระยะนี้ลักษณะรูปร่างจะพัฒนาไปในลักษณะต่างกัน

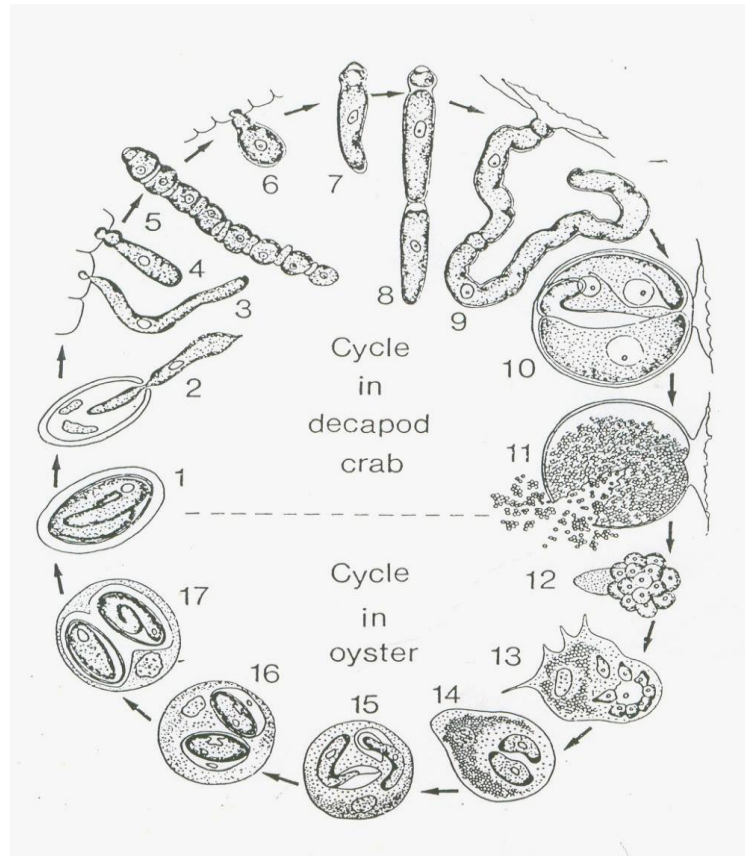
ระยะที่ 8-9 คือ ระยะ syzygy ซึ่งเกิดจาก gamont ตั้งแต่ 2 ตัวมาต่อกันแบบหัวต่อหาง โดยจะพบตลอดทางเดินอาหารตอนกลางของสัตว์พวก Decapod มีรอยแบ่งสองปล้องชัดเจน ส่วนบน เรียกว่า primite ส่วนที่มาต่อ เรียกว่า satellite ส่วนของ primite จะมีลักษณะเหมือนกับระยะ gamont ในส่วนของ satellite เป็นส่วนของอีกเซลล์หนึ่งที่มาต่อกันเพื่อผสมพันธุ์กันในระยะแกมีโตโกนี (gametogony) เมอโรซอซท์พัฒนาเป็นแกมีท 2 ชนิด คือ มาโครแกมีท และไมโครแกมีท เกิดปฏิสนธิให้ไซโกต จากนั้นมีการหลอมรวมกันบางส่วนและเกิดการขจัดตัว

ระยะที่ 10 คือ ระยะที่ syzygy มีการขจัดตัวกลายเป็น gametocyst อยู่บริเวณ rectum ของสัตว์พวก decapod ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงกลมและมีผนังหุ้มหนา ภายในเป็นกลุ่มเซลล์ gymnospires ขนาดเล็กสีน้ำตาล

ระยะที่ 11 คือ ระยะที่ gametocyst ปล่อย oocyst ออกมาปะปนกับอุจจาระของ host และบางส่วนหลุดลอยลงน้ำ

ระยะที่ 12 คือ ระยะ gymnospire เดี่ยวเข้าไปเจริญในเหงือกหอยและเจริญเป็น sporozoites ภายใน sporocyst

ระยะที่ 13-17 คือ ระยะที่ sporogony เริ่มจากไซโกตที่มีโครโมโซม $2n$ แบ่งตัวแบบไมโอซิส ลดจำนวนโครโมโซมเหลือ n เดียว แล้วแบ่งแบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เซลล์ที่เกิดขึ้น คือ สปอโรซอइट (sporozoite) ซึ่งเป็นระยะติดต่อกับ (infective stage) สปอโรซอइटที่รวมกันอยู่ภายในเนื้อเยื่อหุ้มไซโกตเดิม คือ oocyst เข้าสู่ระยะที่เริ่มต้นใหม่



ภาพที่ 24 วงจรชีวิตของโปรโตซัวปรสิต *N. ostrearum* (Lee et al., 1985)

1. sporocyst ที่มีตัวอ่อนอยู่ภายใน
2. sporozoite เริ่มออกจาก sporocyst
- 3-7. ตัวอ่อนระยะ gamonts
- 8-9. ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบ syzygy
10. ระยะ gametocyst
11. ระยะที่ gametocyst ปล่อย gymnosporidia
12. ระยะ gymnosporidia เดี่ยว
- 13-17. ระยะที่ gymnosporidia เจริญเป็น sporozoites

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของ *Nematopsis*

การระบาดในหอย

Jones (1975) พบสปอร์ของ *Nematopsis* ชนิดใหม่ ในหอยแมลงภู่ *Perna canaliculus* ซึ่งเป็นรายงานการค้นพบครั้งแรกของ sporozoan parasite ในหอยจากประเทศนิวซีแลนด์

Azevedo and Cachola (1992) ศึกษาโครงสร้างของ oocyst ของปรสิตในกลุ่ม Apicomplexa ที่พบในเหงือกและกล้ามเนื้อของหอยสองฝา *Cerastoderma edule* และ *Ruditapes decussatus* ที่ประเทศโปรตุเกส oocysts มีผนังหนา 0.35 μm เป็นรูปกระสวยภายในมีตัวอ่อนระยะ vermiform 1 ตัว มีนิวเคลียส 1 อัน ส่วนตัวอ่อนระยะ sporozoite มีขนาด $13.3 \times 4.5 \mu\text{m}$ มีฝาปิดรูปกรวย (conical operculum) ผนังด้านนอกหุ้มด้วยเมือกบาง ๆ และมีส่วนของ microfibrils เกาะติดอยู่กับผนังเซลล์ของเจ้าบ้าน

การสำรวจการแพร่ระบาดของ *Nematopsis* โดย Belofastova (1996) ในหอยสองฝาและสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน บริเวณทะเลดำ ในประเทศยูเครน พบ *Nematopsis* ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ *N. iconito*, *N. legiri* และ *N. portunidarum* จากที่สำรวจพบทั้งหมด 4 ชนิด

Canestri-Trotti et al. (2000) สำรวจปรสิตในตัวอย่างหอยสองฝา ณ เมือง Chioggia และเมือง Goro ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 1996 ถึงเดือนพฤศจิกายน 1998 ทั้งหมด 375 ตัว พบตัวอย่างที่ติดเชื้อ Porospora มากที่สุด 325 ตัว คิดเป็นร้อยละ 86.7 รองลงมาคือ *Nematopsis* spp. 149 ตัว คิดเป็นร้อยละ 39.7 และพบน้อยที่สุดคือ *Perkinsus* sp. 63 ตัว คิดเป็นร้อยละ 27.5 ซึ่งโปรโตซัวที่พบทั้งหมดนั้นมาจากบริเวณเหงือก และแมนเทิลของหอยสองฝา

การสำรวจการแพร่ระบาดปรสิตในหอยแครง (*Cerastoderma edule*) จากบริเวณชายฝั่งทะเล Galicia ในประเทศสเปน โดย Carballal et al. (2001) ในช่วงเดือนมิถุนายน ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2542 จำนวน 1,020 ตัว จากแหล่งต่าง ๆ 34 แหล่ง พบว่ามีการระบาดของปรสิตหลายชนิด คือ neoplasia, bacterial organisms, protozoa และ metazoa ในจำนวนปรสิตที่สำรวจพบมีการระบาดของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* sp. ในทุก ๆ แหล่งที่ทำการศึกษา โดยมีค่าการระบาดร้อยละ 76

Padovan, Corral, Tavares, Padovan, and Azevedo (2003) สำรวจพบ *N. mytella* ซึ่งระบาดในหอยแมลงภู่ *Mytella falcata* และหอยนางรม *Crassostrea rizophorae* ในประเทศบราซิล โดยพบตัวอ่อนของ *N. mytella* ในระยะ oocyst ระบาดบริเวณซีเหงือก โดยแต่ละ phagocyte มี oocyst บรรจุอยู่ตั้งแต่ 1-19 oocyst แต่ละ oocyst จะมีลักษณะทรงกลม หรือรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-25 μm . มีขนาดกว้าง 8.4 μm . ยาว 13.2 μm .

Tuntiwaranuruk, Chalermwat, Upatham, Kruatrachue, and Azevedo (2004) ทำการสำรวจ oocysts ของ *Nematopsis* spp. ในหอยสองฝา 7 ชนิด ได้แก่ *Arcuatula arcuatula*, *Anadara granosa*, *Perna viridis*, *Paphia undulate*, *Donax faba*, *Meretrix meretrix* และ *Saccostrea cucullata* บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย จังหวัดชลบุรี พบว่า มีการระบาดของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* spp. มากที่สุดในเนื้อเยื่อเหงือกหอยกะพง (*A. arcuatula*) คิดเป็นร้อยละ 91.8 น้อยที่สุดในหอยแครง (*A. granosa*) คิดเป็นร้อยละ 59.2 และพบ oocyst มีลักษณะสัณฐานวิทยา ขนาดที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) แต่ผู้วิจัยยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น *Nematopsis* sp. ชนิดใด (species)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว ของ oocyst ของ *Nematopsis* sp. ในเหงือกหอยกะพง (*A. arcuatula*) หอยแครง (*A. granosa*) หอยแมลงภู่ (*P. viridis*) และหอยลาย (*P. undulata*) (Tuntiwaranuruk et al., 2004)

หอยสองฝา (n = 50)	ความยาว (μm)	ความกว้าง (μm)
หอยกะพง	16.3 ± 0.6(14.3-17.4)	12.0 ± 0.4 (10.9-12.6)
หอยแครง	16.9 ± 0.7(16.5-18.7)	12.7 ± 0.3(12.2-13.5)
หอยแมลงภู่	17.6 ± 0.7(16.01-9.1)	12.7 ± 0.4 (12.2-13.9)
หอยลาย	11.2 ± 0.5(9.2-12.0)	8.6 ± 0.5 (7.1-9.8)

Cremonte, Figueras, and Bureson (2005) ดำเนินการศึกษายาจำนวนประชากรของหอยกาบ (*Pitar rostrata*) ที่เมือง Uruguay พบว่ามี *Perkinsus* sp. ระบาดร้อยละ 22 ส่วน Rickettsia หรือ Chlamidialike ระบาดร้อยละ 11 และใน *Coccidia* มีการระบาดร้อยละ 78 ส่วน *Nematopsis* ระบาดบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวทางเดินอาหาร ร้อยละ 56

Berrilli, Ceschia, De Liberato, Di Cave, and Orecchia (2007) ได้ทำการสำรวจหอยสองฝา *Chamelea gallina* บริเวณทะเล Adriatic ซึ่งมีอัตราการตายเกิดขึ้นอย่างผิดปกติ จากผลการศึกษาพบว่า อัตราการตายของหอยนั้นเกิดจากการระบาดของ *Nematopsis* โดยคิดเป็นร้อยละ 100 ซึ่งการระบาดของ *Nematopsis* มีผลทำให้ระบบการทำงานของเหงือกลดลง ทำให้เนื้อเยื่อขาดออกซิเจน และหยุดการทำงาน

การสำรวจโปรโตซัวปรสิต และ Symbionts ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) จากปากแม่น้ำ Aveiro ในประเทศโปรตุเกส โดย Francisco, Hermida, and Santos (2010). ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2007 ถึงเดือนมกราคม 2008 จำนวน 1,161 ตัว พบว่ามีการระบาดของปรสิตหลายชนิด คือ *Nematopsis* sp. คิดเป็นร้อยละ 70, *Urastoma cyprinae* คิดเป็นร้อยละ 39, *Mytilicola* sp. (*M. intestinalis* และ *M. orientalis*) คิดเป็นร้อยละ 3.5, *Diphtherostomum* sp. คิดเป็นร้อยละ 58, *Prosorhynchus crucibulum* คิดเป็นร้อยละ 0.3, และ *Bathylaophonte azorica* คิดเป็นร้อยละ 0.3 มีการระบาดสูงสุดในช่วงฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วง

ลักษณะการก่อโรคในหอย

ทิพย์สุดา ผลภายี (2550) ทำการศึกษาโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ในหอยแครง (*A. granosa*) จากแหล่งเลี้ยงหอย อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี พบว่า มีการระบาดของ *Nematopsis* จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยทำการเปรียบเทียบเนื้อเยื่อทั้ง Epithelial cell และ Connective tissue ของเนื้อเยื่อหอยที่มีการระบาดของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* sp. พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในกรณีที่มีการระบาดปริมาณน้อย แต่ในกรณีที่มีการระบาดปริมาณมาก พบว่า เนื้อเยื่อส่วน Epithelial cell และ Connective tissue บริเวณที่มีการระบาดมากจะมีการเรียงตัวของเซลล์ไม่เป็นระเบียบ และเซลล์บริเวณนี้ Cilia จะหายไปทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดของหอยได้ บริเวณที่เซลล์เปลี่ยนแปลงรูปไป

การระบาดในกุ้งและปู

ชนวัฒน์ ตันติวานุรักษ์ และศรีัญญา สุภาพร โภท (2545) ได้ทำการสำรวจโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* spp. ในทางเดินอาหารของกุ้งแชบ๊วย จากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย ณ แหล่งสะพานปลาอ่างศิลา พบว่า มีการระบาดของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* spp. คิดเป็นร้อยละ 92.7 และเมื่อศึกษาการระบาดโดยแบ่งเป็นส่วนภายในทางเดินอาหาร พบว่า มีการระบาดมากที่สุดที่บริเวณลำไส้คิดเป็นร้อยละ 86.7 หลอดอาหารคิดเป็นร้อยละ 26 กระเพาะอาหารคิดเป็นร้อยละ 12 และทวารหนักคิดเป็นร้อยละ 11.3

ชนวัฒน์ ตันติวานุรักษ์ และชนัญญา เสมศรี (2548) ได้ทำการสำรวจกุ้งทราย (*Metapenaeosis* spp.) จากสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2546 ถึงเดือนตุลาคม 2546 จำนวน 255 ตัว พบค่าความชุกของ *Nematopsis* spp. คิดเป็นร้อยละ 82.4 เมื่อพิจารณาค่าความชุกของปรสิตโดยการแยกเพศของกุ้ง พบว่ามีการระบาดในกุ้งเพศผู้ คิดเป็นร้อยละ 87.50 และระบาดในกุ้งเพศเมีย คิดเป็นร้อยละ 82.86 และเมื่อศึกษาการระบาดโดยแบ่งเป็นส่วนภายในทางเดินอาหาร มีการระบาดมากที่สุดที่บริเวณลำไส้คิดเป็นร้อยละ 77.6 กระเพาะอาหารคิดเป็นร้อยละ 40.4 และทวารหนักคิดเป็นร้อยละ 22.7

