ลักษณะที่ผิดปกติและชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดง

The abnormal characters and types of bacterial detected in mud crab (*Scylla* sp.) with red thoracic-abdominal syndrome

จีรนันท์ อินทนาคม[1,2*] และจินตนา สและน้อย[3]

Jeeranan Intanakom[1,2*] and Jintana Salaenoi[3]

บทคัดย่อ: การศึกษาลักษณะที่ผิดปกติและชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในปูทะเลเขตจังหวัดสมุทรสงครามและจันทบุรี ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 พบปูทะเลที่มีลักษณะแตกต่างไปจากปูทะเล ปกติทั่วไป คือ บริเวณอก ท้อง รยางค์ขาเดิน และก้ามมีสีน้ำตาลจนถึงสีแดง กล้ามเนื้อลำตัวมีสีขาวขุ่นอมชมพู มองเห็นเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน เลือดมีสีแตกต่างกัน ซึ่งจัดแบ่งปูทะเลที่มีอาการดังกล่าวออกเป็น 5 กลุ่มตามสีเลือด คือ กลุ่ม 1 เลือดใส กลุ่ม 2 เลือดสีส้มใส กลุ่ม 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น กลุ่ม 4 เลือดสีส้มคล้ายสีชาเย็น และกลุ่ม 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม โดยกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มที่มีอาการรุนแรงที่สุด เนื่องจากเลือดไม่แข็งตัว อวัยวะภายในไม่คงรูป ตับมีสีเหลืองซีด เหงือกบวมพอง และนิ่มกว่าปูปกติ กล้ามเนื้อโพรก การตอบสนองช้า และปูจะตายลงภายในเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากตับ หัวใจ กล้ามเนื้อ เหงือก และเลือด จากปูทะเลที่มีอาการผิดปกติ พบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Shewanella putrefaciens*

คำสำคัญ: ปูทะเล อาการอกและท้องแดง เชื้อแบคทีเรีย

ABSTRACT: Abnormal characteristics and types of bacterial detected in mud crabs collecting from Samut Songkhram and Chanthaburi Provinces during October 2008 to February 2009 were observed. It was found that the infected crabs had brown to red abdominal thorax, chela, joints and claws and the fibrous muscle were clearly white. Haemolymph of those crabs were classified the severity of the syndrome into five groups; transparent (group I), transparency orange (group II), translucent brown (group III), cloudy orange (group IV) and opaque white (group V). Crabs in group IV and V got unclotted substances which were dispersed in organelles resulted to die very fast. The bacterial identification of infected mud crab present 3 species: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Shewanella putrefaciens*

Keywords: mud crab, red thoracic-abdominal syndrome, bacterial.

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา

[2] Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

[3] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[3] Department of Marine Science, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding Author: Jeeranan_99@hotmail.com

แก่นเกษตร 38 : 361-372 (2553).

บทนำ

ปูทะเลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง รสชาติดี และมีราคาสูง จึงทำให้ปูทะเลเป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยมีการแปรรูปเป็นปูกระป๋องและปูปรุงแต่ง ปริมาณการส่งออกปูในช่วงปี พ.ศ. 2548 - 2550 เท่ากับ 8,749.44, 7,824.99 และ 12,584.89 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,164.77, 3,351.43 และ 3,725.00 ล้านบาท ตามลำดับ (กรมประมง, 2551) เมื่อความต้องการบริโภคปูทะเลเพิ่มสูงขึ้น ย่อมส่งผลทำให้ปูทะเลที่จับจากธรรมชาติมีปริมาณลดน้อยลง ดังนั้นจึงต้องมีการเพาะเลี้ยงปูทะเลเพิ่มมากขึ้น ปัญหาสำคัญที่มักพบในฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงปูทะเล ได้แก่ การขาดแคลนพันธุ์ปูทะเล จนต้องมีการนำเข้าพันธุ์ปูจากต่างประเทศ เช่น สหภาพพม่า บังคลาเทศ ปากีสถาน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบปัญหาการเกิดโรคในฟาร์มเลี้ยง จากรายงานพบว่ามีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (Davis and Sizenmore, 1982; Haryanti et al., 2003) เชื้อรา (Boeger et al., 2005) ไวรัส (Weng et al., 2007) และปรสิต (Meyers et al., 1987; Field and Appleton, 1995) จึงทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปูประสบกับความเสียหายในเชิงธุรกิจ และจากการรายงานของ Salaenoi et al. (2006) พบปูทะเลที่มีลักษณะผิดปกติ คือมีสีแดงบริเวณอก ท้อง ข้อต่อและก้าม กระดองไม่แข็งเหมือนปูปกติ กล้ามเนื้อหลวมโพรก ตับและเหงือกมีสีซีด ส่วนเลือดมีสีขาวขุ่นและไม่แข็งตัว หลังจากนั้นปูจะตายลงในเวลาอันรวดเร็ว ดังนั้นจึงทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปูต้องประสบกับความขาดทุน

