ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*)ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

Antimicrobial Efficiency of Crude Extracts from *Lumnitzera littorea* to *Vibrio* sp.

ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล[1] อุไรวรรณ วัฒนกุล[2] และ วันเพ็ญ สายน้ำ[1]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

บทคัดย่อ

ในการใช้น้ำเป็นตัวสกัดสารสกัดหยาบจากใบ และเปลือกของฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) ที่รวบรวมจากป่าชายเลน ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ที่แยกได้จากปลากะพงแดงที่มีอาการป่วย พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนของเปลือกสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี โดยมีค่า MIC เท่ากับ 300 ไมโครลิตร ต่อ suspension ของเชื้อแบคทีเรีย 5 มิลลิลิตร (20.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่สารสกัดหยาบจากส่วนของใบไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อนำส่วนใบและเปลือกไปวิเคราะห์ปริมาณแทนนินโดยวิธี Colorimetric Method (AOAC, 1990) โดยกำหนดให้สัดส่วนระหว่างใบ หรือเปลือกต่อน้ำ เป็น 1 : 5 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัด 1-2 ชั่วโมง พบว่าเปลือกจะมีปริมาณแทนนิน 8.9 ไมโครกรัม ต่อกรัม ขณะที่ส่วนใบมีปริมาณแทนนินเพียง 1.3 ไมโครกรัม ต่อกรัม เป็นการยืนยันว่าสารสกัดจากเปลือกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงกว่า

Abstract

Leaves and barks of *Lumnitzera littorea* collected from mangrove area in Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus were extracted for crude extracts. The water extraction were assigned under the room temperature within 12 hours. Antimicrobial efficiency of crude extracts was also investigated using *Vibrio* sp. isolated from moribund culture-red snapper. The results indicated that only crude extract from bark had more efficiency on bacterial inhibition (MIC = 300 □l per 5 ml bacterial suspension or 20.1 mg / ml). The bark was next determined for the tannin contents using the Colorimetric Method (AOAC, 1990). The same ratio of materials with 70 ° C in 1 - hours were accordingly assigned. The tannin content from the bark was higher than that of leaves 8.9 : 1.3 micrograms / gram The overall results suggested that crude extract from bark provide the better efficiency for bacterial inhibition.

คำนำ

ป่าชายเลนเป็นสังคมพืชที่มีความโดดเด่น มีลักษณะเฉพาะตัว สามารถดำรงชีวิตได้ในที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำขึ้นลงตลอดเวลา และทนต่อความเค็มได้เป็นอย่างดี จากการสำรวจเมื่อปี พ.ศ. 2539 พื้นที่ป่าชายเลนของประเทศไทยมีอยู่ประมาณ 1,047,390 ไร่ ส่วนใหญ่จะมีมากทางภาคใต้ประมาณ 934,220 ไร่ หรือ 89.2 เปอร์เซ็นต์ โดยจะพบทั้งทางด้านฝั่งตะวันออกติดกับอ่าวไทย ซึ่งจะพบตามปากน้ำและลำน้ำใหญ่ๆ ในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี มีพื้นที่รวม 103,570 ไร่ และฝั่งตะวันตกด้านทะเลอันดามัน ในเขตจังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และสตูล รวม 830,650 ไร่ (อรรถวุฒิ, 2544) จากผลรวมการประเมินมูลค่าระบบนิเวศป่าชายเลนทั้งทางด้านด้านเศรษฐกิจ สังคม และคุณค่าทางสิ่งแวดล้อมเท่าที่ผ่านมาพบว่ามีค่ารวม 8,132.63-7,518.33 ล้านบาทต่อปี (สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2550) และมีรายงานระบุว่ามีพันธุ์ไม้ป่าชายเลนอยู่ถึง 35 วงศ์ 43 สกุล 74 ชนิด และส่วนใหญ่เป็นกลุ่มในวงศ์ Rhizophoraceae พันธุ์ไม้เหล่านี้สามารถใช้ประโยชน์ ทั้งเป็นเชื้อเพลิง วัสดุก่อสร้าง ประดิษฐ์เครื่องใช้ในครัวเรือน การกลั่นไม้เพื่อให้ผลผลิตกาซ และของเหลวต่าง ๆ รวมถึงเป็นแหล่งแทนนินที่สำคัญ (สนิท, 2532)