Prasadan and Janardanan (2001) สำรวจปูน้ำกร่อย 3 ชนิด คือ ปูแสม (*Metapograpus messor*), ปูทะเล (*Sesarma quadratum*) และปูก้ามดาบ (*Uca annulipes*) ณ เมืองกีราลา ประเทศอินเดีย พบโปรโตซัวปรสิตกลุ่ม Cephaline Gregarine ชนิดใหม่ 3 ชนิด ซึ่งมีลักษณะรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นการค้นพบครั้งแรกในปูทั้ง 3 ชนิด โดยลักษณะของ gregarine ที่พบมีการเจริญอยู่ภายนอกเซลล์และมีการสร้าง Gymnospore จึงจัดอยู่ใน Family Porosporidae และ Family Porosporidae ประกอบด้วย Genus *Porospora* และ *Nematopsis* แต่เนื่องจากไม่เคยมีรายงานว่าพบ Genus *Porospora* ในปู จึงระบุให้ Gregarine ที่พบนั้นอยู่ใน Genus *Nematopsis* และระบุชนิดเป็น *N. messor*, *N. quadratum* และ *N. annulipes*

ลักษณะการก่อโรคในกุ้ง

Jimenez et al. (2002) ทำการสำรวจกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากฟาร์มกุ้งในประเทศ Ecuador ระหว่าง ค.ศ. 1991-1999 โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 2,000 ตัวอย่าง พบว่ามี *N. marinus* n.sp. ระบาดจำนวนมากคิดเป็นร้อยละ 50 ถึงร้อยละ 80 และมีจำนวนการระบาดของปรสิตตั้งแต่ 10 ตัว ถึงมากกว่า 5000 ตัว ต่อกุ้ง 1 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะภายนอกของ *N. marinus* ต่างจากชนิดอื่น ๆ คือ ในระยะ gamonts จะยึดติดกับผนังทางเดินอาหารส่วนกลาง และพบกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดภายใต้ชั้น epithelium นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการบวมพองของชั้น epithelium ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนที่แบบคลื่นไกลของ *N. marinus*

การรักษา

Fajer-Avila et al. (2005) ทำการศึกษาผลของยาปฏิชีวนะ Elancoban™ และ Avimix-ST™ ที่มีผลด้าน *Nematopsis* sp. ซึ่งระบาดในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงด้านฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิก ในประเทศเม็กซิโก พบว่า Elancoban™ ช่วยลดจำนวน *Nematopsis* sp. ที่ระบาดในกุ้งขาวได้ร้อยละ 92 ส่วน Avimix-ST™ ช่วยลดจำนวน *Nematopsis* sp. ที่ระบาดในกุ้งขาวได้ร้อยละ 85 กรมประมง (2546) ใช้กระเทียมสดบดละเอียดในอัตราส่วน 10 กรัม คลุกผสมอาหารกุ้งชนิดเม็ด 1 กิโลกรัม ให้กุ้งวัยอ่อนที่พบ gregarine กินวันละ 5 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน และทำการตรวจสอบโดยการเก็บตัวอย่างกุ้งจำนวน 20 ตัว ทุกสัปดาห์ทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วยกระเทียมสดบดละเอียด จากการตรวจสอบตัวอย่างทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า จำนวน gregarine ที่พบในตัวกุ้งลดลงภายใน 2 สัปดาห์ และตรวจไม่พบหลังจากทำการรักษาไปได้ 30 วัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง เปรียงเจาะไม้
- 1.2 เครื่องมือผ่าตัด
- 1.3 แผ่นสไลด์ และ กระจกปิดสไลด์ (Slide and Cover glass)
- 1.4 ภาชนะใส่เปรียงเจาะไม้
- 1.5 หลอดหยด
- 1.6 เข็มเย็บ
- 1.7 คีมคีบ
- 1.8 กระจกยทึบ
- 1.9 เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
- 1.10 pH meter
- 1.11 Thermometer
- 1.12 Hand Refractometer
- 1.13 เครื่องตัดตัวอย่าง (Ultra - microtome)
- 1.14 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (OLYMPUS รุ่น BX51 ประกอบด้วยชุดถ่ายภาพดิจิทัล DP50)
- 1.15 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (PHILLIP รุ่น TECNAI 20)

2. สารเคมี

- 2.1 น้ำกลั่น
- 2.2 70%, 80%, 90%, 95% และ Absolute Ethanol
- 2.3 Paraffin (Paraplast)
- 2.4 Egg Albumin
- 2.5 Xylene
- 2.6 Mounting Medium (Permount)
- 2.7 Hematoxylin

- 2.8 Eosin Y
- 2.9 Sodium iodate
- 2.10 Potassium alum
- 2.11 Acetic acid
- 2.12 Charcoal hydrate
- 2.13 Glacial acetic acid
- 2.14 25% Glutaraldehyde
- 2.15 NaH_2PO_4
- 2.16 Na_2HPO_4
- 2.17 NaCl
- 2.18 2% Osmium tetroxide
- 2.19 Methylene blue
- 2.20 Uranyl acetate
- 2.21 Lead nitrate
- 2.22 Araldite 502
- 2.23 Propylene oxide (PO)
- 2.24 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
- 2.25 70% Methanol
- 2.26 DDSA
- 2.27 DMP-30
- 2.28 Sodium citrate
- 2.29 NaOH

3. วิธีดำเนินการ

3.1 พื้นที่การทำวิจัย

เก็บตัวอย่างบริเวณป่าชายเลนในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี โดยการสังเกตรูเนื้อไม้ที่มี pellet โผล่พ้นออกมา จากนั้นใช้ขวานผ่าไม้แล้วดึงตัวเพรียงเจาะ ไม้ออกมาใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ซึ่งเป็นเพรียงเจาะไม้ตัวเต็มวัยที่มีขนาดความยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร เริ่มทำการสำรวจ และศึกษาตัวอย่างตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557 เป็นระยะเวลา 13 เดือน ทำการสำรวจทุกเดือน เดือนละ 15 ตัว (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แผนที่บริเวณป่าชายเลน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและสำรวจ โปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ในเพรียงเจาะไม้ ★ บริเวณที่ทำการสำรวจ

3.2 ดัชนีคุณภาพน้ำที่ทำการตรวจและวิธีการวิเคราะห์

เก็บตัวอย่างน้ำใส่ขวดพลาสติกชนิดฝาเกลียวทุกเดือน ๆ ละ 2 ครั้ง จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่พิกัด (12°26' 30.3" N, 102°13' 16.9" E), (12°26' 31.9" N, 102°13' 17.0" E) และ (12°26' 32.0" N, 102°13' 17.9" E) (ภาพที่ 25) ทุกวันที่ 1 และ 15 ของแต่ละเดือนที่ระดับ ความลึก 15 เซนติเมตรจากผิวน้ำ โดยเก็บตัวอย่างน้ำเวลา 9.00-11.00 น. สำหรับดัชนีคุณภาพน้ำ

ที่ทำการศึกษานี้ มีจำนวนทั้งสิ้น 3 ดัชนี (ตารางที่ 2) และใช้ One-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเดือนที่ทำการศึกษากับดัชนีคุณภาพน้ำโดยใช้โปรแกรม SPSS

ตารางที่ 2 ดัชนีคุณภาพน้ำและวิธีการหรือเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ดัชนีคุณภาพน้ำ	วิธีการหรือเครื่องมือวิเคราะห์
อุณหภูมิ	ตรวจวัดภาคสนาม โดยใช้ Thermometer
ความเค็มของน้ำ	ตรวจวัดภาคสนาม โดยใช้ hand refractometer
ความเป็นกรด-เบส	ตรวจวัดในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ pH meter

3.3 การศึกษาค่าความชุก (Prevalence) และความหนาแน่น (Intensity) ของ *Nematopsis*

ทำการผ่าเพรียงเจาะไม้โดยตัดตามความยาวของลำตัว แล้วดึงเอาส่วนของเหงือกออกมาตัดเหงือกให้มีขนาดเล็กลงบนสไลด์ ทำการส่องสำรวจบริเวณเหงือกส่วนต้น ส่วนกลางและส่วนท้าย แล้วใช้หลอดหยดน้ำประมาณ 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover Glass) ที่เตรียมไว้ใช้แรงกดทับเล็กน้อย จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายต่ำ (4X) เพื่อสำรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* เมื่อพบให้ใช้กำลังขยายที่สูงขึ้น (10X หรือ 40X) บันทึกค่าร้อยละความชุก และหาค่าความหนาแน่น โดยนับจำนวน Oocyst บันทึกผลจำนวน Oocyst ในแต่ละครั้ง พร้อมทั้งบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (OLYMPUS รุ่น BX51 ที่ประกอบด้วยชุดถ่ายภาพดิจิทัล DP50)

การหาค่าร้อยละความชุก (Prevalence of infection) ของ *Nematopsis*

$$\text{ร้อยละความชุก (\%)} = \frac{\text{จำนวนเพรียงที่ถูก Infected (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนเพรียงทั้งหมด (ตัว)}}$$

การหาค่าความหนาแน่น (Intensity of infection) ของ *Nematopsis*

$$\text{ความหนาแน่นเฉลี่ย/มิลลิเมตร} = \frac{\text{จำนวน } Nematopsis \text{ ทั้งหมดที่นับได้จากพื้นที่เหงือก 1 มิลลิเมตร}}{\text{จำนวนเพรียงเจาะไม้ที่พบ } Nematopsis \text{ (ตัว)}}$$

3.4 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาด *Nematopsis*

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง *Nematopsis* sp. ระยะ Oocyst จากเหงือกของเพรียงเจาะไม้ มาทำการรักษา สภาพเนื้อเยื่อ (Fixation) 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.8 (PBS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วดึงน้ำออก จากตัวอย่าง (Dehydration) สาร Dehydrating agent ที่ใช้ คือ Ethyl Alcohol โดยเพิ่มความเข้มข้นจาก 70%, 80%, 90% (1 ครั้ง), 95% (2 ครั้ง) และ 100% (3 ครั้ง) ครั้งละ 1 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการแทนที่ Dehydrating agent ก่อน (Clearing) โดยสาร Clearing agent ที่ใช้ คือ Xylene ที่อุณหภูมิห้อง และสารผสมระหว่าง Xylene กับ Paraffin ในอัตราส่วน 2:1 และ 1:1 ครั้งละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C จึงนำไปแช่ลงใน Pure Paraffin 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C นำตัวอย่างที่ได้ไปฝัง (Embedding) ลงใน Pure Paraffin ซึ่งขั้นตอนนี้จะทำให้ Paraffin ที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปอยู่ภายในตัวอย่าง และแข็งขึ้นที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อ Paraffin แข็งตัวจะทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งมากพอที่จะนำไปตัดให้เป็นแผ่นบาง ๆ อีกทั้งเป็นการรักษา รูปทรงของเนื้อเยื่อไม่ให้ผิดไปจากเดิม จากนั้นนำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่อง Rotary Microtome หนาประมาณ 5-10 µm. นำแผ่นตัวอย่างที่ตัดได้วางบนแผ่นสไลด์ ยึดตัวอย่างให้ติดแผ่นสไลด์ โดย gelatin ลอย Section ลงบนสารละลาย อุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว นำแผ่นตัวอย่างไปผ่านขบวนการย้อมสี Harris's Hematoxylin และ Eosin ดังนี้

ล้าง paraffin ที่เคลือบ section ออกจากสไลด์ด้วย Xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้น Rehydration ตัวอย่าง โดยลดความเข้มข้นของ Ethyl Alcohol จากสูงไปต่ำ 100% (2 ครั้ง), 95%, 90%, 70% และในน้ำกลั่น ครั้งละ 3 นาที ย้อมสีตัวอย่างด้วย Harris's Hematoxylin 5 นาที ล้างในน้ำประมาณ 15 นาที จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ถ้าตัวอย่างติดสี เข้มเกินนำไปแช่ใน 1% Acid Alcohol แต่ถ้าสีจางเกินไปให้ย้อมสีต่อจนกว่าตัวอย่างจะมีสีเข้ม ทำการ Counterstain เพื่อให้เห็นโครงสร้างชัดเจนด้วย Eosin 1 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วย 95% Ethyl Alcohol 1-2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน 100% Ethyl Alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ส่องดูด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เมื่อได้สีตามต้องการแล้วแช่ด้วย Xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที นำ สไลด์ ที่ได้ไปทำสไลด์ถาวร (Howard & Smith, 2004) แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสง (OLYMPUS รุ่น BX51 ที่ประกอบด้วยชุดถ่ายภาพดิจิทัล DP50)

3.5 การศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)

นำตัวอย่างเหงือกเพรียงเจาะไม้ที่ทำการสุ่มสำรวจแล้วพบการระบาดของ *Nematopsis* มาทำการรักษาสภาพด้วย 2.5% Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate Buffer Saline pH 7.8 (PBS) ที่อุณหภูมิ 4°C ตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 1×1 มิลลิเมตร คงสภาพด้วย 1% Osmium Tetroxide ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้าง ด้วย PBS 3 ครั้ง เข้าเครื่องเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการดึงน้ำออก (Dehydration) จากตัวอย่าง โดยเพิ่มความเข้มข้น Ethyl Alcohol จาก 70%, 80%, 90%, 95% (2 ครั้ง) และ 100% (3 ครั้ง) ตามลำดับ เวลาในการแช่ตัวอย่างจะแช่ครั้งละ 24 ชั่วโมง ทำการ Clearing โดยนำตัวอย่างแช่ใน Propylene Oxide (PO) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ครั้งละ 12 ชั่วโมง และ Infiltration ด้วย PO:Araldiye 502 Resin ที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วน 2:1 และ 1:2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นฝังตัวอย่างลงใน Pure Araldiye 502 Resin ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนำไป Polymerized ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วจึงนำ Block Plastic มาตัดให้มีความหนา 500-1000 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Ultramicrotome (Leica Ultracut R) นำส่วน Semithin มาย้อมสี 1% Methelene bule เพื่อดูลักษณะบริเวณที่พบ *Nematopsis* จากนั้นตัดแต่งอย่างละเอียด (Fine Trimming) และตัดให้มีความหนา 60-90 นาโนเมตร นำส่วน Ultrathin Section ที่ตัดมาติดบน copper grid ขนาด 200 mesh ฝังให้แห้ง ทำการย้อมด้วยสี saturated uranyl acetate ใน 70% ethyl alcohol เป็นเวลา 15 นาที การย้อมสีนั้นต้องทำในห้องมืดเพื่อไม่ให้เกิดการตกตะกอน แล้วล้างสีด้วยน้ำกลั่นและทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วยสี 0.1% lead citrate เป็นเวลา 15 นาที ควรวาง sodium bicarbonate รอบถาดย้อมเพื่อให้เกิดการจับ CO₂ ป้องกันการตกตะกอน ล้างสีด้วยน้ำกลั่น ต้มสุกทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาและถ่ายภาพลักษณะภายในของ oocyst ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (PHILLIP รุ่น TECNAI 20)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

- 4.1 วิเคราะห์ข้อมูลจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำการบันทึกค่าร้อยละความชุก และหาค่าความหนาแน่น โดยนับจำนวน oocyst บันทึกผลจำนวน oocyst ในแต่ละเดือน
- 4.2 วิเคราะห์ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้และลักษณะของ *Nematopsis* ในระยะ oocyst ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- 4.3 วิเคราะห์สัณฐานวิทยาของปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
 - โดยดูสภาพเนื้อเยื่อ รูปร่าง ลักษณะและโครงสร้างของ oocyst
 - วัดขนาดความกว้างและความยาวของ oocyst
 - วัดขนาดความหนาของผนัง oocyst
 - วัดขนาดความกว้างและความหนาของ operculum
- 4.4 วิเคราะห์ค่าสถิติ
 - วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกกับดัชนีคุณภาพน้ำ
 - วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นกับดัชนีคุณภาพน้ำ
 - วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกกับความหนาแน่น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ศึกษาค่าความชุกและความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp.