รูปแบบการเลี้ยงปูทะเลในประเทศไทยส่วนใหญ่แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะคือ การเลี้ยงปูขุน มีรูปแบบการเลี้ยงตามธรรมชาติ โดยปล่อยให้ปูอาศัยอยู่รวมกันภายในบ่อดินที่มีพื้นเป็นโคลน เพื่อให้ปูสามารถหลบตัวได้เพื่อป้องกันการกินกันเอง ถัดมาคือการเลี้ยงปูนิ่ม ซึ่งเป็นการเลี้ยงปูที่มีกระดองแข็งให้เป็นปูที่มีกระดองนิ่มโดยนำปูใส่ตะกร้าพลาสติกซึ่งผูกติดกับท่อพลาสติกในลักษณะลอยเป็นแพในบ่อ ซึ่งมีทั้งการเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์และในบ่อดิน และสุดท้ายเป็นการเลี้ยงปูร่วมกับการเลี้ยงกุ้งทะเล โดยปล่อยให้ทั้งกุ้งและปูอาศัยอยู่ร่วมกัน ซึ่งบริเวณที่ทำการเลี้ยงปูส่วนใหญ่เป็นบริเวณป่าชายเลน ปากแม่น้ำ หรือบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึง ในบางบริเวณที่เลี้ยงปู เกษตรกรมีการเปิดประตูให้น้ำจากภายนอกไหลเข้าสู่ภายในบ่อเลี้ยงโดยไม่มีการฆ่าเชื้อภายในบ่อ ทำให้ธาตุอาหาร สารเคมีหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีขนาดเล็กรวมทั้งจุลชีพชนิดต่างๆ ไหลปะปนมากับน้ำเข้ามาในบ่ออาจส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายของปูได้ นอกจากนี้ในการเลี้ยงปูทะเล ยังไม่มีแหล่งเพาะพันธุ์ที่สามารถผลิตลูกพันธุ์ปูให้เพียงพอต่อความต้องการการนำมาเลี้ยงได้ เนื่องจากลูกปูจะมีอัตราการตายสูงในช่วงการอนุบาล นอกจากนี้เมื่อปูที่เลี้ยงมีขนาดโตขึ้นก็มีการจับขายจนหมด มิได้มีการเก็บไว้ทำพ่อแม่พันธุ์ และด้วยธรรมชาติของปูซึ่งเป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมก้าวร้าว ชอบต่อสู้กัน จึงไม่สามารถอนุบาลลูกปูวัยอ่อนได้ ดังนั้นปูที่เลี้ยงเป็นการนำลูกพันธุ์ที่ได้จากการจับจากธรรมชาติเป็นหลัก ซึ่งแตกต่างจากเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงแบบครบวงจรที่สามารถคัดสายพันธุ์จนได้สายพันธุ์ทนทานต่อโรคได้ ในการเลี้ยงปูจึงไม่สามารถควบคุมระบบการเพาะเลี้ยงได้อย่างในกุ้ง จากการที่คณะผู้วิจัยได้สำรวจปูในฟาร์มเลี้ยงพบปูที่มีอาการผิดปกติไปจากปูทั่วไป ดังนั้นจึงเกิดความสนใจในการศึกษาอาการผิดปกติ เนื่องจากอาการดังกล่าวก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก รวมทั้งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับอาการผิดปกติในปูทะเลในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อจักเป็นข้อมูลพื้นฐานอันอาจนำไปสู่การวินิจฉัยและหาวิธีป้องกันโรคที่จะเกิดในฟาร์มเลี้ยงปูของเกษตรกรได้ต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาลักษณะของปูทะเลที่มีอาการผิดปกติ

เก็บตัวอย่างปูทะเลจำนวน 100 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงปูในจังหวัดสมุทรสงคราม และจันทบุรี เพื่อนำมาสังเกตลักษณะภายนอกของตัวปู ได้แก่ สีของกระดอง รยางค์ขาเดิน เป็นต้น สังเกตพฤติกรรมเมื่อปูถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า และเจาะเลือด (haemolymph) เพื่อดูสีเลือด โดยใช้สีเลือดเป็นเกณฑ์ในการจัดแบ่งกลุ่มปู ปูที่มีสีเลือดเหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสามารถแบ่งปูออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มเลือดใส กลุ่มเลือดส้มใส กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาเย็น และกลุ่มเลือดสีขาวคล้ายน้ำนม จากนั้นทำความสะอาดบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ด้วย 70% ethanol แล้วใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 ซึ่งทำให้ชุ่มด้วย 10% trisodium citrate (เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด) เจาะเลือดปูบริเวณขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ตามวิธีการของ Salaenoi et al. (2006) เก็บตัวอย่างเลือดปูใส่ในหลอดทดลองจากนั้นนำเลือดมาตรวจหาระยะเวลาในการแข็งตัวของเลือด ก่อนเก็บอวัยวะภายในให้นำปูแช่ในน้ำที่เย็นจัดเป็นเวลาประมาณ 1 นาทีเพื่อให้ปูสลบแล้วซับตัวปูให้แห้งด้วยผ้าที่สะอาด จากนั้นเปิดกระดองปูออกเพื่อตรวจสอบอวัยวะภายในได้แก่ ความคงรูปของเหงือก (gill) ตับ (hepatopancreas) กล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อใต้กระดอง (integument) แล้วจึงเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปูทะเลที่มีอาการผิดปกติ

ตัวอย่างปูทะเลที่แยกออกเป็นกลุ่มต่างๆ ถูกนำมาเขี่ยเชื้อจากอวัยวะที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ตับ หัวใจ กล้ามเนื้อ เหงือก และเลือด ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic technique) ลงบนอาหาร TSA (Triptic Soy Agar) ที่เติม 1.5% NaCl ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีเดี่ยวๆ และมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันก่อนถ่ายเชื้อลงบน TSA พร้อมทั้งเขียนรหัสเชื้อกำกับไว้ เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลปกติและปูทะเลที่มีอาการท้องแดงจะถูกจำแนกโดยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี การย้อมแกรม การเจริญบนอาหารที่เฉพาะเจาะจง ได้แก่ TCBS และ Macconkey เป็นต้น และสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อตรวจสอบโดยใช้ชุดทดสอบ API 20E