นันทวันและคณะ (2547) ได้ทำการสำรวจพืชป่าชายเลนที่จังหวัดนครศรีธรรมราชและตรัง พบว่ามีพืช 62 ชนิด ในจำนวนนี้ 44 ชนิดเป็นพืชสมุนไพร และอีก 32 ชนิดเป็นพืชที่รับประทาน แต่มีเพียง 25 ชนิด ที่มีผู้รู้สรรพคุณ เช่น เหงือกปลาหมอ ปรงทะเล แสมขาว สำมะงา เป็นต้น และจากผลการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้ทราบว่า พืชป่าชายเลนเป็นแหล่งสำคัญของแทนนิน เช่น พังกาหัวสุม มีปริมาณแทนนินถึง 20-43 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โปรงขาว มี 25-37 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง โปรงแดง 20-40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง โกงกางใบใหญ่ 8-40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ในจำนวนพืชหลายชนิดที่มีประวัติการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา ฝาดดอกแดง (*Lumnitzera littorea*) จัดเป็นพืชเด่นรองจากกลุ่มโกงกาง กลับเป็นกลุ่มที่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติทางด้านเภสัชวิทยาน้อยมาก การได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานในด้านนี้ โดยเฉพาะการใช้สารสกัดชีวภาพจากพืชในทางการแพทย์และการเกษตรต่อไป

ฝาดดอกแดง จัดอยู่ในวงศ์ Combretaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ เจริญเติบโตได้ดี ในที่ที่เป็นดินร่วนและมีความเค็ม น้อย และมักพบขึ้นเป็นกลุ่มบริเวณปากแม่น้ำ ที่เป็นดินเลนแข็ง หรือดินทราย ดอกมีสีแดง ออกดอกที่ปลายกิ่งเป็นช่อกระจะ แต่ละช่อยาว 2-5 ซม. มี 5-15 ดอก กลีบดอก 5 ใบเดี่ยว เวียนรอบกิ่งหนาแน่นที่ปลายกิ่งแผ่นใบหนารูปรี ขนาด 1-3 x 3-9 ซม. ปลายใบกลม เว้าตื้นๆ ฐานใบรูปลิ่ม ขอบใบหยักมน มีต่อมขนาดเล็ก ก้านใบสั้น ใบสีเขียวเข้ม ผลรูปกระสวย ป่องตรงกลาง มีสันตามยาว ขนาดผล 0.4 x 1.3-2 ซม. ผลแก่สีน้ำตาลแดง ออกดอกและผล เดือนพฤศจิกายน-เมษายน (ภาพที่ 1ก – 1ข)

ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกร่อย ด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่น ได้มีการนำส่วนต่าง ๆ ของพืชป่าชายเลนมาแช่ในแหล่ง ลี้ยงสัตว์น้ำ ให้สารชีวภาพละลายออกมา เพื่อควบคุม และกำจัดโรค รวมถึงการเป็นสารฝาดสมาน ทำให้แผลหายเร็วขึ้น ดังนั้นการสกัดสารชีวภาพ รวมถึงแทนนินจากฝาดดอกแดงจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เพราะหากให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ จะสามารถลดค่าใช้จ่ายจากการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะต่าง ๆ และหลีกเลี่ยงการตกค้างของสารเคมีในสัตว์น้ำอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บรวบรวมส่วนใบ และเปลือกของฝาดดอกแดง (ภาพที่ 1 - 2) จากพื้นที่ป่าชายเลน ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง มาทำให้มีชิ้นส่วนที่ละเอียด แล้วนำไปตากให้แห้ง (ภาพที่ 2ก – 2ข) เก็บไว้ในที่ที่ไม่มีความชื้น เพื่อเตรียมการสกัดต่อไป

ภาพที่ 1 ใบ

ภาพที่ 2 เปลือกลำต้น

ภาพที่ 3 ใบฝาดดอกแดงตากแห้ง

ภาพที่ 4 เปลือกฝาดดอกแดงตากแห้ง

2. การสกัดสารสกัดหยาบ

การสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายน้ำ โดยใช้สัดส่วนของใบ หรือ เปลือก ต่อน้ำ เป็น 1 : 5 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (สกัดเพียงครั้งเดียว) จะได้สารสกัดหยาบจากใบมีสีเหลืองขุ่น ขณะที่จากเปลือกจะมีสีน้ำตาลแดงขุ่น