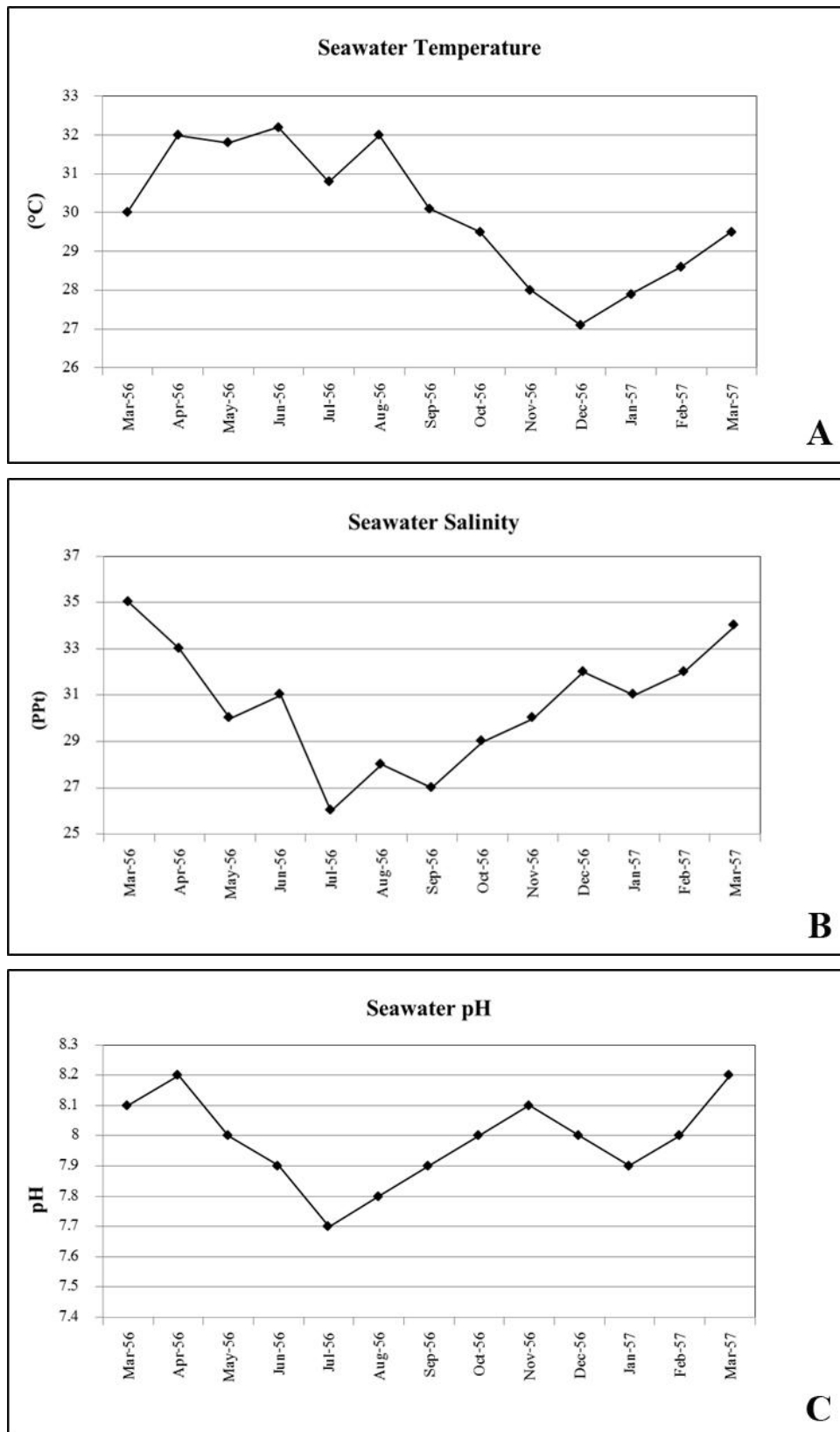
ผลการสำรวจ *Nematopsis* sp. เหงือกของเพรียงเจาะไม้ (*Bactronophorus thoracites*) โดยรอบบริเวณป่าชายเลน อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี จำนวน 195 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 ได้ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด พบว่ามีความชุก oocyst ของ *Nematopsis* sp. ตลอดทั้งปี จำนวน 153 ตัวอย่าง โดยเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 78.5 มีค่าความชุกสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 100 โดยมีค่าสูงสุดเดือนมิถุนายน ในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ 2557 พบว่ามีค่าความชุกน้อยสุดคิดเป็นร้อยละ 60 จากนั้นทำการนับจำนวน oocyst ของ *Nematopsis* sp. เพื่อหาความหนาแน่น พบว่า มีจำนวน 1-557 oocyst ค่าความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุด 37.1 ต่อพื้นที่เหงือกเพรียงเจาะไม้ 1 มิลลิเมตร ในเดือนมิถุนายน รองลงมาคือ เดือนพฤษภาคม พบค่าความหนาแน่นน้อยสุด 5 oocyst ต่อพื้นที่เหงือกเพรียงเจาะไม้ 1 มิลลิเมตร ในเดือนมกราคม ซึ่งเห็นได้ว่า ค่าความชุกและความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. มีแนวโน้มพบมากช่วงเดือนเมษายนถึงตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อน-ฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ เมื่อเข้าสู่ต้นฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ-ต้นฤดูร้อน ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมีนาคม จึงมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 3)

2. ศึกษาดัชนีคุณภาพน้ำบริเวณพื้นที่ทำการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลทุกเดือน นำมาวัดอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล พบว่าอุณหภูมิของน้ำจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลและช่วงของเวลา มีค่าในช่วง 27.1-32.2°C (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $29.9 \pm 1.73^{\circ}\text{C}$) และค่าความเค็มอยู่ระหว่าง 26-35 ppt (ค่าความเค็มเฉลี่ยเท่ากับ 30.62 ± 2.66 ppt) และพบว่าค่าความเป็นกรด-เบสในแต่ละเดือนมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 7.7-8.2 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.98 ± 0.15) (ภาพที่ 26) เมื่อนำ ค่าของอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล ในแต่ละเดือนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กัน พบว่าอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเล มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่อุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล ไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงความหนาแน่นและร้อยละค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. บริเวณเหงือกของ
เพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) ในรอบปี

เดือน/ปี	ค่าความชุกและความหนาแน่นของ <i>Nematopsis</i> sp.			
	จำนวนเพรียง (ตัว)	พบ <i>Nematopsis</i> sp. (ตัว)	ความชุก (%)	ความหนาแน่น เฉลี่ย/mm.
มี.ค./56	15	11	73.3	7.5
เม.ย./56	15	12	80.0	8.7
พ.ค./56	15	14	93.3	20.9
มิ.ย./56	15	15	100	37.1
ก.ค./56	15	13	86.7	27.9
ส.ค./56	15	14	93.3	16.1
ก.ย./56	15	13	86.7	16.7
ต.ค./56	15	12	80.0	14.4
พ.ย./56	15	10	66.7	18.0
ธ.ค./56	15	11	73.3	14.5
ม.ค./57	15	9	60.0	5.0
ก.พ./57	15	9	60.0	6.3
มี.ค./57	15	10	66.7	6.5
รวม	195	153	78.5	



ภาพที่ 26 กราฟอุณหภูมิ(A), ความเค็ม (B), และความเป็นกรด-ด่าง (C) ของน้ำทะเลในแต่ละเดือน

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล
โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม spss

		Temperature	Salinity	pH
Temperature	Pearson Correlation	1	.601*	-.071
	Sig. (2-tailed)		.030	.818
	N	13	13	13
Salinity	Pearson Correlation	.601*	1	.132
	Sig. (2-tailed)	.030		.667
	N	13	13	13
pH	Pearson Correlation	-.071	.132	1
	Sig. (2-tailed)	.818	.667	
	N	13	13	13

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชุกและความหนาแน่นของ *Nematopsis* กับดัชนีคุณภาพน้ำ

เมื่อนำค่าความชุก ค่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. มาเปรียบเทียบกับและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุก ความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. กับอุณหภูมิ ความเค็มและความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล (ตารางที่ 5-6) โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน พบว่าค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิโดยมีความสัมพันธ์กันเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากค่า Pearson Correlation เป็น บวก (ตารางที่ 6) นั่นคือ อุณหภูมิของน้ำทะเลจะแปรผันตรงกับค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. โดยพบว่าความชุกของ *Nematopsis* sp. มากในน้ำช่วงอุณหภูมิ 30.8-32.2 °C และเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 30.8 °C ค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. ลดลง ไม่พบความสัมพันธ์ความชุกกับความเค็มและกรด-เบสของน้ำทะเลที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 27)

เมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ทางสถิติ พบว่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเล ซึ่งมีความสัมพันธ์กันเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 เนื่องจากค่า Pearson Correlation เป็นบวก แต่ไม่สัมพันธ์กับกรด-เบสของน้ำทะเล (ตารางที่ 7A) นั่นคือ อุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลแปรผันตรงกับความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. โดยพบว่าช่วงอุณหภูมิ 30.1-32.2°C ความหนาแน่นมีค่าสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 30.1°C ความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ลดลง และค่าความเค็มช่วง 28-31 ppt ความหนาแน่นมีค่าสูงขึ้น เมื่อค่าความเค็มต่ำกว่า 28 ppt และสูงกว่า 31 ppt พบว่าความหนาแน่นมีค่าลดลง (ภาพที่ 28) และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. กับความชุกของ *Nematopsis* sp. พบว่า ค่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. มีความสัมพันธ์กับค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. สัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 เนื่องจากค่า Pearson Correlation เป็นบวก นั่นคือช่วงที่ค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. มาก ค่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ก็มากด้วย (ภาพที่ 29, ตารางที่ 7B)

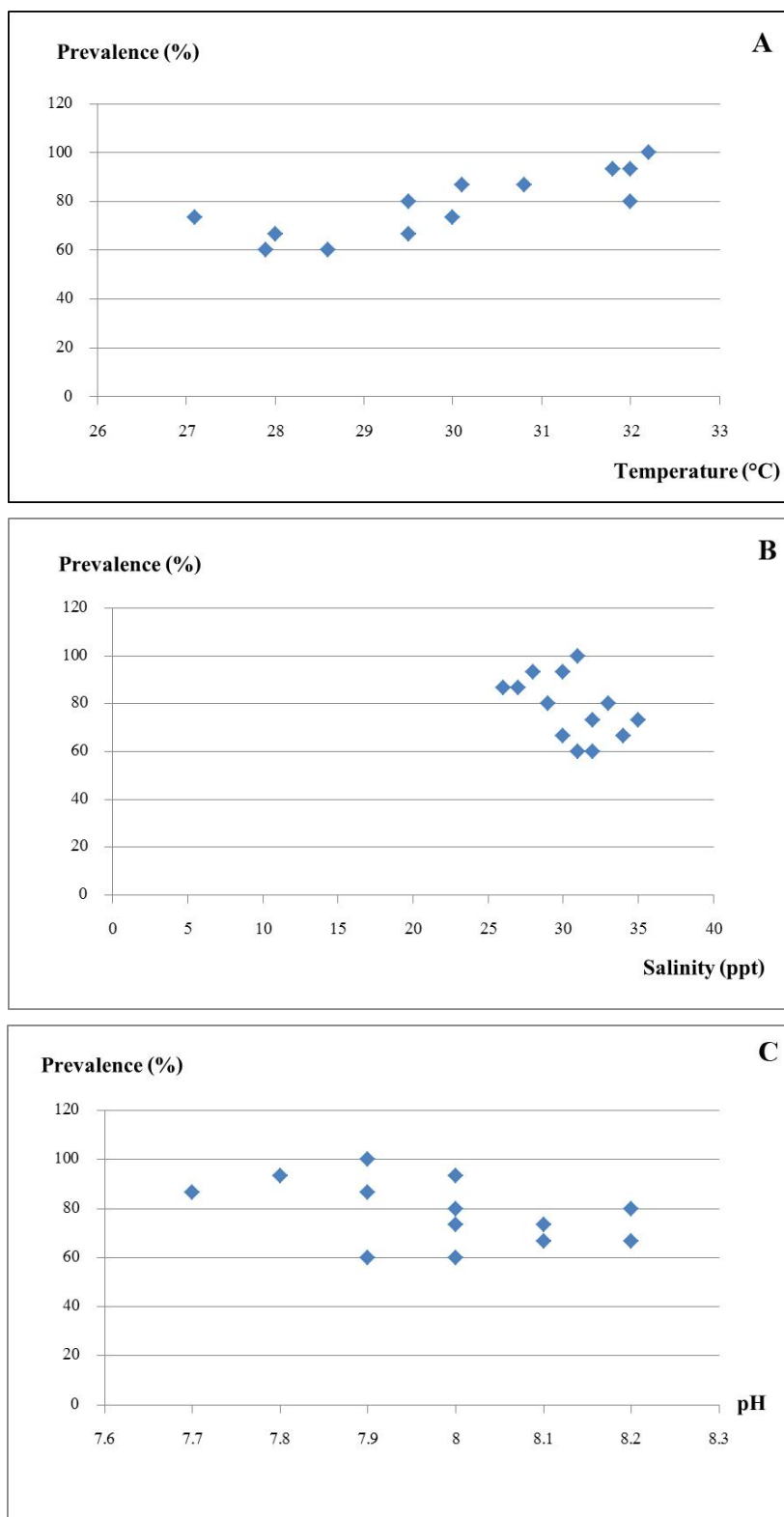
ตารางที่ 5 แสดงค่าความหนาแน่น ความชุกของ *Nematopsis* sp. ในเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) และค่าอุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเลในรอบปี

เดือน/ปี	ความชุก (%)	ความหนาแน่น เฉลี่ย/mm.	อุณหภูมิ (°C)	ความเค็ม (ppt)	pH
มี.ค./56	73.3	7.5	30.0	35	8.1
เม.ย./56	80.0	8.7	32.0	33	8.2
พ.ค./56	93.3	20.9	31.8	30	8.0
มิ.ย./56	100	37.1	32.2	31	7.9
ก.ค./56	86.7	27.9	30.8	26	7.7
ส.ค./56	93.3	16.1	32.0	28	7.8
ก.ย./56	86.7	16.7	30.1	27	7.9
ต.ค./56	80.0	14.4	29.5	29	8.0
พ.ย./56	66.7	18.0	28.0	30	8.1
ธ.ค./56	73.3	14.5	27.1	32	8.0
ม.ค./57	60.0	5.0	27.9	31	7.9
ก.พ./57	60.0	6.3	28.6	32	8.0
มี.ค./57	66.7	6.5	29.5	34	8.2

ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. กับอุณหภูมิ ความเค็มและค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม spss ด้วยวิธีการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน

		Prevalence	Temperature	Salinity	pH
Prevalence	Pearson Correlation	1	.682*	.292	-.033
	Sig. (2-tailed)		.010	.334	.914
	N	13	13	13	13
Temperature	Pearson Correlation	.682*	1	.601*	-.071
	Sig. (2-tailed)	.010		.030	.818
	N	13	13	13	13
Salinity	Pearson Correlation	.292	.601*	1	.132
	Sig. (2-tailed)	.334	.030		.667
	N	13	13	13	13
pH	Pearson Correlation	-.033	-.071	.132	1
	Sig. (2-tailed)	.914	.818	.667	
	N	13	13	13	13

หมายเหตุ * แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความชุกของ *Nematopsis* sp. กับอุณหภูมิ (A) ความเค็ม (B) และความเป็นกรด-เบส (C) ของน้ำทะเล

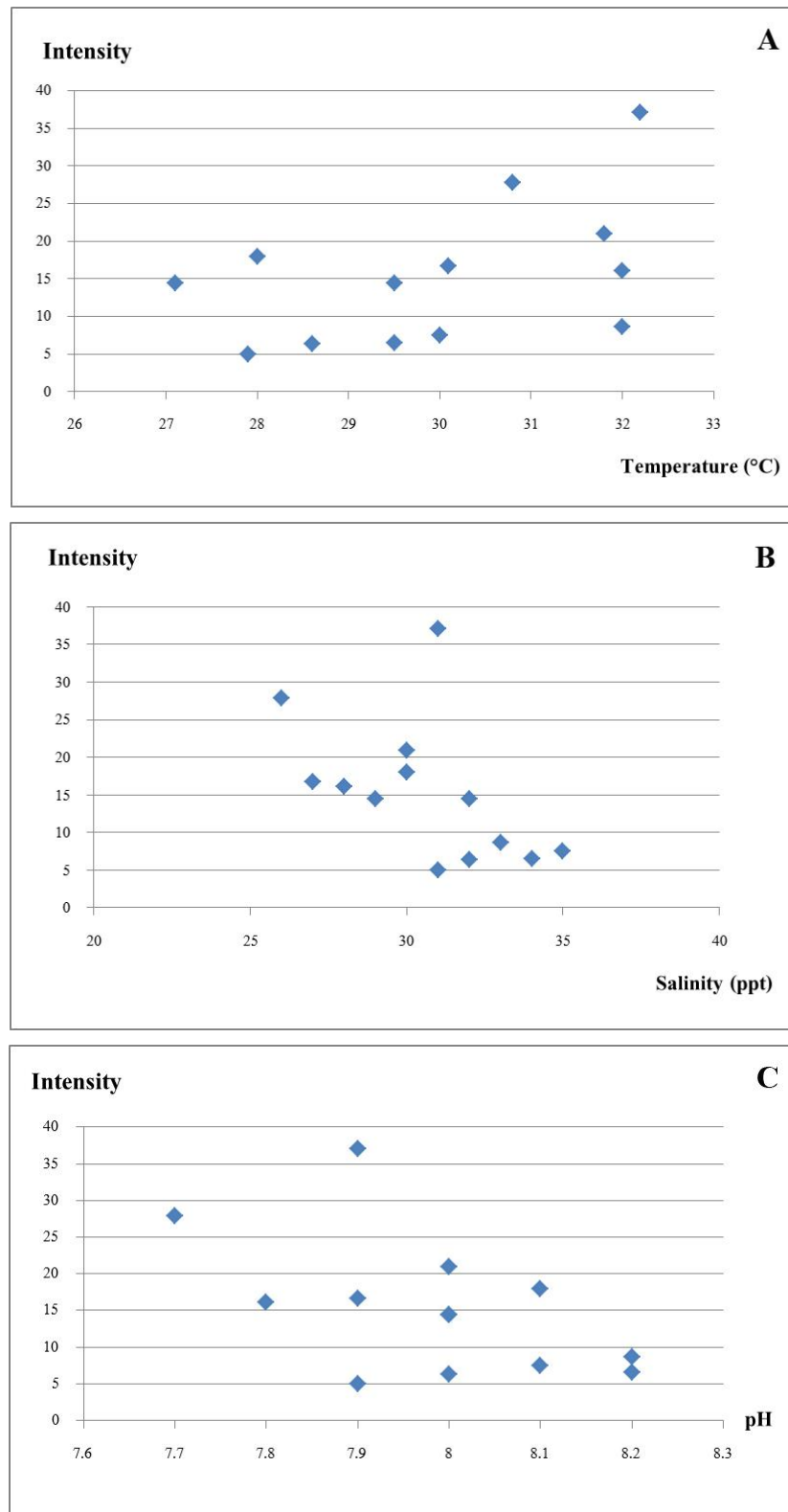
ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. กับอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเล โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม spss ด้วยวิธีการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน

A		Intensity	Temperature	Salinity	pH
Intensity	Pearson Correlation	1	.901 **	.789 **	.015
	Sig. (2-tailed)		.000	.001	.962
	N	13	13	13	13
Temperature	Pearson Correlation	.901 **	1	.601 *	-.071
	Sig. (2-tailed)	.000		.030	.818
	N	13	13	13	13
Salinity	Pearson Correlation	.789 **	.601 *	1	.132
	Sig. (2-tailed)	.001	.030		.667
	N	13	13	13	13
pH	Pearson Correlation	.015	-.071	.132	1
	Sig. (2-tailed)	.962	.818	.667	
	N	13	13	13	13

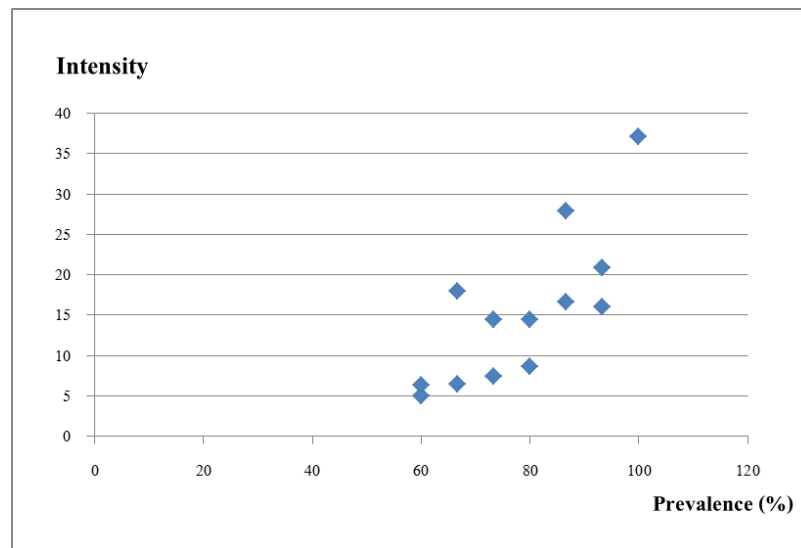
หมายเหตุ ** แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

B		Prevalence	Intensity
Prevalence	Pearson Correlation	1	.714 **
	Sig. (2-tailed)		.006
	N	13	13
Intensity	Pearson Correlation	.714 **	1
	Sig. (2-tailed)	.006	
	N	13	13

หมายเหตุ ** แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01



ภาพที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. กับอุณหภูมิ (A) ความเค็ม (B) ความเป็นกรด-เบส (C) ของน้ำทะเล

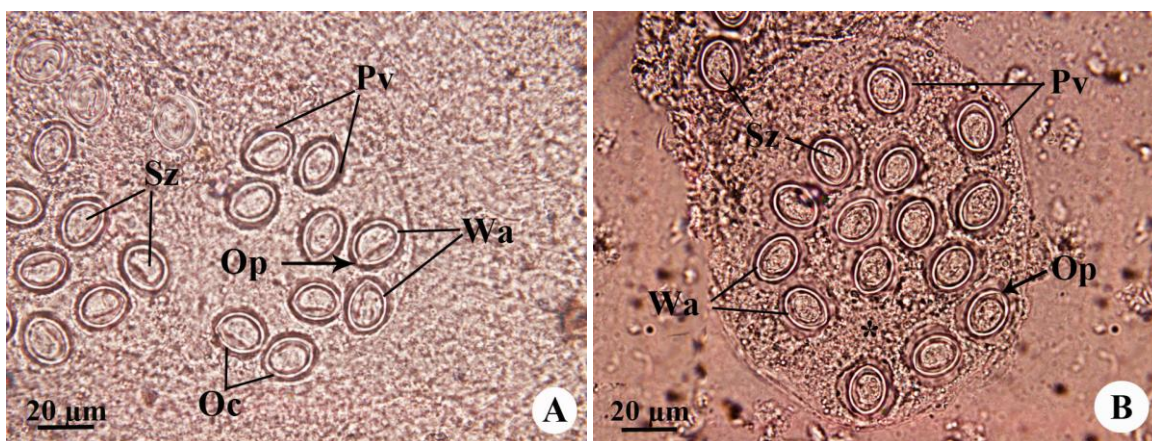


ภาพที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นกับความชุกของ *Nematopsis* sp.

4. ศึกษาต้นฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp.

ลักษณะของ oocyst ในส่วนของเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*)

การสำรวจ oocyst ของ *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) พบว่า oocyst มีลักษณะกลม รี เปลือกแข็งและหนา อยู่แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ขนาดความกว้าง 12.7-14.4 μm (เฉลี่ย $13.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$; n=15) ขนาดความยาว 16.9-18.9 μm (เฉลี่ย $17.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$; n=15) ซึ่งแต่ละ oocyst นั้นมี parasitophorous vacuole (PV) ขนาด 20.3-25.0 μm (เฉลี่ย $22.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$; n=15) ล้อมรอบ อยู่ภายในถุง phagocyte โดยแต่ละ phagocyte จะมี oocysts จำนวน 1-20 ซึ่งขนาดของ phagocyte นั้นขึ้นอยู่กับจำนวน oocysts ภายใน และพบ single vermiform sporozoite มีลักษณะเป็นทรงกระบอกคล้ายหนอนอยู่ภายใน oocyst (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 แสดงลักษณะ oocyst ของ *Nematopsis* sp. ในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*)

กำลังขยายสูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

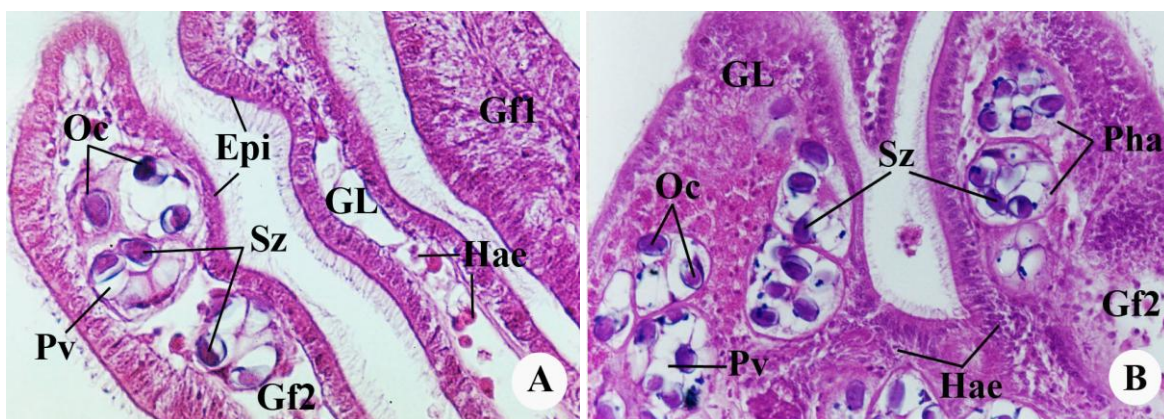
A-B ภายในถุง phagocyte (*) พบ oocyst (Oc) มีลักษณะกลม รี ผนัง oocyst (Wa)

แข็งและหนา ภายในบรรจุตัวอ่อนระยะ sporozoite (Sz) โดยแต่ละ oocyst นั้นมี

parasitophorous vacuole (PV) ห่อหุ้มอยู่ และพบ operculum (Op)

การศึกษาพยาธิสภาพเหงือกของเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาดของ *Nematopsis* sp.

การศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาด มาทำการรักษาสภาพตามกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา แล้วนำไปย้อมสี hematoxylin & eosin พบว่า oocyst ของ *Nematopsis* sp. จะฝังตัวอยู่ในช่องเหงือกในส่วนของ ซี่เหงือก ซึ่งพบได้ตลอดแนวความยาวของซี่เหงือกและมีการระบาดอย่างหนาแน่นบริเวณปลายซี่เหงือก เมื่อทำการศึกษาบริเวณเนื้อเยื่อ epithelial cell และ connective tissue ที่มีการระบาด oocyst ของ *Nematopsis* sp. พบว่าการระบาดในปริมาณน้อยไม่ส่งผลต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์ เซลล์จึงเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ ขอบเซลล์ไม่ขาด มีขอบเขตเนื้อเยื่อชัดเจน เซลล์จึงมีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกสูงเรียงตัวติดกันแน่น (columnar epithelial cell) ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการระบาดสูง พบว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อจะขาดยุบเกิดเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ขึ้นโดยจะเกิดรอบ ๆ ทำให้เซลล์เสียรูปทรงการจัดเรียงตัวของเซลล์จึงไม่เป็นระเบียบ เซลล์ชั้นลงมีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยมแบนบาง (squamous epithelial cell) สังเกตได้จากนิวเคลียสมีขนาดเล็กติดสีเข้ม ผนัง oocyst ติดสีน้ำเงินเข้ม ภายในบรรจุตัวอ่อนระยะ sporozoite (Sz) ติดสีม่วงเข้ม ซึ่งเป็นสีของ haematoxylin ในส่วนของ cytoplasm จะย้อมติดสีชมพู ซึ่งเป็นสีของ eosin และมีเม็ดไขมันแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อซึ่งจะเห็นเป็นช่องว่างใส เกิดการสร้าง haemocytes จำนวนมาก (haemocyte aggregation) บริเวณ epithelial cell ที่ถูกทำลาย พบการตายของเซลล์ (necrosis) และมีการรวมกลุ่มของ haemocytes ขึ้นหลายชั้นล้อมรอบเนื้อเยื่อเซลล์ที่มีการระบาดของ oocyst เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการระบาดไปยัง epithelial cell บริเวณอื่น ๆ จึงทำให้เกิดกระบวนการ nodule formation เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ไม่มีการระบาดของ oocyst ของ *Nematopsis* sp. (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 แสดงลักษณะ oocyst ของ *Nematopsis* sp. กำลังขยายสูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) ซึ่งผ่านการเตรียมเนื้อเยื่อด้วย paraffin section technique และย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin

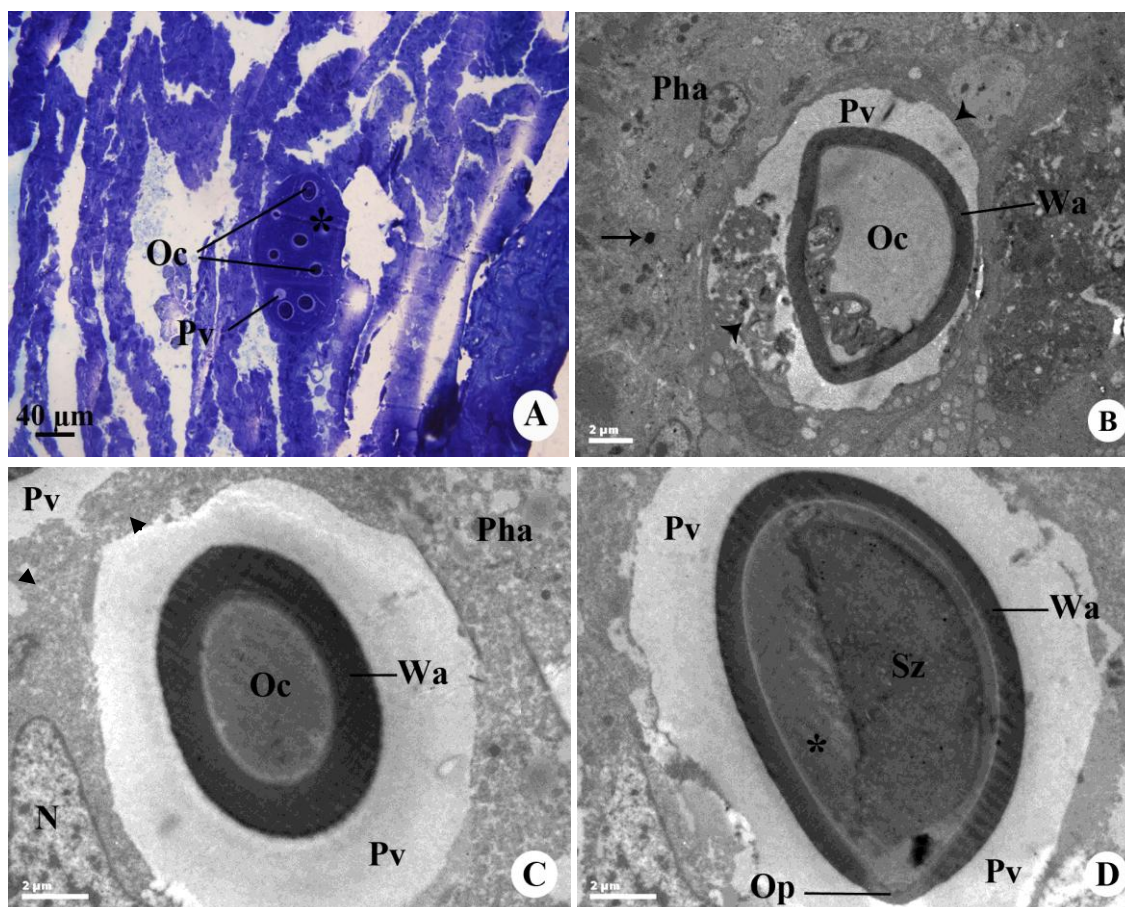
- A. บริเวณเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ที่ไม่มีการระบาดของ *Nematopsis* sp. (Gf1) การเซลล์จัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ เซลล์มีลักษณะเป็น columnar epithelial cell และเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่มีการระบาดของ *Nematopsis* sp. (Gf2) เซลล์มีการจัดเรียงตัวแบบ squamous epithelial cell เนื้อเยื่อขาดเกิดเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีขนาดเล็ก มี haemocytes (Hae) จำนวนมาก
- B. บริเวณเนื้อเยื่อเหงือกที่มีการระบาดของ *Nematopsis* sp. (Gf2) แสดงลักษณะ cytoplasm ของ phagocyte (Pha) ย้อมติดสีชมพู ที่แทรกอยู่ใน epithelial cell (Epi) ภายในพบ oocysts (Oc) ซึ่งแต่ละ oocyst ภายในบรรจุตัวอ่อน sporozoite (Sz) ติดสีม่วงเข้ม และถูกหุ้มด้วย parasitophorous vacuole (PV)

ศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

ศึกษาโครงสร้างละเอียด oocyst ของ *Nematopsis* sp. โดยการตัด semithin section และย้อมสีด้วย 1% methylene blue แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า บริเวณ phagocyte ที่มีการระบาดของ oocyst ติดสีเข้มของ methylene blue และในส่วนของ parasitophorous vacuole ที่ล้อมรอบ oocyst นั้นติดสีจางกว่าและทำการการตัด ultrathin section ย้อมสีด้วย uranyl acetate และ lead citrate จากนั้นนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (ภาพที่ 32-34) พบว่าแต่ละ oocyst จะมีลักษณะคล้ายถุงหุ้มอยู่ เรียกว่า parasitophorous vacuole (PV) ซึ่งเป็น vacuole ที่พบในเซลล์โฮสต์ปรสิต (host cell) เกิดขึ้นโดยของเหลว PV matrix ยึดติดกับ cytoplasm ของ phagocyte เมื่อ PV มีจำนวนหลายถุงก็จะถูกหุ้มด้วย phagocyte หรือ phagocystic sac เป็นส่วนที่เนื้อเยื่อสร้างขึ้นมาเพื่อห่อหุ้มปรสิตไว้ (ภาพที่ 32B) ภายในช่องว่าง (lumen) ของ oocyst ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแบบโปร่งแสง (electron lucent material) มีตัวอ่อนของปรสิตระยะ single uninucleated sporozoite ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกคล้ายหนอน (vermiform) อาศัยอยู่ (ภาพที่ 32D) องค์ประกอบภายใน oocyst พบ nucleolus ขนาด $1.9 \mu\text{m}$, nucleus ขนาด $2.3 \mu\text{m}$, มีการสะสมไขมันใน cytoplasm, granule และ vacuole ขนาดเล็กจำนวนมาก ผนังของ oocyst มีขนาด $0.97 (0.67-1.51) \mu\text{m}$ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแบบทึบแสง (electron lucent material) มีขนาดความหนาไม่สม่ำเสมอทั้งหมดทั้งเปลือก (ภาพที่ 33)

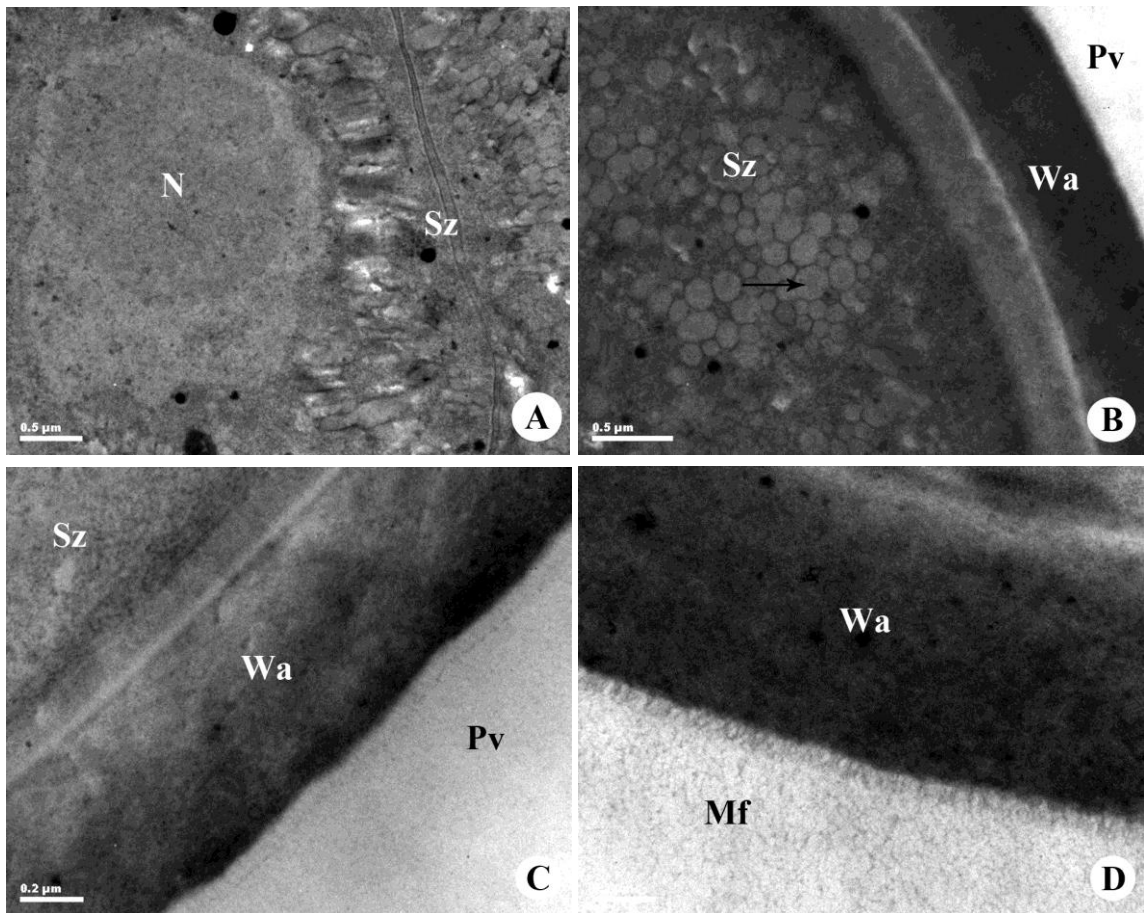
เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างตามยาว (longitudinal section) พบว่าบริเวณด้านปลายของผนัง oocyst พบ operculum ปกคลุมอยู่ ซึ่งบริเวณผิวของ operculum นั้นมีความหนา $0.34-0.54 \mu\text{m}$ ประกอบด้วย circular micropyle ลักษณะเป็นรูปกรวยเชื่อมต่อกับด้านใน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ $0.98 \mu\text{m}$ ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของ sporozoite บริเวณรูเปิด operculum นั้นจะเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้ม PV membrane โดย dense cord บริเวณผิวด้านนอกของผนัง oocyst โดยรอบพบเส้นใย microfibrils ขนาดเล็กประมาณ $0.05-0.08 \mu\text{m}$ มีลักษณะจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ พบเส้นใย adherent microfibrils ยึดเกาะกับ microfibrils ที่ผนัง oocyst อีกทั้งยังกระจายตัวอยู่บริเวณเยื่อหุ้ม parasitophorous vacuole (PV membrane) และไปยึดเกาะกับ protein particle ที่อยู่ใน cytoplasm ของ Phagocyte (ภาพที่ 34)

ในระหว่างการสลายตัว (lysis stage) ของเซลล์โฮสต์ปรสิต (host cell) พบว่า PV membranes จะเกิดการสลายตัว และ cytoplasmic matrix จะเข้าไปแทนที่ ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับ PV matrix ได้โดยตรง ทำให้บริเวณผิวด้านนอกของผนัง oocyst โดยรอบนั้น ไม่พบเส้นใย microfibrils และ adherent microfibrils (ภาพที่ 32B และภาพที่ 34)



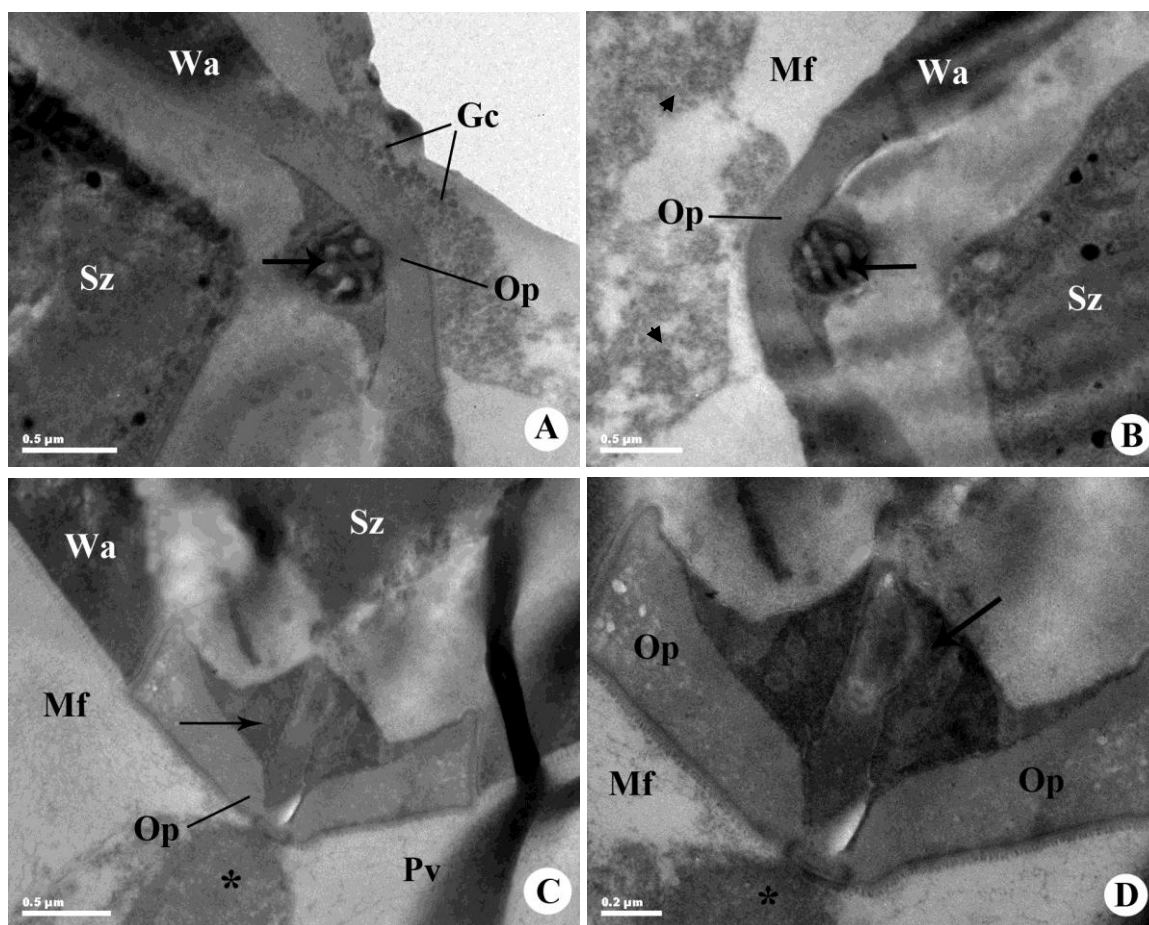
ภาพที่ 32 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา oocyst ของ *Nematopsis* sp. ในเนื้อเยื่อเหียงอกเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)