ผลการศึกษาและวิจารณ์

สภาพแวดล้อมภายในฟาร์มเลี้ยงปู

ตัวอย่างปูทะเลเก็บจากฟาร์มเลี้ยงปูทะเลในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 2 ฟาร์ม และอำเภอคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 2 ฟาร์ม โดยฟาร์มตั้งอยู่ในพื้นที่บริเวณป่าชายเลนซึ่งเป็นเขตน้ำกร่อยจนถึงน้ำเค็ม ซึ่งมีรูปแบบการเลี้ยง 2 แบบ คือ การเลี้ยงปูนิ่มและการเลี้ยงปูขุน โดยการเลี้ยงปูเพื่อทำเป็นปูนิ่มจะเลี้ยงในตะกร้าพลาสติกซึ่งอยู่ในบ่อดินที่มีความลึกของระดับน้ำไม่เกิน 2 เมตร ตะกร้าพลาสติกสำหรับเลี้ยงปูถูกมัดติดกันเป็นแพยึดอยู่บนเสาไม้ ซึ่งตะกร้าพลาสติกทำด้วยโพลีเอธิลีนขนาด 23x26x20 ซม. ภายในตะกร้าบรรจุปูตะกร้าละ 1 ตัว โดยตะกร้าที่เลี้ยงปูส่วนหนึ่งจะจมอยู่ในน้ำประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงของตะกร้า ปูที่ปล่อยลงเลี้ยงในตะกร้าเป็นปูกระดองแข็ง และมีการให้ปลาสับเป็นอาหาร วันละครั้ง ซึ่งระยะเวลาในการเลี้ยงปูกระดองแข็งเพื่อให้ลอกคราบเป็นปูนิ่มใช้เวลาไม่เกิน 30 วัน ส่วนการเลี้ยงปูขุนเป็นการปล่อยปูลงเลี้ยงในบ่อดินที่มีลักษณะเป็นดินโคลนเพื่อให้ปูมีพื้นที่ในการฝังตัวสำหรับหลบซ่อนตัว โดยเกษตรกรปล่อยเลี้ยงตามธรรมชาติจนได้ขนาดที่ต้องการจึงจับไปจำหน่าย

ลักษณะฟาร์มเลี้ยงปูในแต่ละบริเวณพบว่ามีสภาพแวดล้อมแตกต่างกันไป บางฟาร์มอยู่ในเขตที่เป็นแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีการถ่ายเทหมุนเวียนน้ำค่อนข้างดี การจัดการฟาร์มค่อนข้างดี สะอาด จำนวนปูที่มีอาการผิดปกติพบเป็นจำนวนน้อย บางฟาร์มตั้งอยู่

ในเขตที่มีการถ่ายเทน้ำไม่ค่อยดี ทำให้เกิดการสะสมของตะไคร่น้ำเกาะอยู่ตามตัวปู ตะกร้าพลาสติกสำหรับเลี้ยงปู และแพพลาสติก ไม่มีการจัดการขยะมูลฝอย และพบซากปูที่ตายเนื่องจากไม่ลอกคราบและปูที่มีอาการผิดปกติจำนวนมาก โดยในระหว่างการเลี้ยงเกษตรกรมีการเติมน้ำชีวภาพ (EM) เพื่อปรับสภาพน้ำภายในบ่อให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเกษตรกรยังมีการเลี้ยงปูร่วมกับการเลี้ยงกุ้งทะเลภายในบ่อเดียวกันอีกด้วย

ลักษณะของปูทะเลที่มีอาการผิดปกติ

จากการเก็บตัวอย่างปูทะเลในอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี และอำเภอคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 พบปูทะเลที่มีลักษณะแตกต่างจากปูปกติอย่างชัดเจน คือบริเวณอก ท้อง ข้อต่อ และรยางค์ขาเดินของปู มีสีเหลืองปนน้ำตาลจนถึงสีแดง อวัยวะภายในมีลักษณะไม่คงรูป เนื้อโพรก ลักษณะของกล้ามเนื้อลำตัวและกล้ามเนื้อก้ามมีสีขาวขุ่นจนถึงสีชมพูอ่อน โดยปูที่มีอาการรุนแรงขาและก้ามไม่สามารถเคลื่อนไหวได้และตายลงอย่างรวดเร็ว เลือดมีลักษณะตั้งแต่ใสจนถึงสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตามระดับความรุนแรงของอาการ คือในปู 100 ตัว แบ่งออกเป็น กลุ่มเลือดใสจำนวน 35 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-350 ก. ขนาดความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 8.7-8.94 ซม. กลุ่มเลือดส้มใส จำนวน 31 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-440 ก. ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 9.6-12.96 ซม. กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาดำเย็น จำนวน 4 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 150-260 ก. ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 8.56 - 11.05 ซม. กลุ่มเลือดส้มคล้ายสีชาเย็น จำนวน 2 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 220-230 ก. ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 9.75- 10.05 ซม. และกลุ่มเลือดขาวคล้ายน้ำนมจำนวน 1 ตัว น้ำหนัก 250 ก. ความกว้างของกระดอง 10.20 ซม. ส่วนปูปกติ จำนวน 27 ตัว น้ำหนักอยู่ในช่วง 200-250 ก. ความกว้างของกระดองอยู่ในช่วง 9.60- 10.50 ซม. ซึ่งมีรายละเอียด (Figure 1-6) ดังนี้

1. ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม 1 เลือดใสจนถึงสีฟ้าอ่อน (Figure 1) บริเวณอกและท้องมีสีเหลืองปนสีน้ำตาล รอยต่อระหว่างลำตัวและรยางค์ขาเดินมีสีน้ำตาล เมื่อมองผ่านรอยต่อระหว่างรยางค์ขาเดินกับลำตัวเห็นกล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น เมื่อเปิดกระดองออกพบว่า ตับมีเหลืองอ่อน เหงือกและหัวใจคงรูปคล้ายปูปกติ เนื้อแน่น กล้ามเนื้อลำตัว และกล้ามเนื้อขามีสีขาวขุ่นและสีชมพูอ่อน มองเห็นแนวเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน การแข็งตัวของเลือดใช้เวลา 2-3 นาที เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นปูมีการตอบสนองโดยชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว มีเคลื่อนไหวได้ดีและรวดเร็ว

2. ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม 2 เลือดสีส้มใส (Figure 2) บริเวณอกและท้องมีสีชมพู รอยต่อระหว่างลำตัวและรยางค์ขาเดินมีสีชมพู มองเห็นกล้ามเนื้อลำตัวขาวขุ่น อวัยวะภายใน เช่น ตับและหัวใจมีสีซีดกว่าปูปกติ เหงือกนิ่ม กล้ามเนื้อโพรกแต่อวัยวะภายในต่างๆ ยังคงรูปอยู่ ส่วนกล้ามเนื้อลำตัวและกล้ามเนื้อขามีสีขาวขุ่นมองเห็นแนวเส้นการเรียงตัวของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน การแข็งตัวของเลือดใช้เวลาประมาณ 6 นาที เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นปูมีการตอบสนองโดยชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว และยังสามารถเคลื่อนไหวได้ดีและรวดเร็ว

3. ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม 3 เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น (Figure 3) บริเวณอกและท้องมีสีเหลืองปนสีน้ำตาลเข้ม รอยต่อระหว่างลำตัวและรยางค์ขาเดินมีสีน้ำตาล เมื่อมองผ่านช่องระหว่างลำตัวและรยางค์ขาเดินเห็นกล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น อวัยวะภายใน เช่น ตับ หัวใจ และเหงือก พบเลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็นกระจายอยู่ทั่วอวัยวะ เหงือกนิ่มกว่าปูปกติ กล้ามเนื้อโพรกมากขึ้น การจัดเรียงเนื้อของกล้ามเนื้อมองเห็นเป็นเส้นชัดเจน กล้ามเนื้อลำตัวและกล้ามเนื้อก้ามมีสีขาวขุ่น การแข็งตัวของเลือดใช้เวลาประมาณ 13 นาที ปูยังมีการเคลื่อนไหวและมีการตอบสนองต่อสิ่งที่มากระตุ้นได้อย่างปกติ

4. ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม 4 เลือดสีส้มคล้ายสีชาเย็น (Figure 4) บริเวณอกและท้องมีสีแดงเป็นแถบๆ รยางค์ขาเดินและก้ามมีสีแดง อวัยวะภายใน เช่น ตับมีสภาพเละ หัวใจไม่คงรูป เหงือกนิ่มกว่าปกติ พบเลือดสีส้มคล้ายสีชาเย็นกระจายทั่วอวัยวะภายใน กล้ามเนื้อโพรก และเลือดไม่มีการแข็งตัวเมื่อวางทิ้งไว้ ในระยะนี้ปูเริ่มมีการตอบสนองและเคลื่อนไหวช้าลง

5. ปูทะเลที่มีอาการท้องแดงกลุ่ม 5 เลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม (Figure 5) บริเวณอกและท้องมีสีแดงปนส้ม รยางค์ขาเดินมีสีแดง ปูในระยะนี้มีอาการที่รุนแรงมากที่สุด เนื่องจากปูจะมีชีวิตอยู่ไม่เกิน 24 ชม. เมื่อเปิดกระดองออกมีเลือดสีขาวคล้ายน้ำนมกระจายอยู่ทั่วอวัยวะ กล้ามเนื้อเหลวโพรก และเลือดไม่มีการแข็งตัวเมื่อวางทิ้งไว้ ปูจะอยู่นิ่งเคลื่อนไหวช้ามากจนถึงไม่สามารถเคลื่อนไหวร่างกายได้ เมื่อสัมผัสก้านตามีการตอบสนองช้า

ส่วนปูทะเลปกติ (Figure 6) บริเวณอก ท้อง ข้อต่อและรยางค์ขาเดินมีสีขาว เลือดใส (เมื่อสัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า) เลือดแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที กล้ามเนื้อลำตัวใส เนื้อแน่น อวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ เหงือก หัวใจ สดและคงรูป เมื่อมีสิ่งมากระตุ้นปูมีการตอบสนองโดยชูก้ามขึ้นเพื่อป้องกันตัว มีเคลื่อนไหวได้ดีและรวดเร็ว

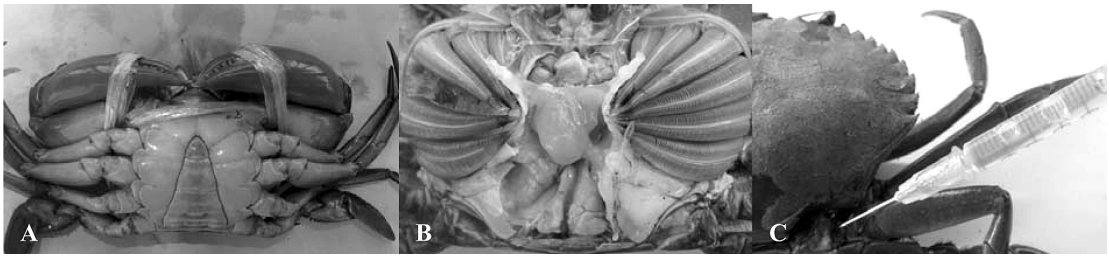

Figure 1 The abnormal mud crab group I : the infected crab with brown thoracic-abdomen (A) Showing the rigid internal organ (B) and transparent haemolymph (C).