แล้วนำสารสกัดที่ได้จากใบและเปลือกมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง filter unit no. 16534 (Sartorius) ขนาดช่องตา 0.20 ไมครอน อีกครั้งหนึ่งเพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียอื่น ๆ ปนเปื้อน เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 -10 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเกิน 2 สัปดาห์)

3. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ได้จากการแยกเชื้อจากปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ที่มีอาการตกเลือด และมีแผลตามลำตัว (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ฟาร์มเปลาน้ำกร่อย บริษัท ทำเจริญโภค

ภัณฑ์อาหาร ตรัง) ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และจำแนกด้วยชุดตรวจสอบ API – 20E (bioMereux) เก็บรักษาใน tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เตรียม suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. โดยปั่นด้วย 0.85 % NaCl เตรียมให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ McFaland No. 2 ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ประมาณ 6×10^8 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร (ดูใน Tonguthai, et al., 1999)

3.2 การทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของ สารสกัดหยาบต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

นำสารสกัดหยาบที่ผ่านการกรองแล้ว มาเติมลงใน suspension ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp จำนวน 5 ระดับ คือ 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครลิตร ต่อ suspension 5 มิลลิลิตร (เมื่อนำสารสกัดหยาบไปผ่านกระบวนการทำแห้ง (freeze dry) จะได้น้ำหนักแห้ง 0.067 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร) ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 3.35, 6.7, 13.4, 20.1 และ 26.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่า แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

กระบวนการสกัดสารชีวภาพ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน ใช้วิธีการสกัดเบื้องต้นเช่นเดียวกันกับการสกัดหยาบ โดยใช้สัดส่วนของใบ หรือเปลือกต่อน้ำ เท่ากับ 1 : 5 โดยน้ำหนัก ใช้เวลาในการสกัด 1 - 2 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละชุดมาวิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน ด้วยวิธี Colorimetric Method (AOAC, 1990) เปรียบเทียบปริมาณแทนนินในสารสกัดหยาบ ด้วยสารละลายแทนนินมาตรฐาน และเปรียบเทียบปริมาณแทนนินระหว่างใบและเปลือก

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp. พบว่าสารสกัดจากเปลือกที่ความเข้มข้นของ 300 และ 400 ไมโครลิตร ต่อ suspension 5 มิลลิลิตร (20.1 และ 26.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด กล่าวคือ optical density (OD) มีค่าเป็น 0 และความเข้มข้นที่ 50, 100 และ 200 ไมโครลิตร ต่อ suspension 5 มิลลิลิตร หรือ 3.35, 6.7, 13.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่า OD เท่ากับ 0.5, 0.33 และ 0.18 ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากใบของฝาดดอกแดงไม่ให้ผลในการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากฝาดดอกแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

Parts	Crude extract concentration (µl / 5 ml suspension)	Optical density (OD) λ_{540nm}
Leaves	0 (control)	0.63
	50	0.70
	100	0.70
	200	0.68
	300	0.64
	400	0.59
Barks	0 (control)	o.63
	50	0.50
	100	0.33
	200	0.18
	300	0
	400	0

เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณแทนนินในสารสกัดหยาบจากส่วนของใบ และเปลือก พบว่า ในส่วนของใบสับละเอียดตากแห้ง มีปริมาณแทนนินอยู่พียง 1.3 ไมโครกรัม ต่อกรัม ขณะที่ส่วนของเปลือกสับละเอียดตากแห้งมีปริมาณแทนนินสูงถึง 8.9 ไมโครกรัม ต่อกรัม

จากค่า MIC ที่ได้ จะเห็นได้ชัดเจนว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกของฝาดดอกแดง จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ได้ดีมาก ขณะที่ในระดับความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดจากใบ กลับไม่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเลย ซึ่งในขั้นต้นอนุมานได้ว่า สารชีวภาพที่ละลายน้ำได้ จากส่วนใบไม่มีศักยภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (non-antimicrobial efficacy) และเมื่อทบทวนเอกสารพบว่า สารชีวภาพที่พืชสร้างขึ้น และละลายน้ำได้ดีคือแทนนิน (tannins) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบในกลุ่ม polyphenolic compound ชนิดละลายน้ำได้ (hydrolysable tannins) พบในเปลือกมากว่าในใบ (วันดี, 2536; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2001; Miles *et al*., 1999) และรายงานที่ผ่านมาพบว่าแทนนินสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส โปรโตซัว รวมถึงใช้เป็นสารฆ่าแมลงได้อีกด้วย (Khafagi *et al*., 2003; Kabaru & Gichia, 2001; Miles *et al*., 1999)