- A. ภาพ semi-thin section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงบริเวณ phagocyte (*) ประกอบด้วย แต่ละ parasitophorous vacuole (Pv) ห่อหุ้ม oocyst (Oc)
- B-C. ภาพตัดตามขวาง ultrathin section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน บริเวณ โดยรอบ oocyst wall (Wa) แสดงลักษณะ adherent microfibrils และ dense network ของ microfibrils (หัวลูกศร) กระจายตัวอยู่บริเวณ parasitophorous vacuole (PV) และ ไปยึดเกาะกับ protein particle ที่อยู่ใน cytoplasm ของ Phagocyte อีกทั้งยังพบ nucleus (N) แทรกอยู่ใน cytoplasm ของ phagocyte (Pha)
- D. ภาพตัดตามยาว ultrathin section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ของ oocyst (Oc) แสดงลักษณะ operculum (Op), oocyst wall (Wa), sporozoite (Sz) อาศัยอยู่ในช่องว่าง (*) ของ oocyst ซึ่งเป็นบริเวณ electron lucent material



ภาพที่ 33 ภาพตัดตามขวาง ultrathin section แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา oocyst ของ *Nematopsis* ในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)

- A-B. แสดงองค์ประกอบภายใน oocyst พบปรสิตระยะ unucleated sporozoite (Sz), nucleus (N), nucleolus ขนาดใหญ่, มีการสะสมไขมันใน cytoplasm (ลูกศร) และ granule ขนาดเล็กจำนวนมาก (จุดสีดำ)
- C. ผนัง oocyst (Wa) มีขนาด $0.97 \mu\text{m}$ ซึ่งเป็นบริเวณ electron lucent material
- D. บริเวณผิวหนังด้านนอกของ oocyst wall (Wa) โดยรอบพบเส้นใย microfibrils มีลักษณะเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบและพบ adherent microfibrils กระจายตัวอยู่บริเวณเชื่อมต่อ parasitophorous vacuole (PV)



ภาพที่ 34 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา oocyst ของ *Nematopsis* sp. ในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)

- A-D. บริเวณด้านปลายของ oocyst มี operculum (Op) ปกคลุมอยู่ ประกอบด้วย circular micropyle (ลูกศร) มีลักษณะเป็นรูปกรวย ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของ sporozoite (Sz)
- A. glycogen particle ภายใน cytoplasm ของเซลล์ phagocyte ซึ่งบางครั้งเซลล์บริเวณนี้อาจเชื่อมต่อกับ PV microfibrils โดยตรง
- B. ในระยะการสลายตัว (lysis stage) parasitophorous vacuole (Pv membranes) จะสลายตัวและ cytoplasmic matrix (หัวลูกศร) จะเข้าไปแทนที่และเชื่อมต่อกับ PV matrix โดยตรง ทำให้บริเวณผิวด้านนอกของ oocyst wall โดยรอบไม่พบเส้นใย microfibrils และ adherent microfibrils
- C-D. operculum (Op) เชื่อมต่อกับ dense cord และ บริเวณเยื่อหุ้ม parasitophorous vacuole (PV membrane)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาความชุกของ *Nematopsis* sp. ในเพรียงเจาะไม้ *Bactronophorus thoracites*

ผลการสำรวจ *Nematopsis* sp. ในเพรียงเจาะไม้จากป่าชายเลน อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี จำนวน 195 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 พบว่ามีความชุก oocyst ของ *Nematopsis* ตลอดทั้งปี จำนวน 153 ตัวอย่าง โดยเฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 78.5 พบมากในเดือนมิถุนายน คิดเป็นร้อยละ 100 และค่าความชุกน้อยสุดในเดือนมกราคมและเดือนกุมภาพันธ์ 2557 ร้อยละ 60 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Azevedo and Cachola (1992) ที่ศึกษาในหอยแครง (*cerastoderme edule*), Tuntiwaranuruk et al. (2004) ศึกษาในหอยกะพง (*Arcuatula arcuatula*), Sabry, Gesteira, and Boehs (2007) ศึกษาในหอยนางรม (*Crassostrea rhizophorae*), Tuntiwaranuruk et al. (2008) ศึกษาในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) และทิพย์สุดา ผลภายี (2550) ศึกษาในหอยแครง (*Anadara granosa*) มีอัตราการพบ *Nematopsis* sp. สูงในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนมกราคม โดยค่าความชุก oocyst ของ *Nematopsis* sp. อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยคุณภาพของน้ำ จึงได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันพบว่า ค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ โดยมีความสัมพันธ์กันเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 เนื่องจากค่า Pearson Correlation เป็นบวก นั่นคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าความชุกจะสูงและเมื่ออุณหภูมิต่ำลงค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. ก็จะลดลงด้วย โดยพบว่า ความชุกของ *Nematopsis* sp. สูงในช่วงอุณหภูมิ 30.8-32.2°C และเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 30.8°C ค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. ลดลง สอดคล้องกับการรายงานของ Chakraborti and Bandyapadhyay (2011) และ Nunoy et al. (2011) พบค่าการระบาดมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิโดยช่วงที่อุณหภูมิมากกว่า 30-32.5°C มีการระบาดของ gregarine ชนิด *Nematopsis* สูง และเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 30°C พบการระบาดน้อยลง

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. กับความเป็นกรด-เบสและความเค็มของน้ำทะเล ด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน พบว่าความชุกของ *Nematopsis* sp. ไม่มีความสัมพันธ์กับกรด-เบส และความเค็มของน้ำทะเลที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งต่างจากการรายงานของ Tuntiwaranuruk et al. (2004) และ Nunoy et al. (2011) พบว่า เมื่อค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเลต่ำลง อาจส่งผลให้ค่าความชุกของ *Nematopsis* sp. ในหอยแมลงภู่ และในกุ้งกุลาดำลดลงด้วย จากรายงานของทิพย์สุดา ผลภายี (2550) พบว่า ในช่วงความเค็มของน้ำทะเลสูงพบการระบาดของ *Nematopsis* จำนวนมาก เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับความเค็ม

ลดลงจึงทำให้ปรสิตไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ โอกาสที่พบ *Nematopsis* ในช่วงความเค็มต่ำจึงน้อย เช่นเดียวกับ Jimenez et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการระบาดของ *N. marinus* ตั้งแต่ปี 1990-1999 พบว่า ค่าความเค็มของน้ำทะเลที่ต่ำกว่า 10 ppt หรือ เป็นแหล่งน้ำจืด จึงไม่มีผลต่อการระบาด แต่เมื่อสังเกตจากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้พบช่วงความเค็มในรอบปีมีค่าระหว่าง 26-35 ppt มีความแตกต่างกันไม่มากนัก จึงไม่ส่งผลกระทบต่อการระบาดของ *Nematopsis* sp.

นอกจากนี้ความชุกของ *Nematopsis* sp. ยังขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล โดยค่าความชุกจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูร้อนและมีแนวโน้มพบมากช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ แต่เมื่อเข้าสู่ต้นฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือถึงต้นฤดูร้อน ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงมีนาคมจึงมีแนวโน้มลดลง เช่นเดียวกับการพบปรสิตกลุ่มกรีกาเริน ชนิด *Nematopsis* sp. บริเวณซีเหือกกุ้งแซบวัย มีอัตราการพบปรสิตสูงสุดถึง 100% ในฤดูฝน และ 95% ในฤดูร้อนกับฤดูหนาว (ธิดาพร จิวภักดิ์ และคณะ, 2549)

การศึกษาความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ในเพรียงเจาะไม้ *B. thoracites*

การศึกษากการระบาดของ *Nematopsis* sp. ทำการนับจำนวน oocyst เพื่อหาความหนาแน่น พบว่า มีจำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 557 oocyst โดยคิดค่าความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุด 37 oocyst ต่อพื้นที่เหือกเพรียงเจาะไม้ 1 มิลลิเมตร ในเดือนมิถุนายน รองลงมาคือ เดือนกรกฎาคม จากนั้นค่าความหนาแน่นจึงมีแนวโน้มลดลง (ช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคมความหนาแน่นมีค่าใกล้เคียงกัน) และพบค่าความหนาแน่นน้อยสุด 5 oocyst ต่อพื้นที่เหือกเพรียงเจาะไม้ 1 มิลลิเมตร ในเดือนมกราคม 2557 (เดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน 2556 และเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม 2557 ความหนาแน่นค่อนข้างน้อย) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. กับอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเล พบว่ามีความสัมพันธ์กันเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 เนื่องจากค่า Pearson Correlation เป็นบวก แต่ไม่สัมพันธ์กับกรด-เบสของน้ำทะเล นั่นคือ อุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลแปรผันตรงกับความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. โดยพบว่าช่วงอุณหภูมิ 30.1-32.2°C ความหนาแน่นมีค่าสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 30.1°C ความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ ทิพย์สุดา ผลภายี (2550) และ Nunoy et al. (2011) ได้ศึกษาความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ในหอยแครงและกุ้งกุลาดาย พบว่าความหนาแน่นมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิของน้ำทะเลต่ำกว่า 30°C ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ความเค็มมีแนวโน้มลดลงต่ำกว่า 31 ppt (26-31 ppt) ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน พบความหนาแน่นมีค่าสูงขึ้นเมื่อค่าความเค็มต่ำกว่า 26 ppt และสูงกว่า 31 ppt นั้น พบว่าความหนาแน่นมีค่าลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Tuntiwaranuruk et al. (2004) ค่าความเค็มลดต่ำกว่า 30 ppt ในเดือนกรกฎาคมถึง

พฤศจิกายน มีค่าการระบาดของ *Nematopsis* สูง เกิดขึ้นในหอย *Arcuatula arcuatula*, *Anadara granosa*, *Perna viridis* และ *Paphia undulata* ต่างจากรายงานของ Nunoy et al. (2011) ที่พบว่าเมื่อค่าความเค็มต่ำความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. จะมีค่าสูง

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นกับความชุกของ *Nematopsis* sp. พบว่า ค่าความหนาแน่นของมีความสัมพันธ์กับค่าความชุก ซึ่งสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.01 เนื่องจากค่า Pearson Correlation เป็นบวก นั่นคือ ช่วงที่ค่าความชุกมาก ค่าความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ก็มากด้วย นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่นของปรสิตกับ อุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรด-เบสของน้ำทะเลแล้ว ความหนาแน่นของปรสิตอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางชีวภาพภายในตัว host ที่อาศัยอยู่ด้วย

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*) โดยพบปรสิตในระยะ oocyst เช่นเดียวกับรายงานของ Lee, Leedale, and Bradbury (2000) ศึกษาวงจรชีวิตของ *N. ostrearum* ที่ระบาดบริเวณชายฝั่ง Atlantic พบโปรโตซัวปรสิตชนิดนี้ในหอยนางรม *Crassostrea virginica* Padovan et al. (2003) พบ *N. mytella* ระบาดในหอยแมลงภู่ *Mytella falcate* และหอยนางรม *Crassostrea rizophorae* Azevedo and Matos (1999) และ Ceuta and Boehs (2012) พบ *Nematopsis* ระบาดที่หอยแมลงภู่ *Mytella guyanensis* สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบโปรโตซัวปรสิตกลุ่มนี้ในระยะ oocyst ในหอยทะเลสองฝา โดยทิพย์สุดา ผลภายี (2550) พบ *Nematopsis* sp. ในหอยแครง จากแหล่งเลี้ยงจังหวัดจันทบุรี ปภาศิริ บาร์เนท และคณะ (2550) พบ *Nematopsis* sp. ในหอยแมลงภู่ จากแหล่งเลี้ยงศรีราชา จังหวัดชลบุรี Tuntiwaranuruk et al. (2004) รายงานการระบาดของ *Nematopsis* spp. ในระยะ oocysts ในหอยลาย หอยกะพง หอยแครง และหอยแมลงภู่ ในพื้นที่จังหวัดชลบุรี เช่นเดียวกับฉันทนา (ไม่ได้ตีพิมพ์) พบกรีการิน *Nematopsis* sp. ระยะ oocysts ในหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งเลี้ยงหอย จังหวัดภูเก็ตในปี 2550-2553 และในปี 2552-2553 พบที่จังหวัดพังงาและกระบี่ ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกันกับรายงานของ Azevedo and Cachola (1992) และ Johns (1975) ที่พบตัวอ่อนของ *Nematopsis* sp. ระยะ oocysts ในเหงือกหอยแครง (*Cerastoderma edule*) สัณฐานวิทยาของ oocyst มีลักษณะกลม รี คล้ายไข่ เปลือกแข็งและหนา อยู่แบบเดี่ยว หรือรวมเป็นกลุ่ม ภายใน oocyst พบตัวอ่อนของ *Nematopsis* sp. ระยะ sporozoite ขดอยู่ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกคล้ายหนอน ซึ่งแต่ละ oocyst นั้นมี parasitophorous vacuole ขนาด 20.3-25 μ m ล้อมรอบอยู่ภายในถุง phagocyte โดยแต่ละ phagocyte จะพบ oocyst จำนวน 1-20 และขนาดของ

phagocyte นั้นขึ้นอยู่กับจำนวน oocysts ภายใน ทำหน้าที่ปกป้องเมื่อ oocyst อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าไปทำลาย จากการศึกษาในครั้งนี้พบ oocyst ของ *Nematopsis* sp. ใน *B. thoracites* มีขนาด $17.7 \times 13.5 \mu\text{m}$ เมื่อเทียบกับขนาดของ oocyst ในหอยทะเลสองฝาชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 8) พบว่ามีขนาดใหญ่กว่า *Nematopsis* sp. ในหอยแมลงภู่ *Perna viridis* $17.4 \times 12.6 \mu\text{m}$ (Tuntiwaranuruk et al., 2008), *N. incognito* ขนาด $15.7 \times 11.7 \mu\text{m}$ (Belofastova, 1996), *Nematopsis* sp. ในหอยกาบ *Meretrix meretrix* ขนาด $15.6 \times 11.1 \mu\text{m}$ (Abdel-Azeem et al., 2012) *Nematopsis* sp. และหอยลาย *Callista chione* ขนาด $16.6 \times 11.1 \mu\text{m}$ (Canestri-Trotti et al., 2000) ขณะที่ *N. mytella* หอยแมลงภู่ *mytella guyanensis* มีขนาดเล็กที่สุด $11.5 \times 8.2 \mu\text{m}$ (Azevedo & Matos, 1999)