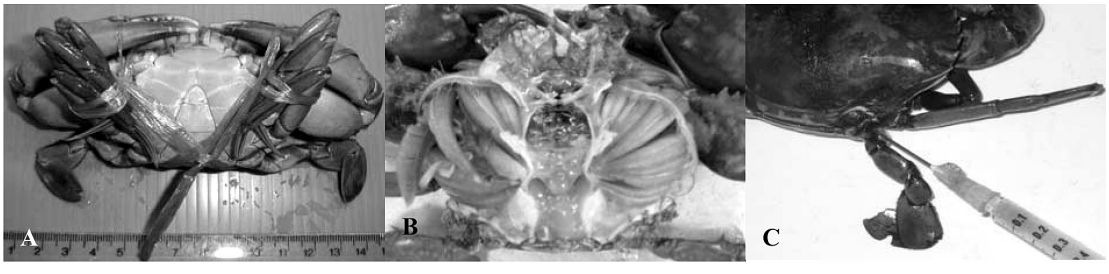

Figure 2 The abnormal mud crab group II: the infected crab with red thoracic-abdomen (A) Showing the loose gill, hepatopancreas and muscle (B) and transparency orange haemolymph (C).

Figure 3 The abnormal mud crab group III: the infected crab with brown thoracic-abdomen (A) Showing the orange loose and soft gill and muscle, pale hepatopancreas (B) and translucent brown haemolymph (C).

Figure 4 The abnormal mud crab group IV: the infected crab with red thoracic-abdomen (A) Showing the orange and soft gill, muscle and haemolymph (dispersed in all tissue) (B) and cloudy orange haemolymph (C).

Figure 5 The abnormal mud crab group V: the infected crab with orange to red thoracic-abdomen (A) Showing the white soft gill, muscle and haemolymph (dispersed in all tissue) (B) and opaque white haemolymph (C).

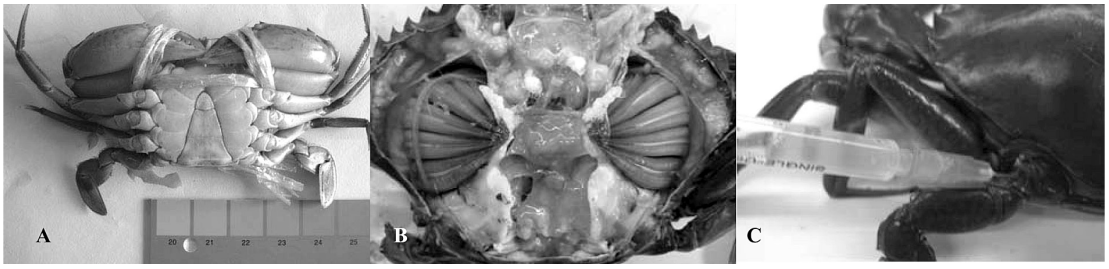

Figure 6 Characters of the normal mud crab showing white thoracic-abdomen (A) fresh and rigid internal organ (B) and transparent haemolymph (C).

ผลการศึกษาลักษณะภายนอกของปูทะเลที่มีอาการผิดปกติ ได้แก่ สีของอกและท้อง รยางค์ขาเดิน และรยางค์ก้าม พบว่ามีทั้งสีเหลืองปนน้ำตาลจนถึงสีแดง ซึ่งแตกต่างจากปูทะเลปกติที่บริเวณท้อง รยางค์ขา และรยางค์ก้ามมีสีขาว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Salaenoi et al. (2006) ที่พบว่า ปูทะเลที่มีอาการอกและท้องแดงจะมีกระดองที่มีความแข็งน้อยกว่าปูปกติ บริเวณท้อง รยางค์ก้ามและขามีสีแดง เชื่องซึม เคลื่อนไหวช้า ลอกคราบไม่ออก และตายลงในที่สุด โดยคล้ายคลึงกับอาการ pink crab disease (PCD) ที่พบในปูชนิด *Cancer pagurus* (Stentiford et al., 2002) อาการ bitter crab disease ที่พบในปูชนิด *Chionoecetes bairdi*, *Chionoecetes opilio* (Meyers et al., 1987; Taylor and Khan, 1995) และชนิด *Necora puber* (Wilhelm and Mialhe, 1996) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณรงควัตถุภายในร่างกายด้วยกระบวนการ hyperpigmentation (Stentiford *et al*., 2002) ซึ่ง Meyers et al. (1987) รายงานว่าการที่ปูมีบริเวณอก ท้อง และก้ามมีสีชมพูน่าจะมีสาเหตุมาจากมีปริมาณคาโรทีนอยด์เพิ่มสูงขึ้นบริเวณเซลล์อิพิเดอร์มิสของปูที่ได้รับความเสียหาย และยังตรวจพบปรสิตในกลุ่ม dinoflagellate ชนิด *Hematodinium* sp. อยู่ภายในเลือดและเนื้อเยื่อของปูเป็นจำนวนมาก (Stentiford et al., 2002) จากการศึกษาของ Stentiford and Shields (2005) รายงานว่าปูที่พบปรสิตอยู่ภายในตับเป็นจำนวนมากนั้นส่งผลให้ reserve inclusion cell ลดลง ซึ่ง reserve inclusion cell เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสะสมไกลโคเจน โดยไกลโคเจนนั้นมีความจำเป็นต่อการสร้างไคตินที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างภายนอกของปู (Stevenson, 1985)

จากการศึกษาลักษณะของเลือดปูทะเลที่มีอาการผิดปกติทั้ง 5 กลุ่ม พบว่าเลือดมีสีแตกต่างกันตั้งแต่ใสจึงถึงสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม โดยปกติปูทะเลมีเลือดสีใสเนื่องจากภายในเลือดของปูมีฮีโมไซยานินที่มี Cu 2 อะตอม เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่มีตำแหน่งจับกับออกซิเจน 1 โมเลกุล ซึ่งอยู่ในรูป Cu (I) (deoxygenated) แต่เมื่อสัมผัสกับอากาศกลายเป็น Cu (II) (oxygenation) จึงทำให้เลือดเปลี่ยนจากใสเป็นสีฟ้าอ่อน (Karlin *et al*., 1987; Kitajima *et al*., 1992) จากการศึกษาพบว่าปูทะเลที่มีเลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมนั้นคล้ายคลึงกับอาการที่พบในปูชนิด *Carcinus maenas* ที่เป็นโรค milky disease ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะคล้ายริกเก็ตเซียในกระแสเลือดและมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดมีจำนวนลดลง (Eddy et al., 2007) ส่วน Shields and Squyars (2000) รายงานว่าปูชนิด *Callinectes sapidus* ที่พบ *Hematodinium* ในกระแสเลือดนั้นภายใน 3 วัน จะมีจำนวนของเม็ดเลือดลดลง 48% ซึ่ง Meyers et al. (1987) พบว่าปรสิตจำนวนมากในกระแสเลือดของปูที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงมีผลทำให้เลือดมีสีครีมและไม่แข็งตัว โดยกลไกการแข็งตัว

ของเลือดอาจเกิดจากการลดลงของเม็ดเลือดชนิด hyalinocytes ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแข็งตัวของเลือด (Shields and Squyars, 2000) และยังมีผลต่อการแลกเปลี่ยนก๊าซในระบบหายใจ ทำให้การขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ร่างกายเกิดขึ้นได้ไม่ดี จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปูตายลงอย่างรวดเร็ว (Taylor et al., 1996)

นอกจากนี้ Salaenoi et al. (2006) รายงานว่าปูที่มีอาการท้องแดงที่เลือดมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ไม่พบสารฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ซึ่งฮีโมไซยานินมีหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้นเมื่อขาดฮีโมไซยานินจึงส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับออกซิเจน และการขนส่งแร่ธาตุต่างๆ ไปเลี้ยงร่างกายเกิดขึ้นได้น้อยลง จึงเป็นสาเหตุทำให้ปูตายลงอย่างรวดเร็ว เมื่อศึกษาลักษณะภายในของปูพบว่าอวัยวะภายในมีลักษณะไม่คงรูป ทั้งนี้ Salaenoi et al. (2006) พบว่าการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อ ตับ เหงือกและกล้ามเนื้ออยู่กันอย่าง หลวมๆ ซึ่งมีรายงานการพบปรสิตและแบคทีเรียในเนื้อเยื่อต่างๆ ของปูเป็นจำนวนมาก (Meyers et al.,1987; Stentiford and Shields, 2005; Eddy et al., 2007) Stentiford et al. (2002) รายงานว่าเมื่อ *Hematodinium* แพร่กระจายเข้าสู่ร่างกายปูและมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นในเซลล์ของตับและเหงือกซึ่งส่งผลทำให้ลักษณะของเนื้อเยื่อผิดปกติ โดยบริเวณกล้ามเนื้อพบกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า islands จะไปขัดขวางการยึดเกาะของเซลล์กล้ามเนื้อ ส่วนการจัดเรียงตัวของไฟบริล (fibril) บริเวณ Z-line ของกล้ามเนื้อบริเวณก้ามนั้นมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ และเกิดช่องว่างเป็นกลุ่มๆ ภายในเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวของปู หรือจากตัวปรสิต

ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบในปูทะเล

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากปูทะเลที่มีอาการท้องแดงจำนวน 4 กลุ่ม พบว่า กลุ่ม 1 เลือดใสถึงสีฟ้าอ่อน จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิดคือ *Vibrio alginolyticus* คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ พบในเลือด และเหงือก *Vibrio parahaemolyticus* คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ พบในตับ เหงือก และหัวใจ กลุ่ม 2 เลือดส้มใส จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิด คือ *Shewanella putrefaciens* คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ พบในเลือด ตับ และ *V. parahaemolyticus* คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ พบในหัวใจ กล้ามเนื้อ และเหงือก กลุ่ม 3 เลือดสีส้มคล้ายชาดำเย็น จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิด คือ *V. alginolyticus* คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ พบในทุกอวัยวะที่ศึกษา *V. parahaemolyticus* คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ พบในเหงือก เลือด และตับ และเชื้อ *S. putrefaciens* คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ พบในกล้ามเนื้อและเลือด ส่วนกลุ่ม 5 เลือดขาวขุ่นคล้ายน้ำนม จำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิดคือ *V. alginolyticus* คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ พบในหัวใจ และ *V. parahaemolyticus* คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พบในกล้ามเนื้อ **(Figure 7)** ส่วนในปูทะเลปกติพบเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *S. putrefaciens* คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พบในเลือดและตับ และเชื้อ *V. parahaemolyticus* คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ พบในกล้ามเนื้อ และเหงือก