ดังนั้นการที่สารสกัดหยาบจากเปลือกสามารถออกฤทธิ์ได้ดีต่อแบคทีเรีย ขณะเดียวกันก็มีปริมาณแทนนินสูงกว่าในส่วนใบ จึงเป็นการยืนยันได้ว่า แทนนินเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามในใบและเปลือกของพืชป่าชายเลนทั่วไป มีองค์ประกอบของสารชีวภาพมากมาย แต่ส่วนใหญ่มักไม่

ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่น คือ มีการใช้กิ่งหรือก้าน รวมทั้งส่วนใบ แช่ในบ่อ หรือกระชังเลี้ยงปลาน้ำกร่อย ในบริเวณปากแม่น้ำ ภายในจังหวัดกระบี่ ซึ่งเชื่อว่าจะสามารถรักษาโรคติดเชื้อภายนอกของปลาป่วยได้ (ข้อมูลจากการสัมภาษณ์)

อย่างไรก็ดี การสร้างสารชีวภาพของพืชป่าชายเลน ซึ่งอาจรวมถึงฝาดดอกแดง อาจจะผันแปรได้ตามแหล่งพืช อายุต้นพืช ฤดูกาล และสิ่งแวดล้อม (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ดังนั้นในการสกัดให้ได้ปริมาณสารสกัดที่มีสารออกฤทธิ์สูง ควรมีการศึกษาในรอบปี จากพืชหลาย ๆ กลุ่ม ที่ฤดูกาลต่าง ๆ เพื่อเป็นอีกข้อมูลที่สามารถสนับสนุนการใช้สารชีวภาพในการควบคุมโรคระบาดของสัตว์น้ำ ซึ่งจะสามารถหลีกเลี่ยงผลเสียจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย เรื่อง “องค์ประกอบและการออกฤทธิ์ของสารสกัดชีวภาพจากพืชป่าชายเลน และแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารสกัดในการป้องกัน และควบคุมการระบาดของโรคและปรสิตในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง” โดยทุดอุดหนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2550-2551 ของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

นันทวัน บุณยะประภัศร, สิริมา สอนเล็ก, วรพรรณ เกื้อกูลเกียร์ติ, วิโรจน์ ธีรธนาธร และสนิท อักษรแก้ว. 2547. พืชสมุนไพรและพืชอาหารในป่าชายเลน. การจัดการสวนป่าชายเลนแบบผสมผสานเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย.

วันดี กฤษณพันธ์. 2536. เภสัชวินิจฉัย. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1, ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 171 น.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2001. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 3 พืชที่ให้สีย้อมและแทนนิน. โครงการทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (PROSEA). สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 223 น.

สนิท อักษรแก้ว. 2532. ป่าชายเลนนิเวศวิทยาและการจัดการ. หจก. คอมพิวแอดเวอร์ไทซิ่ง, กรุงเทพฯ. 251 น.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2550. รายงานผลสถิติเชิงเศรษฐกิจ (ออนไลน์) http://service.nso.go.th/ nso/report/ report01_1.html.

อรรถวุฒิ กันทะวงศ์. 2544. เรื่องของป่าชายเลน. (ออนไลน์). www.talaythai.com/Education/ 43206483/ 43206483.php3.

Kabaru, J. N. and L. Gichia. 2001. Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove trees *Rhizophora muconata* (Rhyzophoraceae) Lam. against three arthropods. AJST 2(2): 44-49.

Khafagi, I., A. Gab-Alla, W. Salama and N. Fouda. 2003. Biological activities and phytochemical constituents of the gray mangrove *Aviscennia marina* (Forssk.) Vierh. Egyptian J. Bot. 5: 62-69.

Miles, D. H., U. Kokpol, V. Chittawong, S. Tip-payang, K. Tunsuwan and C. Nguyen. 1999. Mangrove forests – the important of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value. In International Conference of Biodiversity and Bioresources; Conservation and utilization. 23 – 27 November, 1997. Phuket. IUPAC.

Tonguthai, K., S. Chinabut, T. Somsiri, P. Chanratchakool and S. Kanchanakhan, 1999. Diagnosis Procedures for Finfish Diseases. Aquatic Animal Health Research Institue (AAHRI), Department of Fisheries, Bangkok.