แสดงให้เห็นว่า oocyst ของ *Nematopsis* แม้จะเป็นชนิดเดียวกัน แต่ถ้าอาศัยอยู่ใน host ที่ต่างชนิดกัน อาจมีขนาดที่แตกต่างกันได้ เราจึงไม่สามารถใช้ขนาดของ oocyst เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของ *Nematopsis* ได้โดยตรง ต้องใช้ข้อมูลจากการศึกษาด้าน ultrastructure ร่วมด้วย

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบขนาดโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ในระยะ oocyst ที่พบในเพรียงทะเลไม้ (*B. thoracites*) กับหอยทะเลสองฝาชนิดอื่น ๆ

ชนิด <i>Nematopsis</i>	Mollusks Hosts	Oocyst ยาว × กว้าง (µm)	References
<i>N. schneideri</i>	<i>Mytilus edulis</i>	12 × 7-8	Leger, 1903
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Cerastoderma edule</i>	13.3 × 4.5	Azevedo and Cachola, 1992
<i>N. portunidarum</i>	<i>Cerastoderma edule</i>	10-11 × 6.8-7	Belofastova, 1996
<i>N. incognito</i>	<i>Cerastoderma lamarcki</i>	15-15.7 × 10.5-11.7	Belofastova, 1996
<i>N. mytella</i>	<i>mytella guyanensis</i>	11.5 × 8.2	Azevedo and Matos, 1999
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Callista chione</i>	8.1-16.6 × 5.3-11.1	Canestri-Trotti et al., 2000
<i>N. mytella</i>	<i>Mytella falcate</i>	13.2 × 8.4	Padovan et al., 2003
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	11.5 × 9.1	Sabry et al., 2007
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Perna viridis</i>	17.4 × 12.6	Tuntiwaranuruk et al., 2008
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Meretrix meretrix</i>	15.6 × 11.1	Abdel-Azeem et al., 2012
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Anadara granosa</i>	16.8 × 12.6	ทิพย์สุดา ผลภาณี (2550)
<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Bactronophorus thoracites</i>	17.7 × 13.5	Present study

การศึกษาพื้นฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM)

ศึกษาโครงสร้างละเอียด oocyst ของ *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน พบว่า แต่ละ oocyst จะมีลักษณะคล้ายถุงหุ้มอยู่ เรียกว่า parasitophorous vacuole (PV) ซึ่งเป็น vacuole ที่พบในเซลล์โฮสต์ปรสิติก ส่วนใหญ่อาศัยและพัฒนาอยู่ในไฟลัม apicomplexan เกิดขึ้นได้โดยของเหลว parasitophorous vacuole (PV matrix) ยึดติดกับ cytoplasm ของ phagocyte เมื่อ parasitophorous vacuole มีจำนวนหลายถุงก็จะถูกหุ้มด้วย phagocyte หรือ phagocystic sac ซึ่งเป็นส่วนที่เนื้อเยื่อสร้างขึ้นมาเพื่อห่อหุ้มปรสิติกไว้ ภายในช่องว่าง (lumen) ของ oocyst เป็นบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแบบโปร่งแสง (electron lucent material) มีตัวอ่อนของปรสิติกระยะ uninucleated sporozoite อาศัยอยู่แบบเดี่ยว ๆ ลักษณะเป็นทรงกระบอกขดอยู่ (vermiform) เช่นเดียวกับรายงานของ Azevedo and Cachola (1992) พบว่าช่องว่าง (lumen) ภายในของ oocyst มี sporozoite อาศัยอยู่ องค์ประกอบภายใน uninucleated sporozoite พบ nucleus ขนาด 2.3 μm ลักษณะกลม, nucleolus มีขนาด 1.9 μm ลักษณะเป็นก้อนดิสก์เชื่อมแน่นกว่าบริเวณอื่น ๆ มีการสะสมไขมันใน cytoplasm, granule และ vacuole ขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Azevedo and Matos (1999), Azevedo and Padovan (2004) และ Abdel- Azeem et al. (2012) พบว่า ภายใน nucleus มีขนาดประมาณ 2 μm , nucleolus ขนาดประมาณ 1 μm และพบโครงสร้าง cytoplasmic vesicular เมื่อทำการวัด oocyst wall พบว่ามีขนาด 0.67-1.51 μm เป็นบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแบบทึบแสง มีขนาดความหนาไม่สม่ำเสมอทั้งหมดทั้งเปลือก

เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างตามยาว (longitudinal section) พบว่าบริเวณด้านปลายของ oocyst wall มี operculum ปกคลุมอยู่ ซึ่งที่ผิวของ operculum นั้นมีความหนา 0.34-0.54 μm ประกอบด้วย circular micropyle ลักษณะเป็นรูปกรวยเชื่อมต่อกับด้านใน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.98 μm เมื่อเปรียบเทียบขนาดความแตกต่างของ oocyst wall และ micropyle ที่ศึกษาในครั้งนี้ต่างไปจากรายงานของ Azevedo and Cachola (1992), Azevedo and matos (1999), Azevedo and Padovan (2004), Padovan et al. (2003), Tuntiwaranuruk et al. (2008), Abdel-Azeem et al. (2012) และทิพย์สุดา ผลภานี (2550) พบว่า ขนาดของ oocyst wall หนากว่า oocyst ของ *Nematopsis* ทุกชนิด แต่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง micropyle มีขนาดเล็กกว่า Tuntiwaranuruk et al. (2008) ที่พบ

micropyle มีขนาด 1.2 μm และทิวซ์สุดา ผลภายี (2550) พบ micropyle มีขนาด 1.4-1.5 μm โดย operculum จะทำหน้าที่เป็นทางผ่านของ sporozoite ในส่วนบริเวณรูเปิด operculum จะพบ dense cord เป็นตัวเชื่อมต่อกับเยื่อหุ้ม parasitophorous vacuole (PV membrane) สอดคล้องกับรายงานของ Azevedo and Matos (1999), Tuntiwaranuruk et al. (2008) และ Azevedo and Padovan (2004) พบว่าบริเวณ apical zone ของ operculum เชื่อมต่อกับ PV membrane ได้โดย dense cord บริเวณผิวด้านนอกของ oocyst wall โดยรอบพบเส้นใย microfibrils ขนาดเล็กประมาณ 0.05-0.08 μm มีการเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ ซึ่งต่างจากรายงานของทิวซ์สุดา ผลภายี (2550) ไม่พบการเรียงตัวของเส้นใย microfibril บริเวณ operculum แต่พบเส้นใย adherent microfibrils เชื่อมต่อกับ microfibrils ที่ผิว oocyst wall เกิดเป็นโครงสร้างตาข่ายอย่างต่อเนื่อง กระจายตัวอยู่บริเวณ PV membrane และยึดเกาะกับ protein particle (glycogen) ที่อยู่ภายใน cytoplasm ของ Phagocyte ซึ่งบางครั้ง cytoplasm บริเวณนี้อาจเชื่อมต่อกับ PV microfibrils ที่ผิวด้านนอกของ oocyst wall โดยตรง เช่นเดียวกับรายงานของ Azevedo and Matos (1999), Padovan et al. (2003) และ Azevedo and Padovan (2004) พบว่า บริเวณ PV membrane ใน *N. mytella* และ *N. gigas* มีการกระจายตัวของเส้นใย adherent microfibrils และกลุ่ม agglutinated microfibrils ในส่วน cytoplasm ของ phagocyte พบ glycogen particle จำนวนมาก ซึ่งต่างจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบกลุ่มเส้นใย agglutinated microfibrils และ dense bodies บริเวณ PV matrix

ในระหว่างการสลายตัว (lysis stage) เซลล์โฮสต์ของโปรโตซัวปรสิต พบ PV membranes เกิดการสลายตัว และ cytoplasmic matrix เข้าไปแทนที่ ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับ PV matrix ได้โดยตรง ทำให้บริเวณผิวด้านนอกของ oocyst wall โดยรอบนั้น ไม่พบเส้นใย microfibrils และ adherent microfibrils เช่นเดียวกับรายงานของ Azevedo and Cachola (1992), Azevedo and Matos 1999, Padovan et al. (2003) เกิดการสลายตัว (lysis stage) ของ PV membranes จากนั้น cytoplasmic จะเข้าไปแทนที่บริเวณนั้นและเชื่อมต่อกับ PV matrix เกิด pyknotic ในนิวเคลียสซึ่งอาจทำให้เซลล์ตาย

การศึกษาพยาธิสภาพเหงือกของเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาดของ *Nematopsis* sp.

การศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้ที่มีการระบาดพบว่า oocyst ของ *Nematopsis* sp. จะฝังตัวอยู่ในช่องเหงือกในส่วนของซี่เหงือก มีการระบาดอย่างหนาแน่นบริเวณปลายซี่เหงือก เช่นเดียวกับรายงานของทิพย์สุดา ผลภายี (2550) พบว่า oocyst อยู่ระหว่างช่องว่างของซี่เหงือก ทำให้เกิดการระคายเคืองและบริเวณเนื้อเยื่อเหงือกเกิดการชำรุด ส่งผลให้เนื้อเยื่อในส่วนต่าง ๆ เกิดการขาดออกซิเจน ประสิทธิภาพของระบบการแลกเปลี่ยนแก๊สก็ลดลง เมื่อทำการศึกษาริเวณเนื้อเยื่อ epithelial cell และ connective tissue ที่มีการระบาดของ *Nematopsis* พบว่า การระบาดในปริมาณน้อยไม่ส่งผลต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์ เซลล์จึงเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ ขอบเซลล์ไม่ขาดมีขอบเขตเนื้อเยื่อชัดเจน เซลล์จึงมีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกสูงเรียงตัวติดกันแน่น (columnar epithelial cell) ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการระบาดสูง พบว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อจะขาดอยู่เกิดเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์เสียรูปทรงการจัดเรียงตัวของเซลล์จึงไม่เป็นระเบียบ เซลล์สั้นลงมีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยมแบนบาง (squamous epithelial cell) สอดคล้องกับรายงานของ (Spark, 1962 อ้างถึงใน สุชารัตน์ จันทโรจวงศ์, 2526) กล่าวว่า epithelial cell บริเวณกระเพาะอาหารของหอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* มีการระบาดโคพิพอด และทิพย์สุดา ผลภายี (2550) พบการระบาดของ *Nematopsis* sp. ในหอยแครง *Anadara granosa* ทำให้เซลล์บริเวณนั้นสั้นลงเป็นรูป squamous โดย epithelial cell ที่ไม่มีการระบาด เซลล์จะยาวเป็นรูป columnar เมื่อสังเกตนิวเคลียสมีขนาดเล็ก ดิคสีเข้ม ผนัง oocyst ดิคสีน้ำตาลเข้ม ภายในบรรจุตัวอ่อนระยะ sporozoite ดิคสีม่วงเข้ม ซึ่งเป็นสีของ haematoxylin ในส่วนของ cytoplasm จะย้อมดิคสีชมพู ซึ่งเป็นสีของ eosin และมีเม็ดไขมันแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อจะเห็นเป็นช่องว่างใส เกิดการสร้าง haemocytes จำนวนมาก (haemocyte aggregation) บริเวณ epithelial cell ที่ถูกทำลาย พบการตายของเซลล์ (necrosis) บางเซลล์ และมีการรวมกลุ่มของ haemocytes ขึ้นเป็นชั้น ๆ ล้อมรอบเนื้อเยื่อเซลล์ที่มีการระบาดของ oocyst เพื่อป้องกัน ไม่ให้เกิดการกระจายไปยัง epithelial cell บริเวณอื่น ๆ จนทำให้เกิดกระบวนการ nodule formation ขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Bubel (1977) และ Moore and Lowe (1977) พบว่า *M. edulis* บริเวณ epithelial cell ในเนื้อเยื่อ mantle เกิดความเสียหาย ทำให้ haemocytes เกิดการตอบสนองต่อเนื้อเยื่อมีการรวมกลุ่มจำนวนมาก

สรุป จากการศึกษาความชุกและความหนาแน่นของ *Nematopsis* sp. ในระยะ oocyst ที่พบบริเวณเนื้อเยื่อเหงือกของเพรียงเจาะไม้จะมากหรือน้อยนั้น อาจขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลและปัจจัยภายใน host ที่อาศัยอยู่ และเมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp. กับ *Nematopsis* ชนิดอื่น ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก จึงยังไม่สามารถระบุได้ว่า *Nematopsis* ที่ทำการศึกษานี้เป็นชนิดใด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาบริเวณ oocyst wall ให้มีข้อมูลมากขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการเปรียบเทียบและจัดจำแนกชนิดของ *Nematopsis* sp.
2. ควรมีการศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Nematopsis* sp. ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านให้ละเอียดขึ้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาชนิดของ *Nematopsis* sp.
3. ควรมีการศึกษาวงจรชีวิตของ *Nematopsis* ใน host ชนิดนั้น ๆ ให้สมบูรณ์ และมีการนำข้อมูลด้านโมเลกุล (Molecular) มาใช้ในการจำแนกชนิด
4. ควรศึกษาถึงผลกระทบของ *Nematopsis* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์

บรรณานุกรม

- กรมประมง. (2546). การใช้กระเทียมสดในการกำจัดพยาธิ Gregarines ในกุ้งกุลาดำ ใน *บทคัดย่อ การสัมมนาวิชาการประมง ประจำปี 2546*. กรมประมง.
- จิราพร เกษรจันทร์. (2556). อีกสักครั้งกับกริการินในกุ้งทะเล. ค้นเมื่อ 5 สิงหาคม 2558, จาก <http://www.aquathai.org/index.php>
- ชนวัฒน์ ดันติวรานุรักษ์ (2009). การแพร่กระจายค่าความชุก และสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวปรสิต (*Nematopsis* spp.) ในกุ้ง หอย และปูเศรษฐกิจ บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. จาก http://elibrary.trf.or.th/project_content.asp?PJID=MRG5080233
- ชนวัฒน์ ดันติวรานุรักษ์ และชญัญญา เสมศรี. (2548). การสำรวจโปรโตซัวปรสิต (*Nematopsis* spp.) ในทางเดินอาหารของกุ้งทราย (*Metapenaeosis* sp.). *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 10(1-2), 34-39.
- ชนวัฒน์ ดันติวรานุรักษ์ และศรีัญญา ศุภพร โคมล. (2545). การระบาดของโปรโตซัวปรสิต (*Nematopsis* spp.) ในทางเดินอาหารของกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus merguensis*). *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, 5(1-2), 1-8.
- ทิพย์สุดา ผลภายี. (2550). โปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* ในหอยแครง (*Anadara granosa*) จากแหล่งเลี้ยง อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี. วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ธิดาพร ฉวีภักดิ์, ลีลา เรืองแป้น และวิรัชญา หนูปิ่น. (2549). ปรสิตและแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในแม่กุ้งแช่บ๊วย *Penaeus merguensis* de Man, 1883 จากแหล่งธรรมชาติภาคตะวันออก. ใน *บทคัดย่อสัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ประจำปี 2549*. สำนักวิจัยและพัฒนาชายฝั่ง กรมประมง.
- บพิช จารุพันธ์ และนันทพร จารุพันธ์. (2540). *สัตววิทยา*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ปภาศิริ บาร์เนท, วิชชุดา ประสาทแก้ว และบุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2005). ผลของฟิเอชที่เป็นกรดต่อการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 10(1-2), 25-33.
- ปณิธิ หนูน้อย. (2554). การระบาดและสัณฐานวิทยาของโปรโตซัวปรสิต *Nematopsis* sp. ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus semisulcatus*) จากแหล่งสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา.