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีดังนี้ *V. alginolyticus* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ lysine decarboxylase, indole, gelatinase, glucose, mannitol,sucrose และ amygdalin ส่วน *V. parahaemolyticus* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, indole, gelatinase, glucose และ mannitol และเชื้อ *S. putrefaciens* ให้ผลบวกต่อการทดสอบ citrate utilization, H_2S production และ gelatinase **(Table 1)**

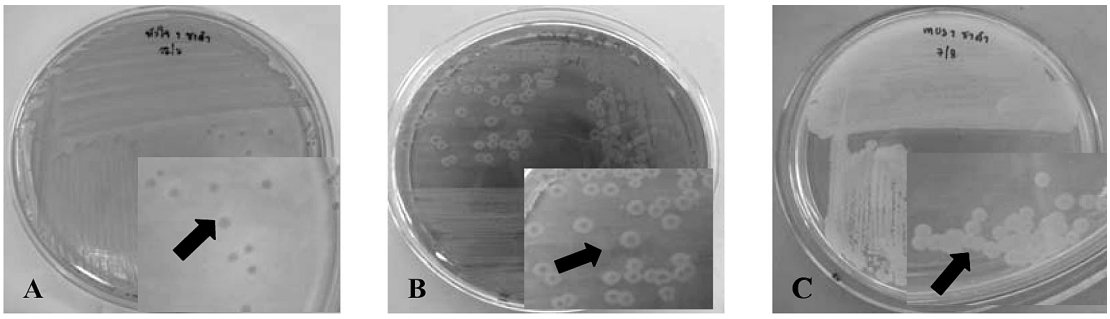

Figure 7 Bacterial colony forming on TCBS *Vibrio alginolyticus* (A) *Vibrio parahaemolytics* (B) *Shewanella putrefaciens* exposed on TSA (C).

Table 1 Biochemical characteristics for identifying bacterial groups found in abnormal crabs.

Biology	*Vibrio alginolyticus*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Shewanella putrefaciens*
Growth on TCBS	Y	G	-
β-galactosidase	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	-
Ornithine decarboxylase	-	+	-
Citrate utillization	-	-	+
H_2S production	-	-	+
Urease	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole production	+	+	-
Voges Proskauer	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Glucose	+	+	-
Mannitol	+	+	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	+	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	+	-	-
Arabinose	-	-	-

Y= Yellow , G= Green, - = negative, + = positive

จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปูทะเลที่มีอาการผิดปกติส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มวิบริโอ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นประจำในสัตว์ทะเลกลุ่มครัสเตเซีย (Davis and Sizenmore, 1982) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Sizemore et al. (1975) ที่พบเชื้อ *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Flavobacterium* sp. และ colifrom ที่แยกได้จากปูชนิด *Callinectes sapidus* ปกติ จากผลการศึกษาพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งในปูทะเลที่มีอาการผิดปกติและปูปกติ โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งทะเลและปู ซึ่งสอดคล้องกับศึกษาของ Supamattaya et al. (1998) แยกเชื้อแบคทีเรียจากปูทะเลที่เป็นโรค พบเชื้อ *Vibrio vulnificus*, V. *parahaemolyticus*, V. *splendidus* และ V. *orientalis* ซึ่งทำให้ปูทะเลมีอัตราการตาย 50-70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเกิดอาการผิดปกติในปูทะเลอาจเป็นได้ว่ามีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องที่เหนี่ยวนำให้ปูมีอาการดังกล่าวที่นอกจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว โดยปัจจัยที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้มีเกิดโรค เช่น ความหนาแน่นในการเลี้ยง (Sindermann, 1990) อุณหภูมิของน้ำ (Noga et al., 2000; Eddy et al., 2007) เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนในน้ำลดลง จึงส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซีย (Le Moullac and Haffner, 2000) นอกจากยังพบว่าภาวะโลกร้อนส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสัตว์น้ำที่อยู่ในธรรมชาติ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้จุลชีพต่างๆ สามารถเจริญเติบโตได้ดี (Harvell et al. 1999) จากการศึกษาของ Davis and Sizenmore (1982) พบว่าเชื้อ *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่พบประจำในปูทะเลและเชื้อมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน ซึ่ง Eddy et al. (2007) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายริกเก็ตเซียที่ก่อให้เกิดโรค milky disease ในปูชนิด *C. maenas* พบได้บ่อยในช่วงฤดูร้อน และจากการสำรวจฟาร์มเลี้ยงปูทะเลพบว่าในช่วงฤดูร้อนที่มีอาการร้อนจัดพบปริมาณปูทะเลที่มีอาการผิดปกติมากกว่าในช่วงฤดูอื่นๆ ส่วนเชื้อ *Shewanella putrefaciens* ที่พบในปูทะเลที่มีอาการผิดปกติและปูทะเลปกติเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เข้าสู่ตัวปูปกติเพื่อยืนยันผลในการเกิดโรคของปูทะเลต่อไป

สรุป

จากการศึกษาลักษณะภายนอก ภายในและสีเลือดปูทะเลที่มีอาการอก-ท้องแดงที่เก็บจากจังหวัดสมุทรสงครามและจันทบุรี สามารถแบ่งกลุ่มปูออกเป็น 5 กลุ่มโดยเรียงลำดับความรุนแรงของอาการจากน้อยไปมาก คือ กลุ่มเลือดใสถึงสีฟ้าอ่อน กลุ่มส้มใส เลือดสีส้มคล้ายสีชาดำเย็น กลุ่มเลือดสีส้มคล้ายสีชาเย็น และกลุ่มเลือดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียจากตับ หัวใจ กล้ามเนื้อเหงือก และเลือด พบเชื้อ 3 ชนิด คือ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Shewanella putrefaciens* ซึ่งการตรวจสอบสาเหตุการเกิดโรคจะได้ดำเนินการต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ และทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2551. ปริมาณการส่งออกปูทะเล แหล่งข้อมูล: http://www.fisheries.go.th/foreign/doc/excel/totalexport1n.xls. ค้นเมื่อ 25 กรกฎาคม พ.ศ. 2551.

Boeger, W.A., M.R. Pie, A. Ostrensky, and L. Patella. 2005. A new shell disease in the mud crab *Scylla serrata* from Port Curtis, Queenland (Australia). Dis. Aquat. Org. 43:233-239.

Davis, J.W., and R.K. Sizemore. 1982. Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1092-1097.

Eddy, F., A. Powell, S. Gregory, L.M. Nunan, G.V. Lightner, P.J. Dyson, A.F. Rowley, and R. J. Shields. 2007. A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas*- molecular pathology and epidemiology. Microbiology 153: 2839-2849.

Field, R.H. and P.L. Appleton. 1995. A Hematodinium-like dinoflagellate infection of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*: observations on pathology and progression of infection. Dis. Aquat. Org. 22:115-128.

Harvell C. D., Kim K., Burkholder J. M., Colwell R. R., Epstein P. R., Grimes D. J., Hofmann E. E., Lipp E. K., Osterhaus A. D. M. E., Overstreet R. M., Porter J. W., Smith G. W. and Vasta G. R. 1999. Emerging Marine Diseases-Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science* 285: 1505-1510.

Haryanti, K. Sugama, and T. Nishijima. 2003. Diversity of bacterial isolated from crustacea larvae and their rearing water. J. Ocean Univ. Qingdao. 2:49-52.

Karlin, K.D., R.W. Cruse, Y. Gultneh, A. Farooq, J.C. Hayes and J. Zubieta. 1987. Dioxygen-copper reactivity. Reversible binding of O2 and CO to phenoxo-bridged dicopper (I) complex. J. Am. Chem. Soc. 109: 2668-2679.

Kitajima, N., K. Fujisawa, C. Fujimoto, Y. Morooka, S. Hashimoto, T. Kitagawal, K. Toriumi, L. Tatsumi and A. Nakamura. 1992. A new model for dioxygen binding in hemocynin. Synthesis, characterization and molecular structure of the u-n2:n2 peroxo dinuclear copper (II) complexes, [cu(HB(3,5-R2pz)3]2 (O2)(R= isopropyl and Ph). J. Am. Chem. Soc. 114: 1277-1291.

Le Moullac, G., and P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. Aquaculture 191:121-132.

Meyers, T.R., T.M. Koeneman, C. Botelho, and S. Short. 1987. Bitter crab disease: a fatal dinoflagellate infection and marketing problem for Alaska Tanner crabs *Chionoecetes bairdi*. Dis. Aquat. Org. 3:195-216.

Noga, E.J., R. Smolowitz, and L.H. Khoo. 2000. Pathology of shell disease in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, (Decapoda: Portunidae). J. Fish Dis. 23: 389-399.

Salaenoi, J., A. Sangcharoen, A. Thongpan, and M. Mingmuang. 2006. Morphology and haemolymph composition changes in red sternum mud crab (*Scylla serrata*). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 40:158-166.

Shield, J.D., and C.M. Squyars. 2000. Mortality and hematology of blue crab, *Callinectes sapidus*, experimentally infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezi*. Fish. Bull. 98: 139-152.

Stentiford, G. D., M. Green, K. Bateman, H.J. Small, D.M. Neil, and S.W. Feist. 2002. Infection by a *Hematodinium*-like parasitic dinoflagellate causes pink crab disease (PCD) in the edible crab *Cancer pagurus*. J. Invertebr. Pathol. 79:179-191.

_____, and J. D. Shields. 2005. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infection in marine crustaceans. Dis. Aquat. Org. 66:47-70.

Sindermann, C.J. 1990. Principal disease of marine fish and shellfish. vol. 2. Academic Press, New York, 521 p.

Sizemore, R.K., R.R. Colwell, H.S. Tubiash, and T.E. Lovelace. 1975. Bacteria flora of the hemolymph of the blue , *Callinectes sapidus*: numerical taxonomy. Appl. Microbiol. 29:393-399.

Stevenson, J.R. 1985. Dynamic of the integument, pp. 1-42. *In* D.E. Bliss and L.H. Mantel, eds. The Biology of Crustacean: Integument, Pigment, and Homoral Processes. Academic Press, Orlando, Florida.

Supamattaya, K., R.W. Hoffmann, S. Boonyaratpalin and P. Kenehshcphem. 1998. Experiment al transmission of white spot Syndrome. Virus (wssvl) from black tiger shrimp. *Penaeus monodon* to the sand Crab *Portunus pelagicus,* mud Crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. Dis. Aquat. Org. 32:79-85 .

Taylor, D.M., and R.A. Khan. 1995. Observations on the Occurrence of *Hematodinium* sp. (Dinoflagellate: Syndinidae), the causative agent of bitter crab disease in Newfoundland snow crab (*Chionoecetes opilio*). J. Invertebr. Pathol. 65:283-288.

Taylor, A.C., R.H. Field, and P.J. Parslow-Williams. 1996. The effects of *Hematodinium* sp.-infection on aspects of the respiratory physiology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 207:217-228.

Weng, S.P., Z.X. Guo, J.J. Sun, S.M. Chan, and J.-G. He. 2007. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China. J. Fish Dis. 30:133-139.

Wilhelm, G., and E. Mialhe. 1996. Dinoflagellate infection associated with the decline of *Necora puber* crab populations in France. Dis. Aquat. Org. 26:213-219.