- ประไพศิริ สิริกาญจน. (2538). *ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุขรัตน์ จันทโรจวงศ์, สุทธิชัย เตมียวนิชย์ และวันทนา อยู่สุข. (2526). ผลของปรสิตประเภทโคพีพอดต่อหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* (Lin.)). วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Abdel-Azeem S. Abdel-Baki, Saleh Al-Quraishy, Mohamed A. Dkhil1, Ibraheem Al Nasr, Elsa Oliveira, Graça Casal, & Azevedo, C. (2012). Ultrastructural characteristics of *Nematopsis* sp. oocysts (Apicomplexa: Porosporidae), a parasite of the clam *Meretrix meretrix* (Veneridae) from the Arabian Gulf, Saudi Arabia. *Folia Parasitologica*, 59, 81-86
- Azevedo, C., & Cachola, R. (1992). Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve mollusks. *Diseases of Aquatic Organisms*, 14, 69-73.
- Azevedo, C., & Matos, E. (1999). Description of *Nematopsis mytella* n. sp. (Apicomplexa), parasite of the mussel *Mytella guyanensis* (Mytelidae) from the Amazon estuary and description of its oocysts. *European Journal of Protistology*, 35, 427-433.
- Azevedo, C., & Padovan, I. P. (2004). *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 214-219.
- Belofastova, I. P. (1996). Gregarines of the genus *Nematopsis* (eugregarinida: porosporidae), parasites of the Black Sea mollusks. *Parazitologiya*, 30, 159-173.
- Berrilli, F., Ceschia, G., De Liberato, C., Di Cave, D., & Orecchia, P. (2007). Parasitic infections of *Chamelea gallina* (Molusca, Bivalvia) from commercially exploited banks of the Adriatic Sea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 20, 14-23.
- Bubel, A. (1977). Cellular responses to shell damage in *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30(1), 1-27

- Canestri-Trotti, G. B., Paesanti, F., & Turolla, E. (2000). Monitoring of infectious by Protozoa of the genera *Nematopsis*, *Perkinsus* and *Porospora* in the smooth venus clam *Callista chione* from North-Western Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*, 42, 157-161.
- Carballal, M. J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferrosoto, B., & Villalba, A. (2001). Parasitic and Pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* population of the coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 87-97.
- Ceuta, L. O., & Boehs, G. (2012). Parasites of mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) of Camamu Bay, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 72(3), 421-427.
- Chakraborti, J., & Bandyopadhyay, P. K. (2011). Seasonal incidence of protozoan of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) of Sundarbans, West Bangal, India. *Journal parasit Diseases*, 35(1), 61-65.
- Clopton, R. E. (2000). Order Eugregarinorida Léger, 1900 An Illustrated Guide to the Protozoa. *Society of Protozoologists*, 1, 205-288.
- Cremonte, F., Figueras, A., & Burreson, E. M. (2005). A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. *Aquaculture*, 249, 23–33.
- Daniel, L. D., Mehwish A., Adam, B., Eric, L., Gustaf, M., Wendy, M., John, N., Nicole, W., & Joyce, Y. (2011). Molecular phylogeny of Pholadoidae Lamarck, 1809 supports a single origin for xylotrophy (wood feeding) and xylotrophic bacterial endosymbiosis in Bivalvia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 245-254.
- Fajer-Avila, E. J., Covarrubias, M. S. M., Abad-Rosales, S., Roque, A., Meza-Bojorquez, P., & Hernandez-Gonzalez, C. (2005). Effectiveness of oral ElancobanTM and Avimix-STTM against *Nematopsis* (Apicomplexa : Porosporidae) gametocysts infecting the shrimp *Liopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 244, 11-18.

- Francisco, C. J., Hermida, M. A., & Santos, M. J. (2010). Parasites and symbionts from *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Bivalves: Mytilidae) of the Aveiro Estuary Portugal. *Journal of Parasitology*, 96, 200-205.
- Howard, D. W., & Smith, C. S. (2004). *Histological techniques for marine bivalve Mollusks: NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25*. Massachusetts, U.S.A.: National Marine Fisheries Service.
- Jimenez, R., Barniol, L., & Machuca, M. (2002). *Nematopsis marinus* n. sp., a new septate Gregarine from cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), in Ecuador. *Aquaculture Research*, 33, 231-240.
- Jones, J. B. (1975). *Nematopsis* n. sp. (Sporozoa : Gregarina) in *Perna canaliculus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 9, 567-568.
- Kim, Y., Powell, E. N., Wade, T. I., Presley, B. J., & Sericano, J. (1998). Parasites of sentinel bivalves in the NOAA Status and Trends program: distribution and relationship to contaminant body burden. *Marine Pollution Bulletin*, 37, 45-55
- Lee, J. J., Hutner, S. H., & Bovee, E. C. (1985). An illustrated guide to the protozoa. *Society of Protozoologists, Allen Press, USA*, 334-374.
- Lee, J. J., Leedale G. F., & Bradbury, P. (2000). An Illustrated Guide to the Protozoa, (2nd ed.). *Society of Protozoologists: Allen Press. USA*, 190-369.
- Leger, L. (1903). Sporozoaire parasite des moules et autres lamellibranches comestibles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 137, 1003-1006.
- Lightner, D. V. (1996). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 15: 579-601.
- Meepool, A., Poulpanich, N., Tuntiwaranuruk, C., Noppharat-arphakul, J., Sootanan, R., & Chalermwat, K. (2008). A study of the gametocyst of *Nematopsis* by scanning electron microscope. In 34th *Congress on Science and Technology of Thailand 2008* (p. 68). Thailand: Science and Technology of Thailand.

- Moore, M. N., & Lowe, D. M. (1977). The cytology and cytochemistry of the haemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29, 18-30.
- Nair, N. B., & Saraswathy, M. (1971). The biology of wood-boring teredinid molluscs. In: Russell, F. S. & Yonge, M. eds. *Advances in Marine Biology*. London, *Academic Press*, 9, 335-509.
- Nunoy, P., Tantiwaranuruk, C., Noparat-Arpakul, J., & Meepool, A. (2011). Observation on Protozoa Parasite *Nematopsis* in Green Tiger Prawn (*Penaeus semisulcatus*) from Ang-Sila pier, Chonburi Province, Thailand. *Journal of the Microscopy Society of Thailand*, 4(2), 79-83.
- Padovan, I. P., Corral, L., Tavares, L. A., Padovan, P. A., & Azevedo, C. (2003). Fine structure of The oocyst of *Nematopsis mytella* (Apicomplexa, Porosporidae), a parasite of the mussel *Mytella falcata* and of the oyster *Crassostrea rizophorae* (Mollusca, Bivalvia) from the northeastern Atlantic coast of Brazil. *Brazil Journal Morphological Science*, 20, 121–124.
- Prasadan, P. K., & Janardanan, K. P. (2001). Three new species of gregarines (apicomplexa: sporozoa: porosporidae) in the Estuarine Crabs from Kerala, India. *Acta Protozoologica*, 40, 303-309.
- Poulpanich, N., & Withyachumnarnkul, B. (2009). Fine structure of a septate gregarine trophozoite in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, 57-63.
- Rueckert, S., Simdyanov, T. G., Aleoshin, V. V., & Leander, B. S. (2011). Identification of a Divergent Environmental DNA Sequence Clade Using the Phylogeny of Gregarine Parasites (Apicomplexa) from Crustacean Hosts. *Plos one*, 6(3), e18163, doi:10.1371/journal.phone.0018163.
- Sabry, R. C., Gesteira, T. C. V., & Boehs, G. (2007). First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary-Ceará, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67, 755-758
- Schneider, A. (1982). Signalement m'un nouveau sporozaire. *Table. Zool.*, 2, 209-210.

- Tuntiwaranuruk, C., Chalermwat, K., Pongsakchat, V., Meepool, A., Upatham, E. S., & Kruatrachue, M. (2008). Infection of *Nematopsis* oocysts in different size classes of the farmed mussel *Perna viridis* in Thailand. *Aquaculture*, *281*, 12-16.
- Tuntiwaranuruk, C., Chalermwat, K., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., & Azevedo, C. (2004). Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of bivalves from Chonburi Province, Gulf of Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, *58*, 47-53.
- Tuntiwaranuruk, C., Boonmameepool, A., Noppharat-arphakul, J., & Upatham, E. S. (2015). Ultrastructure of gametocyst of parasitic protozoan, *Nematopsis* sp. in black tiger shrimp *Penaeus monodon* from the Gulf of Thailand. *Acta Protozoologica*, *54*, 137-142.
- Turner, R. D. (1966). A survey and illustrated catalogue of the Teredinidae (Mollusca: Bivalvia). The Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA.
- Valigurova, A., & Koudela, B. (2008). Morphological analysis of the cellular interactions between the eugregarine Gregarinagarnhami (Apicomplexa) and the epithelium of its host, the desert locust *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Protistology*, *44*, 197-207.
- Valigurova, A., Vaškovicova, N., Musilova, N., & Schrevel, J. (2013). The enigma of eugregarine epicytic folds: where gliding motility originates. *Frontiers in Zoology*, *10*, 57.
- Valigurova, A., Michalkova, V., & Koudela, B. (2009). Eugregarine trophozoite detachment from the host epithelium via epimerite retraction: Fiction or fact. *International Journal for Parasitology*, *39*, 1235-1242.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ขนาดของ *Nematopsis* sp. ในระยะ oocyst

ตารางที่ 9 แสดงขนาดของ *Nematopsis* sp. ในระยะ oocyst ที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกเพรียงเจาะไม้
(*Bactronophorus thoracites*)

n	ขนาดของ <i>Nematopsis</i> sp. ในระยะ Oocyst	
	ความกว้าง (μm)	ความยาว (μm)
1	13.42	17.47
2	14.18	18.23
3	13.42	18.99
4	12.91	18.48
5	12.91	17.97
6	13.92	18.73
7	13.67	17.22
8	13.42	16.96
9	12.66	17.47
10	14.18	17.97
11	13.67	18.23
12	14.43	16.96
13	13.67	16.96
14	13.16	16.96
15	13.42	17.72

ตารางที่ 10 แสดงขนาดของ parasitophorous vacuole (PV), ผนังของ oocyst (wall) ที่พบในเนื้อเยื่อ
เหงือกของเพรียงเจาะไม้ (*B. thoracites*)

n	ขนาด (μm) parasitophorous vacuole	ขนาด (μm) oocyst wall
1	23.04	0.79
2	21.01	0.69
3	23.29	0.80
4	22.53	0.94
5	25.06	0.79
6	21.77	0.75
7	22.53	0.83
8	20.25	1.51
9	22.53	0.97
10	21.01	1.27
11	23.54	0.67
12	20.76	0.85
13	20.51	0.76
14	20.25	1.41
15	23.04	1.35

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสาร

1. Buffer

1.1 0.2 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.8 (100 มิลลิลิตร)

NaH ₂ PO ₄	1.902	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.082	กรัม
NaCl	1.700	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2. Fixative

2.1 น้ำยาคงสภาพ 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M PBS, pH 7.8 (100 มิลลิลิตร)

25% glutaraldehyde	10	มิลลิลิตร
0.2 M PBS	50	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2.2 น้ำยาคงสภาพ 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS, pH 7.8 (10 มิลลิลิตร)

2% osmium tetroxide	10	มิลลิลิตร
0.2 M PBS	5	มิลลิลิตร

3. Araldite 502

Araldite 502	27	กรัม
DDSA	20	กรัม
DMP-30	1	มิลลิลิตร

นำ araldite 502 และ DDSA มาผสมโดยคนให้เข้ากันนาน 15 นาที แล้วเติม DMP-30 ลงไปแล้วคนต่ออีก 15 นาที จากนั้นใส่ฟองอากาศประมาณ 5 ชั่วโมงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10°C

4. สีย้อม

4.1 1% aqueous methylene blue (200 มิลลิลิตร)

Methylene blue	2	กรัม
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	3.8	กรัม
Distilled water	200	มิลลิลิตร

นำ methylene blue และ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ มาละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดที่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อไม่ให้โดนแสง

4.2 Saturated urenyl acetate ใน 70% methanol

urenyl acetate	2	กรัม
70% methanol	30	มิลลิลิตร

นำ urenyl acetate มาละลายใน 70% methanol จนหมด จากนั้นเก็บสารละลายไว้ในขวดที่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ไม่ให้โดนแสง

4.3 0.1% aqueous lead citrate

Lead nitrate	1.33	กรัม
Sodium citrate	1.76	กรัม
1N NaOH	8	มิลลิลิตร
CO_2 -free distilled water (น้ำกลั่นต้มเดือด)	30	มิลลิลิตร

นำ lead citrate และ sodium citrate มาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด 1 NaOH จนกระทั่งสารละลายใส

4.4 Mayer's hematoxylin (1000 มิลลิลิตร)

Sodium iodate	0.2	กรัม
Hematoxylin	1	กรัม
Acetic acid	1	กรัม
Potassium alum	50	กรัม
Chacoal hydrate	50	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ผสม hematoxylin ให้เข้ากันในน้ำกลั่น จากนั้นเติม sodium iodate และ potassium alum แล้วนำไปต้มเพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม acetic acid และ chacoal hydrate ผสมให้เข้ากัน

4.5 Eosin (1% alcohol eosin stock solution)

Eosin Y	1	กรัม
Distilled water	20	มิลลิลิตร
95% ethylalcohol	80	มิลลิลิตร

ละลายสีในน้ำกลั่นคนให้เข้ากันแล้วเติม 95% ethyl alcohol จากนั้นคนให้เข้ากัน เก็บไว้เพื่อใช้เตรียมต่อไป

4.6 Eosin working solution

Eosin Y stock solution	25	มิลลิลิตร
95% Ethanol	75	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	0.5	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง