



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง	ชีววิทยาประมง
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Baculo-like Virus (BLV) และ Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

Relationship between Prevalence of Baculo-like Virus (BLV) and Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) in Hepatopancreas of Broodstocks on Growth and Survival Rate of Farm-reared Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

นามผู้วิจัย นางสาวเกศินี หลายสุทธีสาร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
 (..... รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
 (..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
 (..... อาจารย์เต็มดวง สมศิริ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา
 (..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
 (..... รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Baculo-like Virus (BLV) และ Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

Relationship between Prevalence of Baculo-like Virus (BLV) and Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) in Hepatopancreas of Broodstocks on Growth and Survival Rate of Farm-reared Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

โดย

นางสาวเกศินี หลายสุทธิสาร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

พ.ศ. 2552

เกศินี หลายสุทธิสาร 2552: ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Baculo-like Virus (BLV) และ Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่อการเจริญเติบโต และ อัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D. 173 หน้า

การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ระยะโพสลาว่า พบไวรัสในนิวเคลียสของเซลล์บุผิวของตับและตับอ่อน (hepatopancreas) 2 ชนิด ชนิดแรก คือ baculo-like virus (BLV) สังเกตจากนิวเคลียสมีขนาดใหญ่เต็มเซลล์ ทำให้เห็น nucleoli ที่ขบอบ และ inclusion bodies ติดสีแดงของอีโอซิน ผลการศึกษาโดย transmission electron microscope (TEM) ในตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อพบอนุภาคของไวรัสมีขนาด 250-300 นาโนเมตร ไวรัสชนิดที่สองคือ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) สามารถสังเกตุได้ง่ายโดยพบ inclusions ลักษณะกลมในนิวเคลียส ในเซลล์ของตับและตับอ่อน การศึกษาโดย TEM ในตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อ HPLV พบอนุภาคของไวรัสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-24 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามผลการศึกษาโดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ให้ผลเป็นลบกับ hepatopancreatic parvovirus (HPV) และ monodon baculovirus (MBV) ที่เคยมีรายงานในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก HPV และ MBV

การศึกษาอัตราการรอดตายของลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV (อัตราการติดเชื้อ BLV, HPLV และ BLV ร่วมกับ HPLV เท่ากับ 40, 20 และ 10%) และแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัส หลังจากอนุบาลนาน 25 วัน พบว่าลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 72 ± 2.0 % สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับอัตราการรอดตายของลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีค่า 63 ± 1.0 % การศึกษาผลการติดเชื้อ BLV และ HPLV ต่ออัตราการตายหรือการเจริญเติบโตซ้ำในกุ้งก้ามกราม นำลูกกุ้งก้ามกรามระยะคว่ำ 2 กลุ่ม (กลุ่มแรกปลอดเชื้อไวรัส กลุ่มที่สองพบการติดเชื้อ BLV 20%, HPLV 50% และ BLV ร่วมกับ HPLV 10%) มาเลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 180 วันทำการเก็บตัวอย่างกุ้งแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างกุ้ง 2 ขนาดคือขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ ผลการศึกษาพบว่าปริมาณผลผลิตและอัตราการรอดตายของกุ้งกลุ่มที่ปลอดเชื้อไวรัสเท่ากับ 202.55 ± 0.78 กิโลกรัมต่อไร่ และ 63.49 ± 0.35 % ตามลำดับ แตกต่างกับกลุ่มที่พบการติดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV ซึ่งมีปริมาณผลผลิตและอัตราการรอดตายเท่ากับ 198.25 ± 1.22 กิโลกรัมต่อไร่ และ 68.43 ± 0.76 % สำหรับการติดเชื้อของกุ้งในกลุ่มนี้ที่เวลา 60 และ 120 วัน พบการติดเชื้อ BLV ในกุ้งขนาดเล็ก (15 และ 12.5%) สูงกว่าในกุ้งขนาดใหญ่ (10 และ 5%) พบการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV ในกุ้งขนาดเล็ก 15 และ 5% ในขณะที่กุ้งขนาดใหญ่พบ 10 และ 2.5% อย่างไรก็ตามตั้งแต่วันที่ 150 ไม่พบการติดเชื้อ BLV ในกุ้งทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ตรงข้ามกับการติดเชื้อ HPLV ซึ่งพบในกุ้งตลอดระยะเวลาการเลี้ยงโดยอัตราการติดเชื้อ HPLV ในกุ้งขนาดเล็กที่ระยะเวลา 120, 150 และ 180 เท่ากับ 22.5, 15.0 และ 12.5% ตามลำดับ ใกล้เคียงกับในกุ้งขนาดใหญ่คือ 20.0, 12.5 และ 12.5% ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการติดเชื้อ BLV และ HPLV ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง และอาจจะไม่มีผลกระทบต่อผลผลิต นอกจากนี้ยังมีการสำรวจการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในแม่พันธุ์และลูกกุ้งก้ามกรามจากโรงเพาะฟัก 5 แห่ง ในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และจันทบุรี ด้วย

Kesinee Laisutisan 2009: Relationship between Prevalence of Baculo-like Virus (BLV) and Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) in Hepatopancreas of Broodstocks on Growth and Survival Rate of Farm-reared Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). Doctor of Philosophy (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 173 pages.

Histopathological examination of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) postlarvae (PL) revealed two types of viral infections in nuclei of hepatopancreatic (HP) tubular epithelium. Histologically, the first pathogen was a baculo-like virus (BLV), recognized by the presence of enlarged nuclei with marginated nucleoli and eosinophilic inclusions that completely filled the nucleus of the HP tubular epithelium. Transmission electron microscopy (TEM) of infected HPs revealed the presence of BLV particles of approximately 250-300 nm in enlarged nuclei. The second virus was a hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV). Spherical intranuclear inclusions were easily observed in the HP tubular epithelium. TEM of infected HPs revealed intranuclear inclusions containing small virus-like particles of approximately 20-24 nm in diameter. However, polymerase chain reaction tests for shrimp hepatopancreatic parvovirus (HPV) and monodon baculovirus (MBV) previously reported from Thailand were all negative suggesting that both viruses in this study were genetically distinct from HPV and MBV.

The PL from the broodstocks of *M. rosenbergii* in which no virus was detected and the PL from broodstocks which tested positive for BLV, HPLV and dual infections (BLV 40%, HPLV 20% and dual infections 10%) were raised in nursery tanks with three replicates for 25 days. Results showed that the average survival rate of prawn from the virus free group of $72 \pm 2.0\%$ was statistically higher ($P < 0.05$) than the $63 \pm 1.0\%$ from the group that was infected with these viruses. To determine whether BLV and HPLV were related to prawn mortalities or growth retardation in cultured *M. rosenbergii*, both groups of PL (Group 1 virus free Group 2 infected with BLV 20%, HPLV 50% and dual infections 10%) were raised in earthen ponds for 180 days. The prawns were sampled and divided into small and large-sized prawns at 60, 120, 150 and 180 days for histological studies to determine the viral infections. Results showed that production and percentage survival rate of prawns from the virus-free group was 202.55 ± 0.78 kg/rai and $63.49 \pm 0.35\%$, respectively compared with 198.25 ± 1.22 kg/rai and $68.43 \pm 0.76\%$ in the group that was infected with viruses. Percentage infection rate of prawns from this group at 60 and 120 days revealed that BLV infection in the small-sized prawns (15 and 12.5%) was higher than that in the large-sized prawns (10 and 5%). There was dual infection with both viruses (15 and 5%) in small-sized prawns and (10 and 2.5%) in large-sized prawns. However, at day 150 the BLV pathogen was not observed in either size group. In contrast, the HPLV infection was found in prawns throughout the culture period. The percentage infection rates in small-sized prawns at days 120, 150 and 180 were 22.5, 15.0 and 12.5% respectively, which were similar to the large-sized prawns infection rates of 20.0, 12.5 and 12.5%, respectively. These results indicated that the infection rates of these two viruses did not increase during the culture period and that the virus infections did not affect growth in *M. rosenbergii*. A survey of *M. rosenbergii* PL and broodstocks from five hatcheries located in Petchaburi, Ratchaburi, Suphanburi, Kanchanaburi and Chanthaburi provinces were also studied.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลีมีสุวรรณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด และ ดร. เต็มดวง สมศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการปฏิบัติงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประทีกย์ ตาบทพิพย์วรรณ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณ ดร. มาลา สุพงษ์พันธ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่ให้การสนับสนุนการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองค์ และคุณเพ็ญพรรณ นวลบุญมา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบพระคุณ คุณพยุง ภัทรกุลชัย คุณประกอบ ทรัพย์ยอดแก้ว และคุณลุงโหยด ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทดลอง และตัวอย่างกุ้งที่นำมาศึกษา ขอขอบพระคุณ ดร. สุดา ตันทวนิช ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ทิมโมที วิลเลียม ฟิเกล และเจ้าหน้าที่ หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้อง ๆ ทุกคน สำหรับมิตรภาพและน้ำใจอันมีค่ายิ่ง อีกทั้งความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ข้าพเจ้าขออ้อมระลึกถึงพระคุณของ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนตลอดมา

เกศินี หลายสุทธิสาร
เมษายน 2552

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณการให้อาหารกึ่งก้ำมกรามด้วยอาหารสำเร็จรูปความหนาแน่น 80,000 ตัว/ไร่	11
2	หลักเกณฑ์มาตรฐานการขึ้นทะเบียนอาหารสำหรับกึ่งก้ำมกรามระยะวัยต่าง ๆ	12
3	คุณสมบัติของน้ำที่เหมาะสมในบ่ออนุบาลและบ่อเลี้ยงกึ่งก้ำมกราม	13
4	เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานการพบในกึ่งก้ำมกราม	29
5	สถานที่เก็บตัวอย่างลูกกึ่งและแม่พันธุ์กึ่งก้ำมกราม	35
6	ผลการตรวจการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในลูกกึ่งและแม่กึ่งก้ำมกราม โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและการตรวจโดยการย้อมสีมาลาไคท์กรีน	60
7	แสดงน้ำหนักเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยของแม่พันธุ์กึ่งก้ำมกรามที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรีและแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรี	71
8	ปริมาณการพบ HPLV และ BLV จากของแม่พันธุ์และลูกกึ่งก้ำมกรามและอัตราการรอดตายของลูกกึ่งก้ำมกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัสและติดเชื้อไวรัส	72
9	คุณภาพน้ำในการอนุบาลลูกกึ่งก้ำมกราม	89
10	ปริมาณการติดเชื้อ BLV, HPLV และการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ำมกรามที่ใช้แม่พันธุ์ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง	92
11	ปริมาณการติดเชื้อ BLV, HPLV และการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ำมกรามที่ใช้แม่พันธุ์จังหวัดจันทบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง	94
12	แสดงน้ำหนักเฉลี่ย อัตราการรอดตาย อัตราการแลกเนื้อ อัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตของกึ่งก้ำมกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (P3 และ P4) และแม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรี (C3 และ C4)	124
13	ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกึ่งก้ำมกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง	128
14	ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกึ่งก้ำมกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง	129

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	แสดงน้ำหนักและความยาวของแม่พันธุ์กึ่งกำกรมจากจากจังหวัด เพชรบุรี	157
ก2	แสดงน้ำหนักและความยาวของแม่พันธุ์กึ่งกำกรมจากจากจังหวัด จันทบุรี	158
ข1	อัตราการรอดตายของกึ่งกำกรมจากชุดที่ 1 แม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี	159
ข2	อัตราการรอดตายของกึ่งกำกรมจากชุดที่ 2 แม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรี	159
ค1	คุณสมบัติของในการอนุบาลลูกกึ่งกำกรมจากแม่พันธุ์จากจังหวัดที่ติด เชื้อ BLV และ HPLV	162
ค2	คุณสมบัติของในการอนุบาลลูกกึ่งกำกรมจากแม่พันธุ์ปลอดเชื้อ	164

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของกึ่งก้ามกราม	4
2	การพัฒนาของกึ่งก้ามกรามวัยอ่อน	6
3	แม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี (ชุดที่ 1)	39
4	แม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรี (ชุดที่ 2)	40
5	โรงเพาะฟักกึ่งก้ามกรามที่ใช้ในการศึกษา	41
6	ฉีดตัวอย่างกึ่งก้ามกรามด้วยน้ำยา Davidson's fixative เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ	42
7	Inclusion bodies ของ BLV (I) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามพบ B-cell หรือ Vacuolated cell มาก (V) (H&E)	47
8	Inclusion bodies ของ HPLV (สรชี) ติดสีแดงของอีโอซินในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่ง (H&E)	47
9	พยาธิสภาพของกล้ามเนื้อลำตัวมีลักษณะปกตินิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (Cross; C, Longitudinal; L) (H&E)	48
10	พยาธิสภาพของเหงือกที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) มี hemocyte (H) บริเวณที่มีการอักเสบเริ่มแรก (E) (H&E)	49
11	ภาพจาก semi-thin section ย้อมด้วย toluidine blue พบ inclusion bodies ของ BLV (สรชี) ลักษณะเต็มเซลล์ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกราม	51
12	อนุภาคไวรัสของ BLV ขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 70-75 นาโนเมตร (สรชี) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกราม	51
13	Semi-thin section ย้อมด้วย toluidine blue พบ inclusion bodies (สรชี) ของ HPLV นิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ	52
14	อนุภาคไวรัสของ HPLV ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-24 นาโนเมตร ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกราม (สรชี)	53
15	Inclusion bodies ของ BLV (สรชี) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามโดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	Inclusion bodies ของ HPLV และนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ (ครีซึ) จากการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน	55
17	ผลการทดสอบการติดเชื้อ hepatopancreatic parvo virus (HPV) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	56
18	ผลการทดสอบการติดเชื้อ monodon baculovirus (MBV) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	57
19	Inclusion bodies มีลักษณะเต็มเซลล์ของตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามอายุ 10 วัน จากเพชรบุรี (H&E)	62
20	Inclusion bodies ของ BLV (ครีซึ) ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกุ้งอายุ 34 วัน จากเพชรบุรี (H&E)	62
21	Inclusion body ของ HPLV ในระยะเริ่มต้น (E) ระยะกำลังพัฒนา (D) และระยะพัฒนาเต็มที่ (I) (H&E)	63
22	Inclusion bodies (ครีซึ) ของ HPLV ติดสีแดงของอีโอซินในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกุ้งอายุ 22 วัน จากราชบุรี (H&E)	64
23	ลูกกุ้งก้ามกรามอายุ 10 วันจากสุพรรณบุรีตับและตับอ่อนมีขนาดเล็กลง (atrophy) (ครีสีเหลือง) เม็ดไขมันมีปริมาณน้อยมากสังเกตจากช่องว่างในเซลล์ตับแต่ช่องว่างในท่อตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (ครีสีดำ) (H&E)	64
24	ตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสุพรรณบุรีพบการเกิด melanization (H&E)	65
25	โปรโตซัว <i>Epistylis</i> sp (ครีซึ) ที่พบบริเวณเหงือกของลูกกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสุพรรณบุรี (H&E)	66
26	ลูกกุ้งก้ามกรามบางตัวจาก จังหวัดสุพรรณบุรี ตับและตับอ่อนสมบูรณ์มีเม็ดไขมันจำนวนมาก (L) และพบลักษณะคล้ายกับกลุ่มของแบคทีเรียอยู่ในท่อของตับและตับอ่อน (B) (H&E)	66
27	ตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสุพรรณบุรีสมบูรณ์ดีมีเม็ดไขมันจำนวนมาก (ครีซึ) (H&E)	67

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	ลักษณะคล้ายกับกลุ่มของแบคทีเรียในท่อของตับและตับอ่อน (ครีซี) จากลูกกึ่งอายุ 11 วันจากจังหวัดกาญจนบุรี (H&E)	67
29	Microsporidian (ครีซี) ภายในเซลล์ตับและตับอ่อนในลูกกึ่งก้ามกรามอายุ 26 วันจากจังหวัดกาญจนบุรี (H&E)	68
30	เซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามจากจังหวัดกาญจนบุรี มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย (M) (H&E)	68
31	Inclusion body ของ HPLV (ครีซี) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามจากเพชรบุรี โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน	69
32	Inclusion bodies ของ HPLV (ครีซี) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามจากเพชรบุรีโดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน	69
33	Inclusion bodies ของ BLV (ครีซี) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามจากเพชรบุรีโดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน	70
34	Inclusion body (I) ของ BLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)	73
35	Inclusion bodies (I) ของ HPLV และมีเซลล์เม็ดเลือด (H) แทรกระหว่างท่อตับและตับอ่อนจากแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	74
36	ตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรีแสดงลักษณะปกติ พบปริมาณไขมันจำนวนมาก (ลูกศรขาว) นิวเคลียสของเซลล์ (nucleolus; N) (H&E)	75
37	แสดงลักษณะของตับและตับอ่อนของลูกกึ่ง จากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีเซลล์ตับและตับอ่อนตายเป็นจำนวนมาก (severe necrosis) เกิด vacuole (V) แสดงถึงการเกิด กระบวนการ phagocytosis มีเม็ดเลือดแทรกระหว่างท่อตับและตับอ่อน (interstitial hemocyte;H) (H&E)	76
38	แสดงลักษณะของตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์จากที่ติดเชื้อไวรัส พบเซลล์ที่ตายหลุดออกมาในท่อตับและตับอ่อนเป็นจำนวนมาก (ครีซี) (H&E)	76

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
39	Inclusion body (I) ของ BLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)	77
40	ลักษณะของเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสบางเซลล์มีรูปร่างผิดปกติ (A) และพบ inclusion body (I) ของ HPLV (H&E)	77
41	เซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitotic figure ;M) inclusion body (I) ของ BLV และ โคโรมาตินชิดขอบของเซลล์ (C) (H&E)	78
42	เซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสพบการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย (M) (H&E)	78
43	Inclusion bodies (I) ของ BLV และเกิด vacuole (vacuolization; V) เป็นจำนวนมากของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)	79
44	Inclusion bodies (สรชี) ของ HPLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)	80
45	การติดเชื้อ HPLV (P) ร่วมกับการติดเชื้อ BLV (B) ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)	81
46	ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามที่ได้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรีมีปริมาณไขมันจำนวนมาก (H&E)	82
47	ภาพจาก semi-thin section ย้อมด้วย toluidine blue พบการติดเชื้อ BLV (B) ร่วมกับการติดเชื้อ HPLV (P) ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกราม	83
48	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบอนุภาคไวรัสขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 70-75 นาโนเมตรของ BLV ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกราม	84
49	อนุภาคไวรัสของ HPLV ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-24 นาโนเมตร ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกราม	85

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
50	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ BLV (A), HPLV (B) และการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV (C) ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรี	93
51	บ่อดินขนาด 3 ไร่ สำหรับลูกกึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ (A) และบ่อดินขนาด 3 ไร่ สำหรับลูกกึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (B) มีเครื่องให้อากาศแบบใบพัดตีน้ำแขนยาว 1 เครื่อง	95
52	กึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรี พบมี <i>Epistylis</i> sp. เกาะบริเวณยางค้เป็นจำนวนมาก	96
53	กึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีบางตัวแผ่นปิดเหงือกกร่อน	96
54	กึ่งก้ามกรามพ่อแม่พันธุ์ติดเชื้อ ไวร้สบางตัวพบเปลือกกลมหัวมีสีดำ (A) เมื่อเปิดเปลือกออกพบคราบสีดำเกาะด้านในของเปลือก (B)	97
55	ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวร้สจากจังหวัดเพชรบุรี พบ inclusion bodies (I) ของ HPLV และมีเซลล์ปกติ (N) (H&E)	98
56	Inclusion bodies (สรชี้) ของ HPLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ (H&E)	99
57	Intranuclear inclusion (สรชี้) ของ HPLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวร้สจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	100
58	Intranuclear inclusion (I) และ inclusion body ของ HPLV ในระยะเริ่มต้น (early stage) ในเซลล์ตับและตับอ่อน มีการติดเชื้อ microsporidian (Sp) ร่วมด้วย และพบมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis (Mi) (H&E) จากตัวอย่างกึ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวร้สทั้ง 2 ชนิด จากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	101
59	กึ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวร้สจากจังหวัดเพชรบุรี มีของเซลล์ตับและตับอ่อนบางส่วนตาย (pyknotic nuclei: P) (H&E)	102
60	ลักษณะของ microsporidian (Sp) ที่พบในเซลล์ตับและตับอ่อนซึ่งมีรูปร่างผิดไปจากปกติ (A) ในกึ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวร้สจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	102

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
61	เซลล์ดับและดับอ่อนที่ตาย (necrosis; N) และมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitotic figure; mi) ในกึ่งกำมกรามขนาดเล็กที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	103
62	R-cell (R) จำนวนมากในเซลล์ดับและดับอ่อนและเซลล์ที่ตาย (pyknosis;P) ในกึ่งกำมกรามที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	104
63	ปริมาณเม็ดไขมันมากในเซลล์ดับและดับอ่อนในกึ่งกำมกรามที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	105
64	ลักษณะของท่อดับและดับอ่อนที่ฝ่อ (atrophy tubule) ของเซลล์ดับและดับอ่อน และพบเซลล์ตาย (ครซี) จำนวนมากในกึ่งกำมกรามขนาดเล็กที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ ไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)	105
65	การเกิด nodule formation มีเซลล์เม็ดเลือดห้อมล้อมเซลล์ดับและดับอ่อนที่ตาย จากตัวอย่างกึ่งที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	106
66	ท่อดับและดับอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรง เกิดกระบวนการ melanization ในตัวอย่างกึ่งที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	107
67	การเกิด melanization ในเซลล์ดับและดับอ่อน ในตัวอย่างกึ่งที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	108
68	การเกิด melanization ในเซลล์ดับและดับอ่อน มีเม็ดเลือดห้อมล้อมเซลล์ที่ตาย (hemocyte infiltration) ในตัวอย่างกึ่งที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	109
69	ลักษณะของ spheroid (S) ในดับและดับอ่อนของกึ่งกำมกรามที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	110
70	ลักษณะของ spheroid (S) แทรกระหว่างดับและดับอ่อนของกึ่งกำมกรามที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	111
71	การเกิด spheroid (ครซี) แทรกระหว่างดับและดับอ่อนของกำมกรามที่ไ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	112

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
72	พยาธิสภาพของเหงือกมีของเหลวภายใน (L) และเกิด hyperplasia (Hy) ของ epithelial cells ในตัวอย่างใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	113
73	บริเวณเหงือกจะมีโปรโตซัว <i>Epistylis</i> sp. (สรชี) จำนวนมาก ตัวอย่างกึ่งที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	114
74	ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV จากจังหวัดเพชรบุรีพบปริมาณ R-Cell จำนวนมาก (สรชี) (H&E)	115
75	ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามพบปริมาณ B-Cell จำนวนมาก (สรชี) จากตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	116
76	เซลล์เม็ดเลือด (สรชี) จำนวนมากแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่างท่อตับและตับอ่อนจากตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	116
77	เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes; H) ห่อมล้อมเซลล์ที่ตาย (necrotic cell; N) ระหว่างท่อตับและตับอ่อนจากตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	117
78	ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามขนาดใหญ่พบปริมาณ R-Cell จำนวนมาก (สรชี) ในกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV จากจังหวัดจันทบุรี (H&E)	118
79	การเกิด nodule formation มีเซลล์เม็ดเลือดห่อมล้อมเซลล์ตับและตับอ่อนที่ตายในกึ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	119
80	การเกิด melanization ในเซลล์ตับและตับอ่อนในกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	120
81	พยาธิสภาพของเหงือกพบมีของเหลวอยู่ภายใน (L) ในกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	121
82	พยาธิสภาพของเหงือกมีเซลล์เม็ดเลือด (H) บริเวณที่มีของเหลวภายใน (L) ของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)	122
83	การจับกึ่งก้ามกราม	125
84	กึ่งก้ามกรามเพศผู้ (A) กึ่งก้ามกรามเพศเมีย (B)	126

ความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Baculo-like Virus (BLV) และ Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

Relationship between Prevalence of Baculo-like Virus (BLV) and Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPLV) in Hepatopancreas of Broodstocks on Growth and Survival Rate of Farm-reared Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

คำนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรีและกาญจนบุรี (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) นอกจากนั้นยังมีการเลี้ยงมากในบางจังหวัด เช่น สมุทรปราการและฉะเชิงเทรา รวมทั้งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่นจังหวัดกาฬสินธุ์ เป็นต้น

เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่จะเป็นแบบกึ่งพัฒนา บ่อที่เลี้ยงจึงขนาดค่อนข้างใหญ่ ประมาณ 10-30 ไร่ ในปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยมีพื้นที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามทั้งสิ้น 41,824 ไร่ ผลผลิต 15,393 ตัน สำหรับในช่วงปี พ.ศ. 2546-2549 พื้นที่การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจะมีแนวโน้มลดลง เพราะพื้นที่การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามบางส่วนเกษตรกรเปลี่ยนไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เนื่องจากกุ้งชนิดนี้ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงน้อยกว่า และกำลังเป็นที่นิยมของตลาด อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีการ พัฒนาการระบบการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มที่ดี โดยเฉพาะกรมประมงได้ส่งเสริมให้ฟาร์มเลี้ยงพัฒนาระบบการเลี้ยงเข้าสู่มาตรฐานการผลิตที่ดีขึ้น คือ Good Aquaculture Practice หรือ GAP ทำให้ผลผลิตการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไร่สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามระหว่างในปี พ.ศ. 2548-2549 การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามประสบปัญหาโรคหางขาว (white tail disease; WTD) (นิติ และคณะ, 2548; ศุภมาส, 2549; Arcier *et al.* 1999; Salin and Nair, 2003; Vijayan *et al.*, 2003; Qian *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005) โรคหางขาวนี้สร้างความเสียหายให้กับกุ้งก้ามกรามทั้งในโรงเพาะฟักและบ่อเลี้ยง ลูกกุ้ง ที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ลูกกุ้งที่ป่วยมีลักษณะกล้ามเนื้อสีขาวโดยเฉพาะบริเวณหาง (ศุภมาส, 2549; Sahul

Hameed *et al.*, 2004) สาเหตุของโรคหางขาวหรือกล้ามเนื้อขุ่นขาว เกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) และ extra small virus (*XSV*) (Qian *et al.*, 2003; Bonami *et al.*, 2005) จากการศึกษาซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของโรค WTD ใน กุ้งก้ามกรามศุภมาส (2549) พบว่านอกจากไวรัส *MrNV* และ *XSV* ซึ่งเป็น RNA ไวรัสแล้วยังพบ การติดเชื้อในเซลล์ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ซึ่ง inclusions มีลักษณะคล้ายกับ DNA ไวรัส เช่น infectious hypodermal and hem atopoietic necrosis virus (*IHHNV*) (Lightner, 1996; Flegel, 2003) และ white spot syndrome virus (*WSSV*) (Lightner, 1996) ที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้ง ทะเลอื่นๆ ซึ่งแตกต่างจากลักษณะทางพยาธิสภาพของการติดเชื้อ RNA ไวรัส เช่น *MrNV* และ *XSV* ซึ่งไม่พบ inclusion bodies ในลักษณะ Cowdry type A ในอวัยวะที่มีการติดเชื้อ แต่จะพบการ ตายของเซลล์ในลักษณะ pyknotic nuclei หรือจะพบนิวเคลียสที่แตก (karyorrhexis) เป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับที่พบ yellow-head virus (*YHV*) (ชโล, 2543) และ Taura syndrome virus (*TSV*) (Lightner *et al.*, 1995) จึงเป็นไปได้ว่าน่าจะมีไวรัสอย่างน้อยอีก 1-2 ชนิดที่พบในตับและตับอ่อน ของกุ้งก้ามกรามนอกจากที่พบ *MrNV* และ *XSV* สำหรับการศึกษาครั้งนี้อธิบายลักษณะสำคัญที่ใช้ ในการจำแนกชนิดไวรัสดังกล่าวตลอดจนความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อไวรัส ชนิดนี้ใน ระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบพัฒนาในประเทศไทยโดยข้อมูลที่ได้จะสามารถนำมาใช้เป็น ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาระบบการตรวจเชื้อไวรัสเพื่อผลิตสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ปลอด เชื้อสำหรับเกษตรกรต่อไปในอนาคต

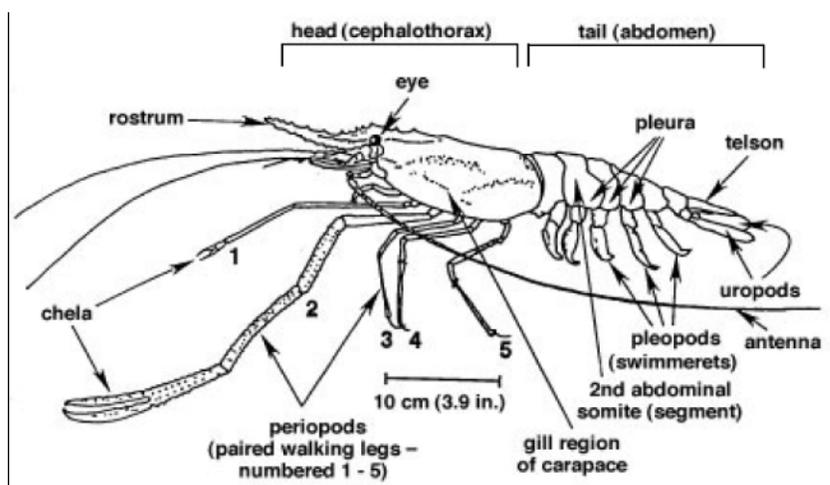
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะของไวรัส สองชนิดที่พบในตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกรมในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาการติดเชื้อ ไวรัสทั้งสองชนิด ในแม่พันธุ์และลูกกิ้งก่ามกรม
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อไวรัส ทั้งสองชนิด ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่ออัตราการรอดตายลูกกิ้งก่ามกรมในโรงเพาะฟัก
4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย และปริมาณการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด ในการเลี้ยงกิ้งก่ามกรมแบบพัฒนา

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งมีชื่อสามัญว่า giant freshwater prawn มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Macrobrachium rosenbergii* de Man กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์จำพวกกินทั้งพืชและสัตว์ หาดอาหารตามพื้นบ่อ เป็นกุ้งที่นิสัยดุร้าย ชอบขุดหลุมเพื่อสร้างอาณาเขตบริเวณพื้นบ่อ (Schroeder, 1983) ซึ่งจะใช้พลังงานส่วนใหญ่ในการแก่งแย่ง ดังนั้นในการเลี้ยงที่มีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นจะทำให้กุ้งโตช้า (Peebles, 1979; Kuris *et al.*, 1987) สำหรับกุ้งก้ามกรามที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทยซึ่งถูกพบในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา เป็นกุ้งเพศผู้ที่มีความยาว 25 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 470 กรัม (ยนต์, 2529; สมพงษ์, 2546) ลักษณะเด่นของกุ้งก้ามกราม คือ มีส่วน rostrum ที่ยาวซึ่งที่บริเวณ dorsal มีหนาม 11-14 ซี่ และที่ ventral มีหนาม (spine) 8-10 ซี่ ถือได้ว่าเป็นลักษณะของ species นี้ที่มีความสำคัญในการจัดจำแนก บริเวณส่วนปลายของ telson จะเห็นหนามชัดเจนอยู่เหนือส่วนข้างหลังของ telson (FAO, 2002)



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของกุ้งก้ามกราม

ที่มา: Louis *et al.* (1996)

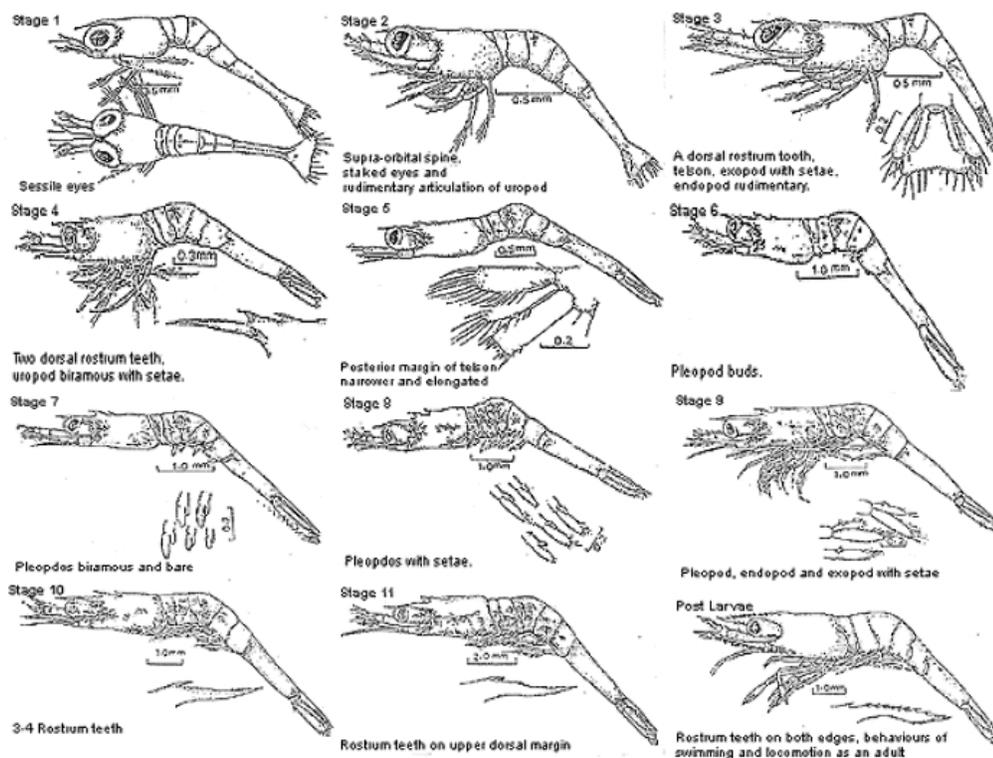
การผสมพันธุ์และการวางไข่

กิ้งก่ามสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดทั้งปี ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงจะวางไข่ในเดือนพฤษภาคม-ตุลาคม ส่วนภาคใต้กิ้งจะผสมพันธุ์และวางไข่ในระหว่างเดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์ ในช่วงเหล่านี้กิ้งที่มีขนาดความยาวลำตัว 10-12 เซนติเมตร มีอายุ 5-6 เดือนขึ้นไป จะเคลื่อนย้ายที่อยู่ของตัวเองลงมาตามแม่น้ำลำคลอง คูบริเวณน้ำกร่อยที่มีความเค็มโดยประมาณ 9-17 พีพีที ในบริเวณน้ำกร่อยนี้จะเริ่มมีการผสมพันธุ์ขึ้นหลังจากที่กิ้งตัวเมียลอกคราบเสร็จใหม่ ๆ กิ้งตัวผู้จะใช้ก้ามคู่ใหญ่ ป่ายไปตามลำตัว และส่วนหัวของกิ้งตัวเมีย เป็นการเกี่ยวพาราสิกันตามธรรมชาติของสัตว์หลังจาก นั้น กิ้งตัวเมียจะหงายท้องขึ้นและเคลื่อนตัวเข้าสู่ใต้ท้องของกิ้งตัวผู้เพื่อที่จะรับน้ำเชื้อจากกิ้งตัวผู้ น้ำเชื้อกิ้งตัวผู้จะมีสีขาวข้นติดอยู่ที่ขาเดินซึ่งมีถุงน้ำเชื้อของกิ้งตัวผู้อยู่ เมื่อน้ำเชื้อของกิ้งตัวผู้ออกมาแล้วกิ้งตัวเมื่อก็จะคว่ำตัวลงตามปกติ นับเวลาในการเกี่ยวพาราสิกันถึงระยะที่กิ้งตัวผู้ปล่อยน้ำเชื้อ ใช้ระยะเวลาประมาณ 2-3 นาที ต่อจากนี้อีก 6 ชั่วโมงไข่จากตัวเมียจะเคลื่อนที่ออกมาผสมกับน้ำเชื้อของตัวผู้ ขับออกมาติดอยู่ที่ขาเดินของตัวเมียแล้ว ไข่จะเคลื่อนที่ติดกับขนอ่อนของขาว่ายน้ำ คู่ที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยไม่หลุดไป ขาว่ายน้ำของกิ้งตัวเมียจะทำหน้าที่โบกพัดน้ำเพื่อให้ออกซิเจนกับไข่และทำความสะอาดไข่ไปในตัวด้วย ไข่ของกิ้งก่ามgram จะเจริญต่อไปเรื่อย ๆ มีการพัฒนาอวัยวะภายในไข่ครบหมดทุกอย่างจะใช้เวลาประมาณ 17-19 วัน โดยสังเกตจากสีของไข่จะเริ่มจากสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นสีเทาและสีน้ำตาลปนเทาในที่สุด ต่อจากนั้นกิ้งจะฟักไข่ออกเป็นตัวลูกกิ้งวัยอ่อนห้อยหัวลงขาว่ายน้ำ รวมตัวกันอยู่ในบริเวณที่มีแสงสว่างมาก ๆ ในช่วงนี้หากแม่กิ้งออกไปในน้ำจืดลูกกิ้งก่ามgram จะตายในเวลาต่อ มา แม่กิ้งก่ามgram สามารถวางไข่ได้ เดือนละ 2 ครั้ง จำนวนของไข่จะขึ้นกับขนาดลำตัวของพ่อแม่พันธุ์และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติของน้ำ ที่พบมากที่สุดอาจจะมีถึง 80,000-100,000 ฟอง ต่อแม่กิ้ง 1 ตัว

พัฒนาการของลูกกิ้งก่ามวัยอ่อน

การพัฒนาของลูกกิ้งก่ามวัยอ่อน แสดงไว้ในภาพที่ 2 ลูกกิ้งวัยอ่อนในระยะแรกจะว่ายน้ำรวมกันเป็นกลุ่มจนกระทั่งมีอายุ 10 วัน ลูกกิ้งวัยอ่อนต้องอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มประมาณ 10-15 พีพีที จนกว่าจะอายุจะครบประมาณ 35 วัน ถ้าลูกกิ้งวัยอ่อนอยู่ในน้ำจืดจะตายภายใน 5 วัน ลูกกิ้งวัยอ่อนจะกินอาหารตลอดเวลา อาหารของลูกกิ้งก่ามวัยอ่อน ได้แก่ ไไรแดง และไรน้ำอื่น ๆ รวมทั้งซากพืช เป็นต้น ลูกกิ้งวัยอ่อนจะมีการลอกคราบจน ครบ 11 ครั้ง

จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกุ้งวัยรุ่น ซึ่งมีลักษณะทั่วไปเหมือนพ่อแม่ และจะเปลี่ยนไปอาศัยอยู่ในเขตพื้นที่น้ำจืดต่อไป



ภาพที่ 2 การพัฒนาของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

ที่มา: Bird (1993)

สถานการณ์การผลิตกุ้งก้ามกราม

ผลผลิตกุ้งก้ามกรามในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณเพียง 28,740 ตัน และปริมาณผลผลิตปี พ.ศ. 2549 และ 2550 ปริมาณ 29,500 และ 31,000 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้น 2.64 และ 5.08 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2551 คาดว่าผลผลิตกุ้งก้ามกรามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณ 33,906 ตัน มูลค่า 4,432 ล้านบาท โดยมีอัตราการเพิ่มจากปีก่อนเล็กน้อยเพียง 6.45 และ 12.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากในปี พ.ศ. 2548-2549 กุ้งก้ามกรามประสบปัญหาโรคระบาด ทำให้เกิดความเสียหายแก่โรงเพาะฟัก

ส่งผลให้ขาดแคลนลูกกุ้ง อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามให้ประสบความสำเร็จได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจ และการดูแลเอาใจใส่ให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพ ปลอดภัยจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้บริโภคภายในประเทศและต่างประเทศมั่นใจได้ว่าคุณภาพกุ้งก้ามกรามไทยนั้นได้มาตรฐานสากล

รูปแบบการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

รูปแบบการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีตั้งแต่การเลี้ยงแบบความหนาแน่นต่ำ ปานกลาง และหนาแน่นสูง แต่ละรูปแบบมีความแตกต่างกันไปตาม ลักษณะของบ่อที่เลี้ยง และระดับความสามารถของเกษตรกร ครอบคลุมการผลิต Lee and Wickins (1992) กล่าวว่าวิธีการผลิตกุ้งก้ามกรามมีการเลี้ยงที่ระดับความหนาแน่นแตกต่างกันไป แต่อย่างไรก็ตาม คำว่าการเลี้ยงแบบความหนาแน่นต่ำ ปานกลาง และ หนาแน่นสูงมีการใช้บ่อในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามยังไม่มี ความชัดเจนมากนัก จนกระทั่ง Valenti (1998) ได้ให้มาตรฐานแต่ละระดับความหนาแน่นสำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

1. การเลี้ยงแบบความหนาแน่นต่ำ (extensive culture)

การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบความหนาแน่นต่ำ ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในบ่อเท่านั้น แต่รวมถึงในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีการกักขังสัตว์น้ำไว้อย่างมีวัตถุประสงค์ต่างๆ ตัวอย่างเช่น สร้างคอกในทะเลสาบ คลองชลประทาน อ่างเก็บน้ำ และในทุ่งนา ระบบนี้มีการใช้กุ้งวัยอ่อนหรือวัยรุ่นที่จับได้จากธรรมชาติมาเลี้ยง ความหนาแน่นต่ำ 1-4 ตัวต่อตารางเมตร โดยไม่มีการให้อาหารเพิ่มเติม กุ้งจะกินอาหารจากธรรมชาติ แต่บางครั้งอาจทำให้อาหารธรรมชาติเพิ่มขึ้นโดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ไม่มีการจัดการเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ ในบ่อกุ้งอาจจะมีปลาหรือสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่เข้ามากินกุ้งหรือแย่งอาหารของกุ้งที่เลี้ยง การเลี้ยงแบบนี้ให้ผลผลิตต่ำกว่า 80 กิโลกรัมต่อไร่ ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นที่ปล่อย และอัตราการรอดตายของลูกกุ้ง การเลี้ยงกุ้งในลักษณะเช่นนี้เหมาะสมกับบางประเทศ เช่น เวียดนาม (Lin and Lee, 1992) และ บริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน ในทวีปอเมริกาใต้ ที่มีการเลี้ยงกุ้งแบบนี้ในแม่น้ำ (Moraes-Riodades, 1999; Moraes-Riodades and Valenti, 1999)

การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในทวีปเอเชียส่วนใหญ่ เป็นการเลี้ยงโดยใช้ความหนาแน่นต่ำ (Lin and Lee, 1992) Hien *et al.* (1998) รายงานว่าในประเทศเวียดนามมีการจับสัตว์น้ำธรรมชาติ

มาซึ่งไว้ในคอกไม้ไผ่การเลี้ยงแบบนี้ว่า “การเลี้ยงแบบล้อมคอก” แต่ปัจจุบันการเลี้ยงแบบนี้ลดน้อยลงกว่าเมื่อก่อน เพราะว่ามีปริมาณกุ้งระยะวัยรุ่นที่จับจากธรรมชาติเพื่อนำมาเลี้ยงมีจำนวนลดลง และ Wang and Qianhong (1999) รายงานว่าในประเทศจีน ก็มีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในคอกเหมือนกัน ส่วนการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในทุ่งนาได้มีการเลี้ยงกันในหลายประเทศ แต่เป็นการเลี้ยงแบบผสมผสาน

2. การเลี้ยงแบบความหนาแน่นปานกลาง (semi-intensive culture)

การเลี้ยงแบบความหนาแน่นปานกลางส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงในบ่อดิน กุ้งที่ใช้ปล่อยเลี้ยงเป็นลูกกุ้งระยะโพสลาเร็วหรือระยะวัยรุ่น ที่มีอายุ 3 เดือนขึ้นไป ความหนาแน่นที่ปล่อย 4-20 ตัวต่อตารางเมตร มีการใส่ปุ๋ยเพิ่มอาหารจากธรรมชาติและทำให้อาหารเสริม ในบ่อ กุ้งส่วนใหญ่มีปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ เข้ามากินกุ้งหรือแย่งอาหารของกุ้งที่เลี้ยง มีการจัดการเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ สุขภาพลูกกุ้ง และอัตราเจริญเติบโต มากขึ้นทำให้ ผลผลิตและมูลค่าที่ได้มีหลากหลาย ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสถานที่ และระดับความสามารถในการเลี้ยง ผลผลิตที่ได้มีตั้งแต่ 80 จนถึง 800 กิโลกรัมต่อไร่

การเลี้ยงกุ้งแบบความหนาแน่นปานกลางให้ประสบความสำเร็จขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อม และความสามารถในการจัดการในระหว่างการเลี้ยง เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตให้สูงกว่าการเลี้ยงแบบธรรมชาติ (Valenti, 1998) การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่จึงเป็นแบบความหนาแน่นปานกลางในลักษณะเช่นนี้จะพบได้เกือบทั่วโลก (Lee and Wickens, 1992; Valenti, 1996, 1998)

3. การเลี้ยงแบบความหนาแน่นสูง (intensive culture)

ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงในบ่อดินขนาดเล็ก หรือบ่อคอนกรีต บ่อจะมีขนาดตั้งแต่ 1.25 ไร่ขึ้นไป ในระหว่างการเลี้ยงจะมีการเปลี่ยนน้ำ และมีการให้อาการอย่างต่อเนื่อง ความหนาแน่นที่ใช้เลี้ยงประมาณ 20 ตัวต่อตารางเมตร ผลผลิตขึ้นอยู่กับคุณภาพของอาหารที่ให้ ส่วนใหญ่อาหารที่ใช้เกษตรกรผลิตขึ้นเองเพื่อลดต้นทุนแต่จะใช้วัตถุดิบต่าง ๆ ให้มีสารอาหารเหมาะสมตามความต้องการของกุ้ง ฟังพาอาหารธรรมชาติเพียงเล็กน้อย สภาพในบ่อมีการกำจัดศัตรูกุ้งออกไป ปัจจัยทางคุณภาพน้ำทั้งหมดต้องมีการควบคุมที่แน่นอน และ ผลผลิตมากกว่า 800 กิโลกรัมต่อไร่

จากการทดลองของ Sagi *et al.* (1986) ในประเทศอิสราเอลเลี้ยงกึ่งก้ำกรมแบบ พัฒนาโดยเลี้ยงกึ่งเพศผู้เพศเมีย ได้ผลผลิตประมาณ 1,920 กิโลกรัมต่อไร่ ในขณะที่ Sebastian *et al.* (1992) เลี้ยงแบบพัฒนาในถังคอนกรีตรูปกรวยกลมในประเทศอินเดีย แต่ได้ผลผลิตไม่เกิน 560 กิโลกรัมต่อไร่

การเลี้ยงกึ่งก้ำกรมในประเทศไทย มีการปล่อยลูกกึ่งอย่างหนาแน่นประมาณ 50,000 ตัวต่อไร่ ใช้อาหารที่เกษตรกรผลิตใช้เองมีระดับโปรตีนประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีเครื่องให้อากาศทำให้มีปัญหาคุณภาพน้ำและพื้นบ่อไม่ดี กึ่งบางส่วนจะอ่อนแอและป่วยเป็นโรคทำให้มีอัตราการรอดต่ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อกึ่งป่วยเกษตรกรจะมีการใช้ยาและสารเคมีในการป้องกันโรค ส่วนใหญ่ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนาน 7-8 เดือนได้ผลผลิตประมาณ 150-200 กิโลกรัมต่อไร่ (New, 1998)

พื้นที่เลี้ยงกึ่งก้ำกรม ในปี พ.ศ. 2545 มีประมาณ 80,000 ไร่ ผลผลิตประมาณ 25,000-30,000 ตัน มีเกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งประมาณ 5,000 ราย พยุง (2546) ได้เสนอแนวทางการส่งเสริมการเลี้ยงกึ่งก้ำกรมสายพันธุ์ใหม่ เพื่อการส่งออกโดยแบ่งพื้นที่เป็นบ่อเลี้ยง 60 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่บ่ออนุบาล 10 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับบ่อพักน้ำ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยในบ่อพักน้ำมีการปล่อยลูกปลานิลไร่ละ 2,000 ตัว เลี้ยงแบบระบบปิดน้ำหมุนเวียน ซึ่งจะสามารถผลิตกึ่งก้ำกรมคุณภาพได้ถึง 32,000 ตัน และผลผลิตปลานิลถึง 20,000 ตัน

การศึกษาเปรียบเทียบผลตอบแทนของการเลี้ยงกึ่งก้ำกรมแบบพัฒนา (มีการย้ายบ่อ) กับแบบดั้งเดิมของเกษตรกร นวลจิรา (2548) พบว่าการเลี้ยงแบบดั้งเดิมมีน้ำหนักเฉลี่ยของกึ่ง อัตราการรอดตาย และอัตราการเจริญเติบโต ต่ำกว่าการเลี้ยงแบบพัฒนา ส่วนผลผลิตการเลี้ยงแบบดั้งเดิม และการเลี้ยงแบบพัฒนาไม่แตกต่างกันประมาณ 300-340 กิโลกรัมต่อไร่ แต่ขนาดของกึ่งที่เลี้ยงแบบพัฒนา โดยมีการย้ายบ่อในอัตราความหนาแน่นแตกต่างกันทั้ง 2 ระดับ จะใหญ่กว่าการเลี้ยงแบบดั้งเดิม และพบว่าการเลี้ยงแบบพัฒนาเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างบ่อย้ายในอัตราปล่อยที่ 5,000 และ 8,000 ตัวต่อไร่ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ย และอัตราการเจริญเติบโตของบ่อย้ายในอัตราปล่อยที่ 5,000 กึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 80.1 กรัม สูงกว่าบ่อย้ายในอัตราปล่อยที่ 8,000 ตัวต่อไร่ ซึ่งกึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 52.8 กรัม

การเลี้ยงแบบแยกเลี้ยงเดี่ยวเพื่อผลิตกุ้งขนาดใหญ่

ในปัจจุบันมีการพัฒนาการเลี้ยงแบบแยกเดี่ยว (แบบคอนโด) เพื่อให้กุ้งก้ามกรามที่ได้มีขนาดใหญ่และมีคุณภาพใกล้เคียงกับกุ้งก้ามกรามที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นที่ต้องการของตลาด (สนธิพันธ์, 2546) สำหรับขนาดของกุ้งก้ามกรามที่เริ่มต้นเลี้ยงแบบแยกเดี่ยวมี ขนาด 50-60 กรัมขึ้นไป แต่ละตัวจะนำไปแยกเลี้ยงในตู้ทรงสี่เหลี่ยมขนาด 22.5 x 33.5 สูง 23 เซนติเมตร บรรจุ น้ำ 19-20 ลิตร ใช้ระบบน้ำหมุนเวียนผ่านตู้ที่ใช้เลี้ยงในอัตรา 1.5 ลิตร ต่อนาทีและมีการให้ออกซิเจนทุกภาชนะระบายน้ำและสิ่งขับถ่ายจากกุ้งทุก ๆ 3-4 วัน มีการบำบัดน้ำก่อนการผ่านตู้ให้อาหารวันละ 2 ครั้งในปริมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ใช้ระยะเวลาเลี้ยงนานประมาณ 4-6 เดือนจะได้กุ้งขนาด 3-5 ตัวต่อกิโลกรัม

อาหารและการให้อาหารกุ้งก้ามกราม

อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นเม็ดชนิดจมน้ำ ควรมีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจใช้อาหารกุ้งกุลาดำก็ได้ อาหารควรคงสภาพในน้ำโดยไม่ ละลายได้นานไม่ต่ำกว่า 4 ชั่วโมง เนื่องจากกุ้งกินอาหาร โดยการกัดแทะจะทำให้สะดวกในการกัดกินถ้าอาหารละลายน้ำง่าย อาหารบางส่วนจะสูญเสียไปกุ้งได้รับอาหารไม่เต็มที่ทำให้สิ้นเปลืองค่าอาหาร ส่งผลให้บ่อกุ้งเน่าเสียอีกด้วยหลังจากปล่อยกุ้งลงในบ่อเลี้ยงระยะ สัปดาห์แรก อาจไม่ต้องให้อาหารก็ได้ถ้าหากมีอาหารตามธรรมชาติ ในบ่อเพียงพอสำหรับกุ้ง โดยสังเกตจากน้ำมีสีเขียวอมน้ำตาลหรือเขียวอมเหลือง กุ้งเล็กควรให้อาหารชนิดเกล็ดและอาหารจะมีขนาดเม็ดใหญ่ขึ้นตามขนาดของกุ้ง โดยให้อาหารลูกกุ้ง 30-40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักกุ้งในช่วงเดือนแรก แล้วลดเหลือ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 3 ควรหว่านอาหารให้กระจายทั่วบ่อจะทำให้กุ้งมีโอกาสได้กินอาหารทั่วถึงเกษตรกรส่วนใหญ่จะให้อาหารวันละ 2 ครั้งเนื่องจากกุ้งก้ามกรามจะกินอาหารได้ดีในเวลากลางคืนดังนั้น ควรให้อาหารเมื่อเช้าเพียงเล็กน้อยและให้มากขึ้นในช่วงเย็น หลังจากกุ้งอายุ 3 เดือนขึ้นไปแล้วควรให้อาหารเมื่อเช้าเฉพาะช่วงเย็นส่วนในกรณีที่มีสภาพ ดินฟ้าอากาศเปลี่ยนแปลง เช่น ท้องฟ้ามีดครึ้มหรือฝนตก ควรลดปริมาณอาหารสำหรับปริมาณอาหารแก่กุ้งก้ามกรามอายุต่าง ๆ กันแสดงไว้ในตารางที่ 1

การตรวจสอบว่าให้อาหารพอดีหรือไม่เป็นสิ่งสำคัญในการเลี้ยงกุ้ง เพราะต้นทุนการเลี้ยงกุ้งมากกว่าครึ่งจะเป็นค่าอาหารถ้าให้อาหารมากเกินไปก็จะเป็นการเพิ่มต้นทุน และยัง จะทำให้พื้นบ่อและน้ำเน่าเสียอีกด้วย ถ้าให้อาหารน้อยเกินไปก็จะทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าได้ผลผลิตไม่ดีและใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานกว่าปกติ การตรวจสอบปริมาณอาหารจะทำหลังจากให้อาหารไปแล้ว 3

ชั่วโมง โดยใช้ยอรูปสี่เหลี่ยมขอบขบอกจากผิวไม้ไผ่หรือเหล็กสแตนเลส เช็ดติดกับอวนในล่อนมุ้งเขียว ในบ่อเลี้ยงกุ้งอาจจะมีสัตว์ชนิดอื่นที่แก่งแย่งอาหารกุ้ง เช่น ปู กบ และเขียด ควรจะกำจัดออกในขณะที่เตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้ง

ตารางที่ 1 ปริมาณการให้อาหารกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารสำเร็จรูปความหนาแน่น 80,000 ตัว/ไร่

อายุกุ้ง (เดือน)	น้ำหนัก (กรัม)	ขนาด (ตัว/กก.)	เบอร์อาหาร	ปริมาณอาหาร/ วัน (กก.)	รวมปริมาณ อาหาร/เดือน (กก.)
1	0.40	2,500	#045	0.5	15
2	2.00	500	#045	1	30
3	5.00	200	#045	1.5-2	45-60
4	12.00	83	#045	2-4	60-120
5	28.00	35	#045	3-5	90-150
6	50.00	20	#045,#047	5	150
7	70.00	14	#045,#047	3-5	90-150
8	75.00	13	#047	1-3	30-90

- หมายเหตุ 1. กุ้งน้ำหนัก 0.01-12.0 กรัม ให้ตรวจสอบการกินอาหารโดยใช้ยอ
2. กุ้งน้ำหนัก 12.0 กรัมขึ้นไป ให้ตรวจสอบการกินอาหารโดยการตรวจ พื้นบ่อ และคำนวณปริมาณอาหารจากการประเมินอัตราการรอดตาย
3. ในเดือนที่ 7 และ 8 จะให้อาหารลดลง เพราะเริ่มจับกุ้งตัวโตขายเมื่ออายุได้ 6 เดือน
4. ในกรณีที่กุ้งมีอัตราการรอดตายสูงมากและมีความหนาแน่นสูงอาจทยอยจับกุ้งเมื่อเลี้ยงไปได้ 4 เดือน

ที่มา: สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง (2548)

อัตราแลกเปลี่ยนของอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม

โดยทั่วไป ถ้าใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งก้ามกรามที่ขายตามที่ องค์การมีอัตราแลกเปลี่ยนไม่เกิน 2.5 (อาหาร 2.5 กิโลกรัม เปลี่ยนเป็นผลผลิตกุ้งได้ 1 กิโลกรัม) แต่ถ้าใช้อาหารที่เกษตรกรผสมเองที่มีโปรตีนมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ควรมีอัตราแลกเปลี่ยนไม่เกิน 4

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต

1. อาหาร กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ที่กินอาหารอย่างต่อเนื่อง เพราะมีทางเดินอาหารสั้นการย่อยและการดูดซึมของอาหารจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นอาหารที่นำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งควรเป็นอาหารที่มีคุณภาพ มีสัดส่วนของโภชนาการและพลังงานเหมาะสมต่อ การเจริญเติบโตของกุ้ง โดยมีการให้อาหารในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของกุ้ง

ตารางที่ 2 หลักเกณฑ์มาตรฐานการขึ้นทะเบียนอาหารสำหรับกุ้งก้ามกรามระยะวัยต่าง ๆ

อาหารสำหรับกุ้ง ก้ามกราม	ลักษณะ อาหาร	ขนาดของอาหาร	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)			
			โปรตีนไม่ ต่ำกว่า	ไขมันไม่ ต่ำกว่า	กาก ไม่ มากกว่า	ความชื้น
ลูกกุ้งก้ามกรามวัย อ่อนอายุ 4-15 วัน	ผงแผ่น	ผ่านตะแกรงขนาด 500 ไมโครเมตร	37	5	3	10
ลูกกุ้งก้ามกรามวัย อ่อน อายุ 15 วัน	ผงเกล็ดหรือ เม็ด	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางไม่เกิน 15 มม.	37	5	3	10
กุ้งคว่ำ-5 วัน	เม็ดจม	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางไม่เกิน 2.5 มม.	30	4	3	12
กุ้งก้ามกรามขนาด 5-12 กรัม	เม็ดจม	ไม่จำกัดขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลาง	25	3	6	12
กุ้งก้ามกรามขนาด 12 กรัมขึ้นไป	เม็ดจม	ไม่จำกัดขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลาง	25	3	6	12
อาหารสมทบ	เม็ดจม	ไม่จำกัดขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลาง	20	3	6	12
หัวอาหาร	ผง		30	5	6	12

หมายเหตุ ถ้าอาหารสูตรใดไม่ได้เป็นตามหลักเกณฑ์นี้ กำหนดให้นำผลการทดลองมาประกอบ
พิจารณา

ที่มา: จูอะดี (2542)

2. แสงมีอิทธิพลต่อการกินอาหารของกุ้ง ในช่วงเวลากลางคืนกุ้งจะมีความคล่องแคล่วและเคลื่อนไหวอยู่เสมอ การหาอาหารของกุ้งมักจะใช้หนวดสัมผัสรับความรู้สึกว่าเป็นอาหารมากกว่าการมองเห็น นอกจากนี้แสงยังมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบของกุ้งซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง Nakamura (1975)

3. ความหนาแน่น กุ้งที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูงจะทำให้เกิด ปัญหา ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำอาจจะอยู่ในระดับที่ต่ำรวมทั้งการแก่งแย่ง อาหารและที่อยู่อ่ มีผลทำให้การเจริญเติบโตต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่นต่ำกว่า เพราะกุ้งมีนิสัยการกินกันเองเมื่อลอกคราบ ถ้าเลี้ยงหนาแน่นอัตราการกินกันเองจะสูงตามไปด้วย นอกจากนี้การเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่นจะทำให้เกิดปัญหาการสะสมของเสียจากอาหารที่เหลือและสิ่งขับถ่ายของกุ้ง

4. คุณภาพน้ำ

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของน้ำที่เหมาะสมในบ่ออนุบาลและบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

คุณภาพน้ำ	ช่วงที่เหมาะสม	ระดับที่ทำให้กุ้งระยะ Juvenile ตาย (L) และ ระดับที่ทำให้กุ้งเครียด (S)	ระดับที่ทำให้กุ้งในบ่อเลี้ยงที่ประเทศบราซิลสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (ในปี 1998)
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	28-31	<12 (L) <19 (S) > 35(L)	-
พีเอช	7.0-8.5	>9.5(S)	5.5-8.3
ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (มก./ลิตร)	3-7	2(S) 1(L)	-
ความเค็ม (พีพีที)	<10	-	-
ความโปร่งแสง (ซม.)	25-40	-	-
ความเป็นด่าง (มก./ลิตร)	20-60	-	1-102
ความกระด้าง(มก./ลิตร)	30-150	-	10-75
แอมโมเนีย (มก./ลิตร)	<0.3	> 0.5 ที่พีเอช 9.5(S) >1.0ที่พีเอช 9.0(S) >2.0ที่พีเอช 8.5(S)	0.1-0.5

ตารางที่ 3 (ต่อ)

คุณภาพน้ำ	ช่วงที่เหมาะสม	ระดับที่ทำให้กุ้งระยะ Juvenile ตาย (L) และ ระดับที่ทำให้กุ้งเครียด (S)	ระดับที่ทำให้กุ้งในบ่อ เลี้ยงที่ประเทศบราซิล สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (ในปี 1998)
ไนโตรเจน(มก./ลิตร)	<0.2	-	
ไนเตรท (มก./ลิตร)	<10	-	

หมายเหตุ สัญลักษณ์ – ไม่มีข้อมูล หรือ ไม่มีการยืนยัน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Boyd and Zimmermann (2000)

คุณภาพน้ำที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ก้ามกราม

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง หมายถึง คุณสมบัติทางชีวะ เคมี และกายภาพของน้ำ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนในน้ำ สีของน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) ความขุ่นใส ปริมาณแอมโมเนีย และไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น (วรวิทย์, 2531) คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต ความต้านทานต่อโรคและพยาธิ ตลอดจนการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ (วิรัช, 2540)

คุณภาพน้ำที่เหมาะสมในบ่ออนุบาลและบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแสดงไว้ในตารางที่ 3 ถ้าคุณสมบัติของน้ำไม่เหมาะสมจะทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้า เนื่องจากลอกคราบไม่ได้ บางครั้งกุ้งเป็นโรคตัวขาวตัวสีชมพู หรือตายโดยไม่ทราบสาเหตุ และพบว่าไม่ได้เกิดจากเชื้อโรค แต่เกิดจากคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม ซึ่งเป็นสาเหตุโน้มนำในการเกิดโรค โสกา และสมเกียรต์ (2531) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของคุณสมบัติของน้ำกับการเกิดโรคในกุ้งก้ามกราม พบว่า พีเอช และปริมาณแอมโมเนีย (NH_3 -N) ในบ่อที่มีกุ้งป่วยเป็น โรคมีค่าสูงกว่าบ่อที่ไม่มีกุ้งป่วย

1. ความเค็ม (salinity)

ความเค็มของน้ำ หมายถึง ผลรวมความเข้มข้นของไอออนทั้งหมดที่ละลายในน้ำ (total dissolved ions) ซึ่งไม่ใช่แต่เฉพาะไอออนของโซเดียมคลอไรด์เท่านั้น โดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร กรัมต่อลิตร ส่วนในพันส่วน (พีพีที) หรือ practical salinity units (psu)

ความเค็มมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำมากโดยจะมีผลต่อการควบคุม ปริมาณน้ำภายในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของแรงดันออสโมติกภายในตัวสัตว์น้ำกับ น้ำภายนอก ถ้าความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงมากกว่า 10 เเปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2-3 นาที สัตว์น้ำ ไม่สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้สัตว์น้ำตายได้ (Lawson, 1995; Boyd and Tucker, 1998) กุ้งก้ามกรามในระหว่างการเพาะและอนุบาลสามารถอยู่ในความเค็มระหว่าง 10-15 พีพีที (สมพงษ์, 2546) และความเค็มยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคกุ้งอีกด้วย เช่น แบคทีเรีย สกุล *Vibrio* ซึ่งส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็มตั้งแต่ 20 พีพีทีขึ้นไป ส่วนแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จะเจริญที่ความเค็มต่ำ ประมาณ 10 พีพีที (Buchanan and Gibbons, 1974)

กุ้งก้ามกรามสามารถทนความเค็มได้ในช่วงกว้างระหว่าง 0-25 พีพีที (New, 1995) แต่ ช่วงความเค็มที่กุ้งเจริญเติบโตได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง 0 ถึง 4 พีพีที (กรมประมง, 2546) ส่วน Sandifer *et al.* (1975) พบว่ากุ้งก้ามกรามวัยรุ่นสามารถอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มระดับต่าง ๆ ได้ แต่ เริ่มตายที่ความเค็ม 25 พีพีที และการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความเค็ม 30 พีพีที

2. ความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช)

พีเอชของน้ำ เป็นค่าปริมาณไฮโดรเจนไอออน (H^+) ที่มีอยู่ในน้ำ หากน้ำมีค่าพีเอชต่ำกว่า 7 แสดงว่า น้ำนั้นมีสภาพเป็นกรด แต่ถ้ามีพีเอชสูงกว่า 7 ขึ้นไป แสดงว่าน้ำมีสภาพเป็นด่าง บ่อที่มี พีเอชของดินและน้ำค่าน้ำจะใสเนื่องจากมีปริมาณแพลงก์ตอนน้อยรวมทั้งอาหารธรรมชาติที่อาศัย อยู่ตามพื้นบ่อก็จะมึน้อยด้วย พีเอชของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เนื่องจากการสะสมของเสียจากเศษอาหารเหลือและซากแพลงก์ตอน และที่กุ้งขับถ่ายออกมา ในบ่อ ที่สีน้ำเขียวเข้มจากปริมาณแพลงก์ตอนพีชในตอนกลางวันที่มีแสงแดด การสังเคราะห์แสงของ แพลงก์ตอนพีช มีส่วนทำให้ค่าพีเอชของน้ำในตอนเช้าและตอนบ่ายแตกต่างกันมาก

ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำจะอยู่ระหว่าง 6.5-9.0 สัตว์น้ำกร่อยทนต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชได้ค่อนข้างดีกว่าสัตว์น้ำจืดและสัตว์ทะเล (Boyd and Tucker, 1998) พีเอชมีผลต่อความเป็นพิษของคุณสมบัติอื่นๆ โดยเฉพาะ แอมโมเนียและไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นสัดส่วนของแอมโมเนียในรูปที่ไม่มีประจุ (NH_3) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำจะเพิ่มขึ้นในทางกลับกันเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นสัดส่วนของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ไม่มีประจุจะลดลง ทำให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลง สำหรับกุ้งก้ามกรามมีค่าพีเอชที่เหมาะสม ระหว่าง 7.0-8.9 (บรรจง, 2521; เปี่ยมศักดิ์, 2523)

ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำกระบวนการไนตริฟิเคชันที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทซึ่งไนเตรทไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ แต่ต้องมีพีเอชในระดับที่เหมาะสมด้วยพีเอชที่เหมาะสมสำหรับ *Nitrosomonas* ในการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์ คือ 8.5-8.8 และสำหรับ *Nitrobacter* ที่จะเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท คือ 8.3-9.3 (Halling-Sørensen and Jørgensen, 1993) Wild *et al.* (1964) รายงาน ถึงค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน คือ 8.4 และพบอัตราการเกิดไนตริฟิเคชัน 90 เปอร์เซ็นต์ในช่วงพีเอช 7.0-8.8 และค่าพีเอชที่ไม่อยู่ในช่วง 7.0-8.8 จะทำให้มีอัตราการเกิดไนตริฟิเคชันต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

3. ความเป็นด่าง (alkalinity)

ความเป็นด่าง คือความสามารถของน้ำที่ทำให้กรดเป็นกลาง ความเป็นด่างของน้ำส่วนใหญ่เกิดจากคาร์บอเนตไอออน ไบคาร์บอเนตไอออน และไฮดรอกไซด์ไอออน น้ำที่มีอิออนตัวใดตัวหนึ่งในอออน 3 ชนิดข้างต้นจะมีค่าความเป็นด่างอยู่ด้วยเสมอ ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญต่อการควบคุมการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแหล่งน้ำ น้ำที่มีค่าความเป็นด่างสูง โดยทั่วไปมีความสามารถในการรักษาพีเอชของแหล่งน้ำไม่ให้เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าน้ำที่มีค่าความเป็นด่างต่ำกว่า ความสามารถนี้เรียกว่า buffering capacity (Lawson, 1995)

อิออนที่ไม่ได้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนักบางชนิด เช่น ทองแดง สังกะสี แคดเมียม นิกเกิล และอลูมิเนียม เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำอย่างรุนแรง ความสามารถในการละลายและความเข้มข้นของอิออนอิสระลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ดังนั้นความรุนแรงของความเป็น

พิษของโลหะลดลงเมื่อค่าความเป็นด่างเพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยทั่วไปพีเอชเพิ่มขึ้นตามค่าความเป็นด่าง (Boyd and Tucker, 1998)

ความเป็นด่างตั้งแต่เริ่มปล่อยลูกกุ้งจนถึงสิ้นสุดการเลี้ยงควรอยู่ในระดับที่เหมาะสม คือมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งทั่ว ๆ ไป เนื่องจากถ้าความเป็นด่างต่ำ กุ้งจะมีปัญหาในการลอกคราบและมีอัตราการรอดตายต่ำ แต่ความเป็นด่างที่สูงมากและพีเอชของน้ำในตอนเช้ามีค่าน่าสูงมากกว่า 8.3 กุ้งจะไม่ลอกคราบและมีการเจริญเติบโตช้า (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

Adhikari *et al.* (2007) ได้ศึกษาระดับของไบคาร์บอเนตไอออน ต่ออัตราการรอดตาย และอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามระยะ juvenile ที่ระดับ 100-370 มิลลิกรัมต่อลิตรเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/l as CaCO₃) พบว่าที่ระดับของไบคาร์บอเนตไอออนเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต กุ้งมีอัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

4. ความกระด้าง (hardness)

ความกระด้างรวมของน้ำ (total hardness) ที่แสดงความเข้มข้นเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมคาร์บอเนต หมายถึง ผลรวมของแคลเซียม แมกนีเซียม และไอออนของโลหะอื่นที่มีสภาพประจุบวก (ธรรมรักษ์, 2541) แหล่งน้ำจืดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ควรมีค่าความเป็นด่างหรือความกระด้างอยู่ในเกณฑ์เดียวกัน น้ำที่มีค่าความกระด้างต่ำจะเป็นน้ำอ่อน (Molye, 1945)

New and Singholka (1985) แนะนำว่าความกระด้างของน้ำสำหรับเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ควรมีค่า 40-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ Bartlett and Enkerlin (1983) รายงานว่าระดับความกระด้างสูงถึง 940-1,060 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม แต่ต้องมีค่าปริมาณความเป็นด่างต่ำ คือมีค่า 58-89 มิลลิกรัมต่อลิตร

กุ้งมีความต้องการแคลเซียมในการสร้างเปลือก โดยกุ้งจะดูดซับแคลเซียมจากน้ำ ระหว่างการลอกคราบ ปกติน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งควรมีระดับความกระด้างไม่ต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต

Adhikari *et al.* (2007) ได้ศึกษาผลของ calcium hardness ต่ออัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามระยะ juvenile พบว่าที่ระดับของ calcium hardness เท่ากับ 90 มิลลิกรัมต่อลิตรเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต กุ้งมีอัตราการรอดสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับของ calcium hardness เท่ากับ 384 มิลลิกรัมต่อลิตรเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต กุ้งมีอัตราการรอดต่ำสุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระดับ calcium hardness เท่ากับ 132 มิลลิกรัมต่อลิตรเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

5. ออกซิเจน (dissolved oxygen)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในน้ำต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจ (Schreck and Moyle, 1990) การขาดออกซิเจนในแหล่งน้ำ ทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพไม่มีออกซิเจนขึ้น (anaerobic decomposition) เป็นแนวโน้มให้เกิดก๊าซพิษที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และ มีเทน เป็นต้น (Train, 1979) แต่ในกรณีที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากเกินไปจนอิ่มตัวเป็นเวลานานอาจจะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำได้ (Boyd, 1990)

ตามปกติปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำทั่วไปรวมทั้งกุ้ง ก้ามกรามไม่ต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ, 2543) และที่เหมาะสมคือ 5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร (บรรจง, 2521; เปี่ยมศักดิ์, 2523) ปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการย่อยอาหาร ดังนั้น หากมีปริมาณออกซิเจนต่ำทำให้กุ้งกินอาหารลดลง (กรมประมง, 2546)

ปริมาณออกซิเจนในน้ำมีผลต่อ การหายใจ การกินอาหาร การทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายของกุ้ง และช่วยในการย่อยสลายเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายต่าง ๆ ของกุ้งด้วย ออกซิเจนที่ละลายในน้ำในปริมาณที่ต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร อาจไม่ทำอันตรายต่อกุ้งในสภาวะปกติ แต่มีผลโดยตรงต่อกุ้งที่กำลังลอกคราบหรือเพิ่งลอกคราบใหม่ เพราะช่วงนี้กุ้งจะต้องการออกซิเจนมากกว่าปกติ Boyd (1990) พบว่ากุ้งน้ำจืดในสกุล *Macrobrachium* ใช้ออกซิเจนในอัตรา 200-400

มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อชั่วโมง New (2000) แนะนำอย่างน้อยควรควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. แอมโมเนีย (ammonia)

แอมโมเนียในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่เกิดจากการขับถ่ายของปลาหรือกุ้งที่เลี้ยงในบ่อ (Boyd, 1992) แอมโมเนียเป็นพิษต่อสัตว์น้ำทั้งในสภาพไม่มีอิออน (un-ionized form, NH_3) และมีอิออน (ionized form, NH_4^+) แต่ในรูป NH_3 มีความเป็นพิษสูงกว่า ปริมาณของแอมโมเนียในสภาพ NH_3 เพิ่มขึ้นตามระดับค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น แต่พีเอชมีผลมากกว่าอุณหภูมิ (Train, 1979; Boyd, 1990) ปริมาณ NH_3 ที่เหมาะสมคือ ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ($\text{NH}_3\text{-N}$) (จรรูวรรณ, 2525)

แอมโมเนียในรูป NH_3 สามารถแพร่กระจายผ่านผนังเซลล์ได้ดี เพราะไม่มีประจุไฟฟ้า และสามารถละลายในไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ ได้ แต่แอมโมเนียในรูป NH_4^+ มีประจุไฟฟ้าทำให้สามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ ได้น้อยกว่า (Fromm and Gillette, 1968) แอมโมเนียมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง เพราะทำให้ความสามารถในการขับถ่ายแอมโมเนียจากตัวกุ้งลดลง ระดับแอมโมเนียในเลือดและเนื้อเยื่อของกุ้งเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าพีเอชของเลือดกุ้งเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นแอมโมเนียจะทำให้เนื้อเยื่อของกุ้งใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น ทำลายและลดความสามารถของเลือดในการขนส่งออกซิเจน ลูกกุ้งก่อนเข้าสู่ระยะคว่ำ (โพสตาไรวา) ที่สัมผัสแอมโมเนียในระดับความเข้มข้นสูง ๆ จะมีสีดำเกิดขึ้นตามลำตัว และกุ้งที่คว่ำแล้วจะมีอาการชักกระตุก ลำตัวมีสีขาวขุ่น และ Mallasen and Valenti (2005) กล่าวว่าลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนในการพัฒนาในระยะท้าย ๆ จะมีการตอบสนองต่อแอมโมเนียไวกว่าลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะแรก เนื่องจากเหงือกมีการพัฒนาและมีพื้นที่สัมผัสมาก สอดคล้องกับ Naqvi *et al.* (2007) พบว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียสูงขึ้นกุ้งก้ามกรามขนาดเล็ก (4.13-4.49 กรัม) มีอัตราการตายสูงขึ้นและการเจริญเติบโตลดลงอย่างชัดเจน ในการอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน ปริมาณแอมโมเนียในรูป NH_3 ไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ยนต์, 2529) และปริมาณแอมโมเนียที่ระดับต่ำในระดับ 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามลดลง (Colt and Armstrong, 1979) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำระดับของแอมโมเนียรวมที่ต่ำสุดที่สามารถยอมรับได้ต้องมีค่าไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่จะไม่ทำให้ความเข้มข้นของ NH_3 มีค่าเกินกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร (Liao and Mayo, 1972)

การควบคุมปริมาณแอมโมเนียและระดับของสารอาหาร (Aquaculture, 1999)

ประกอบด้วย

- หยุดหรือลดปริมาณการให้อาหาร
- เติมน้ำใหม่เข้าสู่บ่อเพื่อเจือจางความเข้มข้นของสารอาหาร
- ลดอัตราความหนาแน่น เพื่อลดปริมาณอาหารและระดับการขับถ่ายของเสียของ

สัตว์น้ำ

- ลดระดับของฟิเอชในบ่อ เพื่อเปลี่ยนจากแอมโมเนียในรูป NH_3 ที่มีความเป็นพิษสูงเป็น NH_4^+ ซึ่งทำให้ความเป็นพิษน้อยลง

7. ไนไตรท์ (nitrite)

ไนไตรท์เป็นสารประกอบไนโตรเจนรูปแบบหนึ่งที่เกิดขึ้นจากการหมุนเวียนไนโตรเจนในแหล่งน้ำ โดยเกิดกึ่งกลางระหว่างการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียเป็นไนเตรท (nitrification) และไนเตรทเปลี่ยนกลับเป็นแอมโมเนีย (denitrification) (Boyd, 1990) ไนไตรท์ทำให้ฮีโมโกลบินในเลือดปลา มีประสิทธิภาพในการรับออกซิเจนได้น้อยลง เมื่อไนไตรท์ถูกดูดซึมเข้าไปในตัวปลาจะทำให้ปฏิกิริยากับฮีโมโกลบินในเลือดเกิดเป็นสารประกอบเมธิโมโกลบิน (methemoglobin) ขึ้นมา ทำให้เฟอร์รัสที่เป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบินถูกออกซิไดซ์เป็นเฟอร์ริกมีผลทำให้เมธิโมโกลบินไม่สามารถรับออกซิเจนได้ สีของเลือดเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล จึงเรียกว่าโรคเลือดสีน้ำตาล (brown blood disease) แต่เลือดของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียจะเป็นฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ซึ่งมีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบแทนที่เฟอร์ริก ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงแตกต่างออกไปแต่ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ไนไตรท์เป็นพิษต่อครัสเตเชียได้เช่นกัน ความเป็นพิษสำหรับกุ้งก้ามกรามคือจะทำให้มีการเจริญเติบโตลดลง ถ้ามีความเข้มข้นของไนไตรท์ 1.8-6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Boyd, 1990) สอดคล้องกับ Armstrong *et al.* (1976) กล่าวว่าระดับของไนไตรท์ที่ไม่มีผลกระทบต่อสัตว์น้ำคือไม่เกิน 1.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนไนเตรทไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (New, 1988)

ไนไตรท์เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันซึ่งแบคทีเรียจะออกซิไดซ์แอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรทในสภาพที่มีออกซิเจน และยังอาจเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันไนเตรทให้เปลี่ยนเป็นไนไตรท์ โดยแบคทีเรียในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนได้อีกด้วย และในบางสภาวะที่กระบวนการไนตริฟิเคชันไม่สามารถเกิดได้โดยสมบูรณ์ก็จะเกิดการสะสมของไนไตรท์ ได้ ความ

เป็นพิษของไนไตรท์ต่อสัตว์น้ำเกิดจากการที่ไนไตรท์ไปออกซิไดซ์เหล็ก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบินในเลือดทำให้เป็นเมทฮีโมโกลบิน ซึ่งไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนได้ ทำให้เกิดการตายเนื่องจากการขาดออกซิเจน แต่ในสัตว์พวกประเภทกลุ่มกุ้ง-ปู ซึ่งเป็นสัตว์กลุ่มที่มีเลือดสีน้ำเงิน มีฮีโมไซยานินเป็นองค์ประกอบในเลือด ไนไตรท์จะเข้าจับกับเม็ดเลือดได้น้อยกว่า ไนไตรท์จึงมีความเป็นพิษต่อกุ้งและปูน้อยกว่าสัตว์น้ำอื่น ความเป็นพิษเนื่องจากการที่เลือดกุ้งไม่สามารถจับตัวกับออกซิเจนทำให้กุ้งขาดออกซิเจนได้ นอกจากนี้ไนไตรท์ในเลือดกุ้งจะทำให้ระดับโปรตีนและฟิเอชในเลือดกุ้งลดลง ซึ่งทำให้ชีวเคมีในเลือดกุ้งเปลี่ยนแปลง มีการสะสมของยูเรียในเลือดกุ้งและมีการดูดซึมน้ำมาก ทำให้สมดุลเกลือแร่เปลี่ยนแปลง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) Colt and Armstrong (1979); Colt *et al.* (1981) พบว่าระดับความเข้มข้นของไนไตรท์ที่ 1.8 และ 6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามลดลงสารจำพวกแอมโมเนียและไนไตรท์เป็นสาเหตุที่ทำให้ลูกกุ้งตายอย่างฉับพลันได้ หรือถ้ามีปริมาณไม่มากจะมีผลทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอ ไม่กินอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตช้าลงและง่ายต่อการติดเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ

8. อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิของน้ำ เป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีผลต่อการกินอาหาร การย่อยอาหาร และกระบวนการทำงานต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์น้ำ หากอุณหภูมิของน้ำเหมาะสมแล้วทำให้สัตว์น้ำกินอาหารได้มากและสามารถย่อยอาหารได้ดี ถ้าอุณหภูมิน้ำต่ำทำให้กระบวนการทำงานต่าง ๆ ของสัตว์น้ำต่ำ (กรมประมง, 2546) Shang and Fujimura (1977) กล่าวว่ากุ้งก้ามกรามมีการปรับตัวได้ดีสามารถอาศัยอยู่ได้ในอุณหภูมิระดับกว้างตั้งแต่ 15-35 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในที่อุณหภูมิประมาณ 31 องศาเซลเซียส และ Fujimura (1966) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามคือ 23.8-31.7 องศาเซลเซียส และกฤษฎา (2535) พบว่า กุ้งก้ามกรามวัยรุ่นทุกขนาดเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ จำนวนเม็ดเลือดเพิ่มมากขึ้นด้วยในสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน (Truscotta and White, 1990) กุ้งก้ามกรามสามารถทนอุณหภูมิได้ในช่วงกว้างที่ 14-35 องศาเซลเซียส (New, 1990) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตคือ 29-31 องศาเซลเซียส (New, 1995)

Manush *et al.* (2004) รายงานว่ากุ้งก้ามกรามน้ำหนักประมาณ 30 กรัม ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส สามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียสได้ และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นด้วย

Niu *et al.* (2003) กล่าวว่าที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสกุ้งก้ามกรามสามารถกินอาหารได้เพิ่มขึ้นและมีการเจริญเติบโตที่เหมาะสมแต่อย่างไรก็ตามเป็นการทดลองที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอเนื่องจากการกินอาหารเพิ่มขึ้นทำให้มีการเจริญเติบโตดี

โรคที่พบในกุ้งก้ามกราม

ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามให้ประสบความสำเร็จเกษตรกรจะต้องให้ความสำคัญในการป้องกันโรคที่จะเกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยง เนื่องจาก มีผลต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต และผลผลิตของการเลี้ยง โรคที่พบในระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่สำคัญจะ เกิดจากการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ทำให้เกิดการสูญเสียในพื้นที่การเลี้ยงในประเทศต่าง ๆ รวมทั้งประเทศไทยด้วย (Sano and Fukuda, 1987; Wongteerasupaya *et al.*, 1995) นอกจากแบคทีเรียและไวรัสแล้วยังมีโรคที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ ได้แก่ ปรสิต เชื้อรา รวมทั้ง อาการผิดปกติที่เกิดจากคุณสมบัติของน้ำและพื้นบ่อไม่ดี

1. โรคที่เกิดจากไวรัส (viral diseases)

1.1 โรคหางขาว (White tail disease; WTD)

โรคหางขาวมีรายงานการพบในปี ค.ศ. 1997 ใน Guadeloupe (Arcier *et al.* 1999) หลังจากนั้นพบใน Martinique (French West Indies) ประเทศอินเดีย (Salin and Nair, 2003; Vijayan *et al.*, 2003) ประเทศไต้หวัน (Tung *et al.*, 1999) ประเทศจีนในจังหวัด Zhejiang, Jiangsu, Guangdong และ Shanghai (Qian *et al.*, 2003) และในประเทศไทย (นิตี และคณะ, 2548; สุขุมาศ, 2549 และ Yoganandhan *et al.*, 2005) โรคหางขาวนี้สร้างความเสียหายให้กับ ลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก โดยลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อมีอาการกล้ำมเนื้อสีขาวโดยเฉพาะบริเวณหาง (สุขุมาศ, 2549; Sahul Hameed *et al.*, 2004) สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) มีรูปร่างแบบ icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) เป็น single strand RNA (ssRNA) ไวรัสมีขนาด 26-27 นาโนเมตร

และชนิดที่สองคือ Extra small virus (XSV) มีขนาด 14-16 นาโนเมตร (Qian *et al.*, 2003; Bonami *et al.*, 2005) แต่ความสัมพันธ์ของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด (Bonami *et al.*, 2005) ซึ่งมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวรัสทั้ง 2 ชนิด โดยในกลุ่มที่มีไวรัส MrNV ในสัดส่วนที่มากกว่า XSV ปรากฏว่ากุ้งก้ามกรามแสดงอาการกล้ามเนื้อขาว แต่ในกลุ่มที่มีไวรัส MrNV ในสัดส่วนที่น้อยกว่า XSV ปรากฏว่ากุ้งก้ามกรามแสดงอาการกล้ามเนื้อขาวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น Sudhakaran *et al.* (2006a) ศึกษาการติดเชื้อ MrNV และ XSV ในกุ้งทะเล 3 ชนิด คือ *Penaeus indicus*, *P. japonicus* และ *P. monodon* โดยการให้กินและฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ผลปรากฏว่ากุ้งทั้ง 3 ชนิดไม่ตาย ในกลุ่มที่ฉีดเชื้อไวรัสเมื่อนำเหงือก กล้ามเนื้อ ลำไส้ และน้ำเลือด ตรวจสอบด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ให้ผลบวกกับ MrNV และ XSV และเมื่อนำเชื้อไวรัสที่สกัดได้จากกุ้งทะเลทั้ง 3 ชนิดนี้ไปทดลองกับลูกกุ้งก้ามกราม พบว่ากุ้งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบเชื้อ MrNV และ XSV แสดงว่าไวรัส MrNV และ XSV ยังสามารถคงความรุนแรงของโรคได้ในกุ้งทะเลแต่ไม่ทำให้อุ้งทะเลตาย นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่าอาร์ทีเมียที่เป็นอาหารให้กับกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนสามารถเป็นพาหะทำให้อุ้งก้ามกรามเป็นโรคและตายในที่สุด (Sudhakaran *et al.*, 2006b)

ศุภมาส (2549) ศึกษาโรค WTD หรือโรคกล้ามเนื้อขุ่นขาว ในลูกกุ้งวันอ่อนในโรงเพาะฟักพบว่าลักษณะภายนอกของลูกกุ้งที่ป่วยกล้ามเนื้อขุ่นขาวที่สืบจากคล้ายสีของน้ำนม อาจจะเป็นขาขุ่นทั้งตัว หรือพบเป็นบางส่วน เช่นที่บริเวณส่วนหลังหรือปลายส่วนหาง ซึ่งลักษณะกล้ามเนื้อขาวขุ่นนี้จะเกิดขึ้นทีละน้อย และขยายบริเวณออกไปทั่วลำตัว พยาธิสภาพของลูกกุ้งก้ามกรามที่มีตัวขาวขุ่นจะมีกล้ามเนื้อตาย (necrosis) ในส่วนของ myofibril เป็นบางส่วน โดยเฉพาะมัดกล้ามเนื้อขนาดเล็กที่อยู่รอบนอก เช่น มัดกล้ามเนื้อด้านท้อง มัดกล้ามเนื้อด้านหลังของลำตัวได้เปลือกกล้ามเนื้อที่ยึดระหว่างส่วนหัวและลำตัวปล้องแรก ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อขนาดเล็กเช่นเดียวกัน สำหรับกล้ามเนื้อในบริเวณปล้องที่ 3-4 ที่อยู่บริเวณกลางลำตัวและระหว่างมัดกล้ามเนื้อขนาดใหญ่จะมีการตายของ myofibril เช่นเดียวกัน ส่วนกล้ามเนื้อที่มีขนาดใหญ่ของลำตัวเกือบทั้งหมดมีลักษณะปกติ ลักษณะที่สังเกตได้ง่ายสำหรับกล้ามเนื้อบริเวณที่ได้รับความเสียหาย หรือมีกล้ามเนื้อตาย จะเห็นนิวเคลียสของกล้ามเนื้อลายติดสีน้ำเงินในบริเวณนั้นจำนวนมาก ในขณะที่กล้ามเนื้อปกตินิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินแต่จางกว่า และอยู่ห่าง ๆ กัน ทำให้มองเห็นเฉพาะส่วนของไซโตพลาสซึมที่จะติดสีชมพูชัดเจน จากการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซิน (H&E) การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในระยะแรกของกล้ามเนื้อของลำตัวซึ่งเป็นกล้ามเนื้อลาย (striated muscle) ซึ่งตามปกติจะเห็นเส้นลายขวาง (cross-striation) แต่เมื่อกล้ามเนื้อเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง myofibril จะ

มีการบวมขึ้น (swelling) หลังจากนั้นเส้นลายขวางของกล้ามเนื้อจะเริ่มหายไป ต่อมาจะเห็น myofibril มีลักษณะเป็นท่อน (fragmentation) และรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (flocculation) ต่อจากนั้นกล้ามเนื้อจะหดตัวมีขนาดเล็กลงอย่างเด่นชัด เนื่องจากการสูญเสีย myofibril และไซโตพลาสซึมของกล้ามเนื้อ (sarcoplasm) หรือ myofiber parenchyma ทำให้เห็นกล้ามเนื้อเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบซึ่งจะมีนิวเคลียสของกล้ามเนื้อที่ติดสีน้ำเงินเข้มขึ้น (hyperchromatic myonuclei) มีรูปร่างกลมหรือยาวจำนวนมากในบริเวณนี้ และมัก จะพบ hemocyte แทรกตัวเข้ามาเพิ่มขึ้น (infiltration) ลูกกุ้งบางตัวจะพบลักษณะคล้ายกัน พบ pyknotic nucleus บ้าง intranuclear inclusion bodies ในนิวเคลียสของกล้ามเนื้อที่ตายติดสีน้ำเงิน (basophilic intranuclear inclusion) แต่จะพบไม่มากนักสำหรับลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยในระยะใกล้ตาย (moribund) กล้ามเนื้อของลำตัวจะมีการเสื่อมสลาย (degenerating muscle fiber) และติดสีจางจากการย้อมด้วย H&E ทำให้มองเห็นเป็นช่องว่าง (vacuolation) เนื่องจากไซโตพลาสซึมของกล้ามเนื้อละลายหรือส่วนของ myofiber parenchyma ถูกทำลายมาก จะพบนิวเคลียสของกล้ามเนื้อละลาย ซึ่งมีขนาดใหญ่จำนวนมากรวมกันเป็นกลุ่ม และจะพบ pyknotic nuclei ในบริเวณนี้ด้วย ในระยะท้าย ๆ กล้ามเนื้อบริเวณนี้จะมีการเสื่อมสลายอาจจะ ในบริเวณจำกัด จนถึงบริเวณกว้าง

การวินิจฉัยโรคมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะที่เกิดการติดเชื้อในระยะแรก ๆ วิธีการตรวจสอบวินิจฉัยโรคทางขาวนี้มีการศึกษามากมาย ได้แก่ Romestand and Bonami (2003) ได้พัฒนาปรับปรุงวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (E-LISA); Sri Widada *et al.* (2003) และ Sri Widada *et al.* (2004) ได้พัฒนาวิธี dot-blot hybridization, *in situ* hybridization และ RT-PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *MrNV* นอกจากนี้วิธี dot-blot hybridization และวิธี single-step RT-PCR ยังได้ถูกพัฒนาให้ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ XSV อีกด้วย ซึ่งวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามก่อนที่จะนำมาผสมพันธุ์วางไข่ และในลูกกุ้งวัยอ่อนก่อนที่นำไปเลี้ยงในบ่อ การตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR พิสูจน์แล้วว่าเหมาะสมและแม่นยำที่สุดกว่าวิธีอื่นๆ (Sri Widada *et al.*, 2003, 2004; Sahul Hameed *et al.*, 2004; Yoganandhan *et al.* (2005) ได้พัฒนาการตรวจสอบ *MrNV* และ XSV โดยใช้วิธี single tube one-step multiplex RT-PCR assay และต่อมา Pillai *et al.* (2006) ใช้วิธี loop-mediated isothermal amplification ในการตรวจหาเชื้อ *MrNV* และ XSV

1.2 Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)

ตามปกติไวรัส IHHNV พบในกุ้งทะเล ได้แก่ *P. stylirostris*, *P. vannamei*, *P. monodon* และ *P. semisulcatus* (Lightner *et al.*, 1983; Bonami *et al.*, 1990; Shike *et al.*, 2000) ที่ผ่านมามีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมาซึ่งไม่เคยมีรายงานว่ามีไวรัสชนิดนี้เลยจนกระทั่ง Chia *et al.* (2006) รายงานว่าในช่วง มิถุนายน 2547 ถึง มกราคม 2548 ทางตอนใต้ของประเทศไต้หวัน พบการตายของลูกกุ้งอย่างมาก (80-100 เปอร์เซ็นต์) พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามพบ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเนื้อเยื่อบุผิวของท่อตับและตับอ่อน (hepatopancreatic tubular epithelial cells) ซึ่งแตกต่างจากลูกกุ้งในบ่อดินกล้ำเนื้อปล้องที่ 6 และแพนหาง เกิดการอักเสบ ลำตัวสีแดง แต่ไม่พบ eosinophilic intranuclear inclusion bodies ผลการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งก้ามกรามเกือบโตเต็มวัย ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยตรวจ IHHNV, HPV, WSSV, TSV, YHV, M_rNV และ XSV แต่ผลการตรวจพบ IHHNV nonstructural protein gene 389-bp และให้ผลบวกกับ in-situ hybridization โดยใช้ DIG-labelled DNA probe และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กับไต้หวันและอเมริกา ซึ่งผลลำดับนิวคลีโอไทด์ มีเปอร์เซ็นต์สูงถึง 99.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นรายงานแรกในการติดเชื้อ IHHNV ในลูกกุ้งและ กุ้งที่โตเกือบเต็มวัยที่ติดเชื้อโดยธรรมชาติ

1.3 Macrobrachium hepatopancreatic parvo-like virus (MHPV)

เป็นไวรัสที่พบในกุ้งก้ามกราม แต่ไม่มีส่วนสำคัญที่ทำให้กุ้งป่วยหรือตาย ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง (Anderson *et al.*, 1990) การวินิจฉัย MHPV โดยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบ inclusion body และนิวเคลียสรวมโต ภายในเซลล์เยื่อตับและตับอ่อน (Anderson *et al.*, 1990) ลักษณะเหมือนกับ hepatopancreatic parvovirus (HPV) ที่เป็นสาเหตุของโรคไวรัสในกุ้งทะเลกลุ่ม penaeid (Lightner and Redman, 1985; Lightner, 1988 a; Roubal *et al.*, 1989) แต่ MHPV ของกุ้งก้ามกราม มีลักษณะแตกต่างกับกุ้งที่ติดเชื้อ HPV เมื่อทำ in situ hybridization เพราะ genomic ของ HPV ไม่เป็นผลบวกกับ MHPV (Lightner, 1996)

Parvo-like virus ที่ชื่อว่า Macrobrachium muscle virus (MMV) มีรายงานในไต้หวัน (Tung *et al.*, 1999) เป็นไวรัสที่พบในกล้ามเนื้อเท่านั้น และกล้ามเนื้อที่มีการติดเชื้อจะมีการตายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ มีลักษณะเป็น inclusion bodies ติดสีน้ำเงินของอีมาทอกไซลินในไซโต

พลาซึม ของเซลล์กล้ามเนื้อลาย เมื่อมีการระบาดเกิดขึ้นอัตราตายอาจสูงเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2 สัปดาห์

1.4 White spot syndrome virus (WSSV)

WSSV หรือไวรัสดวงขาวพบในกุ้งก้ามกรามและเป็นสาเหตุของโรคกุ้งก้ามกราม (Lo *et al.*, 1996; Nunan *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998) เนื้อเยื่อเป้าหมายของไวรัสดวงขาวในกุ้งก้ามกรามคือ cuticular epidermis ในกระเพาะอาหาร เหงือก และตับและตับอ่อน (Chang *et al.*, 1998) แต่ในได้หวั่น Wang *et al.* (1998) ทำการทดลองใช้เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัส WSSV ทำเป็นอาหารให้สัตว์กลุ่ม decapods หลาย ๆ ชนิดกิน ผลการทดลองกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนไม่มีการตอบสนองกับเชื้อ และในการทดลองของ Rajendran *et al.* (1999) ใช้ WSSV จากกุ้งกุลาดำชายฝั่งทะเลตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย ใช้ทดสอบเชื้อกับกุ้งก้ามกรามและสัตว์ในกลุ่ม crustaceans อื่นๆ ทดสอบโดยทำการฉีดเชื้อไวรัส และให้กินเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อไวรัส ผลการทดลองมีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่แสดงอาการภายใน 70 วัน แต่สัตว์พวกนี้ สามารถทำให้กุ้งกุลาดำติดเชื้อได้สันนิษฐานว่า สัตว์พวกนี้เป็นพาหะ ต่อมา Sahul Hameed *et al.* (2000) ทำการทดลองการยอมรับการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิด คือ *M. idella*, *M. lamerrae* และ *M. rosenbergii* โดยการแช่ กิน และฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ผลจากการแช่เชื้อ WSSV พบว่ากุ้ง *M. lamerrae* มีอัตราการตาย 43.3 เปอร์เซ็นต์ และ *M. idella* มีอัตราการตาย 53.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการให้กินพบว่ากุ้ง *M. lamerrae* มีอัตราการตาย 53.3 เปอร์เซ็นต์ และ *M. idella* มีอัตราการตาย 66.7 เปอร์เซ็นต์ การฉีดเชื้อ WSSV เข้ากล้ามเนื้อทำให้กุ้ง *M. idella*, *M. lamerrae* *P. indicus* และ *P. monodon* มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกุ้งทะเลและกุ้งน้ำจืดมีการยอมรับการติดเชื้อ WSSV ยกเว้นกุ้ง *M. rosenbergii* ที่มีความทนทานต่อเชื้อ WSSV ทั้งโดยการแช่ กิน และฉีด ต่อมามีการศึกษาของ Kiran *et al.* (2002) พบว่ากุ้งก้ามกรามระยะโพสลาาร์วา กุ้งวัยรุ่นจนถึงกุ้งขนาดโตเต็มวัย มีการยอมรับการติดเชื้อ WSSV โดยการฉีด และกิน และให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR และทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ และลักษณะภายนอกของกุ้งในทุกระยะที่ติดเชื้อ WSSV มีดวงขาวบริเวณเปลือกคลุมหัว แต่จะชัดเจนมากในกุ้งระยะตัวเต็มวัย

ฝน (2550) ศึกษาการติดเชื้อไวรัส WSSV โดยวิธีการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV และการฉีด haemolymph จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ ในกุ้งทั้ง 2 วงศ์ คือวงศ์ Palaemonidae (กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii*) และ

Atyidae (กุ้งกะปิ) ไม่พบการติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติและจากการชักนำให้ติดเชื้อ WSSV สำหรับการชักนำโดยการฉีดและตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี PCR พบการติดเชื้อระดับต่างๆ ในกุ้งวงศ์ Palaemonidae การตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry เพื่อยืนยันผล พบว่ากุ้งฝอยน้ำเค็ม มีการติดเชื้อที่รุนแรงในปริมาณมาก ขณะที่กุ้งฝอยน้ำจืด และกุ้งก้ามกราม มีการติดเชื้อในปริมาณน้อย ขณะที่กุ้งวงศ์ Atyidae คือ กุ้งกะปิ *Caridina* sp. ไม่สามารถทดลองการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดได้เนื่องจากมีขนาดเล็ก ดังนั้นกุ้งในวงศ์ Palaemonidae โดยเฉพาะกุ้งฝอยน้ำเค็มน่าจะสามารถในการเป็นพาหะของ WSSV ได้ส่วนกุ้งฝอยน้ำจืดและกุ้งก้ามกรามสามารถติดเชื้อ WSSV แต่อาจมีกลไกในการกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวทำให้มีความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสชนิดนี้ได้

2. โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย (bacterial diseases)

โรคของกุ้งก้ามกรามที่เกิดจากแบคทีเรียพบได้ทั่วไปในบ่อเลี้ยงที่มีการจัดการเรื่องคุณสมบัติของน้ำและพื้นบ่อไม่ดี เนื่องจากส่วนใหญ่ยังเป็นการเลี้ยงแบบไม่มีเครื่องให้อากาศหรือมีเครื่องให้อากาศไม่เพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อ แบคทีเรียที่มีรายงานจากกุ้งก้ามกรามแสดงไว้ในตารางที่ 5 ปกติในกุ้งก้ามกรามจะติดเชื้อที่ผิวเปลือกของลำตัวหรือติดเชื้อภายในระบบต่างๆ ของร่างกาย ชนิดที่มีรายงานมักเป็นชนิดที่พบอยู่ทั่วไป ในลำไส้ของกุ้ง และที่มีอยู่ในน้ำหรือพื้นก้นถังในโรงเพาะฟัก (Anderson *et al.*, 1989) มีโอกาสทำให้เกิดโรคได้เมื่อสภาพการเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงไปในขณะนั้น แบคทีเรียที่ทำให้เกิดปัญหาในกุ้งที่สำคัญมีเพียงไม่กี่ชนิดเช่น โรคเช่น โรค black spot (brown spot, shell disease) พบได้ในกุ้งก้ามกรามทุกระยะ ลักษณะอาการที่เด่นชัด คือเป็นแผลสีดำบนผิวตัว ทำให้แบคทีเรียเข้าไปอยู่ในช่องว่างของแผล (Delves-Broughton and Poupard, 1976; Chan, 1979) แผลที่เกิดขึ้นอยู่ในชั้นผิวใต้เปลือกและในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จะมีสีดำเพราะมีการสะสมของเม็ดสี เนื่องจากเป็นกระบวนการอักเสบของปฏิกิริยา prophenol oxidase ที่เป็นระบบเป็นระบบป้องกันและตอบสนองกับการบุกรุกของแบคทีเรีย และการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อ ถ้าแผลดำอยู่ในโครงสร้างภายนอกตัว โอกาสที่จะหายกลับมาเป็นปกติง่าย โดยการลอกคราบของกุ้งครั้งต่อไป โรคจุดดำสามารถพบในกุ้งก้ามกรามทุกระยะ แต่ลักษณะของแผลมักสังเกตเห็นได้ง่ายและบ่อยในกุ้งช่วงวัยรุ่น และ กุ้งที่มีขนาดโต (Brock, 1993) มากกว่าในช่วงวัยอ่อน ถ้าในกรณีที่เป็นมากแผลจะลึกเป็น โปรงเข้าไปในเนื้อเยื่อและแพร่กระจายไปทั่วร่างกายของกุ้งได้ แผลจุดดำจะมีการระบาดมากขึ้นในฟาร์มที่มีการจัดการไม่ดี สภาพในบ่อมีกุ้งอยู่อย่างหนาแน่นมากเกินไป ทำให้สุขภาพของกุ้งไม่ดีพอ (Hipólito *et al.*, 1996)

การป้องกันโรคควรมีการจัดการด้านคุณภาพน้ำ และอาหารที่ให้รวมทั้งความหนาแน่นของกุ้งในบ่อที่เหมาะสม และต้องมีความระมัดระวัง ในระหว่างการจับกุ้งด้วย (Brock, 1993) El-Gamal *et al.* (1986) รายงานว่าการป้องกันโรคจุดดำทำได้โดยแช่กุ้งที่ป่วยใน oxolinic acid เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 ชั่วโมง oxolinic acid เป็นยาต้านจุลชีพที่สังเคราะห์ขึ้นมา (เป็นกลุ่ม quinolone) ซึ่งมีการออกฤทธิ์กว้างมักใช้กับแบคทีเรียแกรมลบ (Alderman, 1988) Daniels *et al.* (1992) พบว่า oxolinic acid มีประโยชน์ในการแก้ปัญหาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในบ่อเลี้ยง และยังช่วยกำจัดแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying bacteria ด้วย bacterial necrosis เป็นโรคที่มีรายงานโดย Aquacop (1977) และ Le Bitoux (1988) ลักษณะอาการเหมือนกับโรคจุดดำ แต่พบในกุ้งระยะวัยอ่อนเท่านั้น มีการตายของเนื้อเยื่อและมีการเกิดสีตามลำตัว และขาของกุ้ง ส่วนอาการอื่น ๆ จะพบว่าลำไส้ของลูกกุ้งไม่มีอาหาร และลำตัวมีสีน้ำตาล (Bueno and Gastelu, 1998) มีการตายของกล้ามเนื้อโดยแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (Le Bitoux, 1988) และถ้าการรักษาไม่ทันเวลาจะทำให้ลูกกุ้งตายเป็นจำนวนมาก ภายในเวลาไม่กี่วัน แบคทีเรียทำความเสียหายได้มากเมื่อความต้านทานของลูกกุ้งลดลงจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างกะทันหัน และการจัดการที่ไม่ดี การป้องกันจะต้องควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลทำให้ลูกกุ้งเครียด (Le Bitoux, 1988) มีรายงานการรักษาโดยใช้สารเคมี เช่น nifurpirinol ความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันตามลักษณะการรักษา (Aquacop, 1977; Brock, 1983; Le Bitoux, 1988; Bueno and Gastelu, 1998) แบคทีเรียมักเป็นสาเหตุรอง ไม่ใช่สาเหตุหลัก ในการทำให้กล้ามเนื้อและร่างกายของลูกกุ้งก้ำกวมตาย และแสดงอาการเหมือนกับโรคกุ้งอื่นๆ Brock (1993)

Lalitha and Surendran (2004) รายงานว่าปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งก้ำกวมในประเทศไทยอินเดียมากกว่าในน้ำ พบ Enterobacteriaceae ปริมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ของที่พบในกุ้งส่วนในน้ำพบแบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus*, *Bacillus*, coryneforms, และ *Arthrobacter* ส่วน faecal coliforms และ Enterococci ในกุ้งมีปริมาณแตกต่างกัน แบคทีเรียที่พบ อยู่ทั่วไป (microflora) ได้แก่ *Aeromonas* spp. and *Streptococcus* spp. ส่วนในประเทศไทยได้หวั่น ในปีพ.ศ. 2544 มีการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากยีสต์และการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย ในกุ้งก้ำกวมทำให้มีกุ้งตายถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะอาการของกุ้งที่ป่วยจะมีลำตัวสีเหลือง น้ำตาล เลือดและกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่น พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ป่วยมีการบวม (edema) และมีการแพร่กระจายของยีสต์ กล้ามเนื้อตาย มีการอักเสบทั้งในระดับและตับอ่อนและอวัยวะภายใน (Chen *et al.*, 2003)

สำหรับการทดลองการเกิดโรคในกุ้งก้ามกราม โดยการฉีดเชื้อ แบคทีเรีย *Aeromonas* หลายชนิดพบว่าทำให้กุ้งก้ามกรามเกิดโรคและตาย (Sung *et al.*, 2000) ส่วนการฉีดด้วย *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าทั้งในกล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อน พบแบคทีเรียกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านส่วนของกล้ามเนื้อ มีช่องว่างและพบกล้ามเนื้อตาย เซลล์ตับและตับอ่อน เกิดช่องว่างผิดปกติ และ นิวเคลียสมีการบวม โตขึ้นกว่าปกติ (hypertrophy) เซลล์บุท่อตับฝ่อ (atrophy) (Ramalingam and Ramarani, 2007)

มีรายงานในประเทศไต้หวันพบว่า แบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งก้ามกรามระยะ วัยรุ่น และระยะตัวเต็มวัย พบว่ามีอัตราการตายสะสม 25 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะภายนอกกุ้งที่ตายกล้ามเนื้อมีสีซีดขาว เมื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่า มีการบวม น้ำ และมีการตายของกล้ามเนื้อ เกิดการอักเสบทั้งบริเวณกล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อน (Wang *et al.*, 2008)

ตารางที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานการพบในกุ้งก้ามกราม

ชนิดของแบคทีเรีย	บริเวณที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Vibrio anguillarum</i>	ลำไส้	Colomi (1985)
<i>Aeromonas liquifaciens</i>	ถึงในโรงเพาะฟัก	Anderson <i>et al.</i> (1989)
<i>Vibrio</i> sp.		El-Gamal <i>et al.</i> (1986) Hipólito <i>et al.</i> (1996)
<i>Pseudomonas</i> sp.	แผลจุดดำพบในกุ้งทุกระยะ	
<i>Aeromonas</i> sp		
<i>Pseudomonas</i>	บริเวณแผลจุดดำ	Bueno and Gastelu (1998)
<i>Leucothrix</i>		
<i>Vibrio harveyi</i>	ลูกกุ้งก้ามกรามภายในโรงเพาะฟัก	Tonguthai (1992,1997) จิราพร และคณะ (2530)
Enterobacteriaceae	เปลือก กล้ามเนื้อพบ ลำไส้	Lalitha and Surendran (2004)
<i>Micrococcus</i>		
<i>Bacillus</i>		
<i>Coryneforms</i>		
<i>Arthrobacter</i>		
<i>Faecal coliforms</i>		

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรีย	บริเวณที่พบ	เอกสารอ้างอิง
<i>Enterococci</i>		
<i>Aeromonas</i> spp.		
<i>Streptococcus</i> spp.		
<i>Mycobacterium</i> sp.	ในโรงเพาะฟักของกุ้งก้ามกราม	Brock <i>et al.</i> (1986)
<i>Enterococcus</i> -like bacterium	กล้ามเนื้อ	Cheng and Chen (1998)
* <i>A. veronii</i> and <i>A. caviae</i>	ตับและตับอ่อน	Sung <i>et al.</i> (2000)
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	กล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อน	Ramalingam and Ramarani (2007)
<i>Lactococcus lactis</i>	กุ้งก้ามกรามระยะ juvenile และ ระยะตัวเต็มวัย	Wang <i>et al.</i> (2008)

หมายเหตุ * คือการติดเชื้อ

3. โรคที่เกิดจาก Rickettsia (rickettsial diseases)

โรคที่เกิดจาก rickettsia ที่รู้จักกันว่าโรค “white postlarval disease” ในลูกกุ้ง ระยะเวลาโพสลาว่า ในประเทศ Puerto Rico แต่สามารถรักษาโรคนี้ได้ การป้องกันการเกิดโรค แก้ปัญหาได้โดยการทำความสะอาดภายในโรงเพาะฟัก (Lacroix *et al.*, 1994) Da Silva *et al.* (1989) รายงานว่าโรคนี้ทำให้ลูกกุ้ง มีอัตราการตาย สูงมากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ลูกกุ้งที่ป่วยตับและตับอ่อนจะฝ่อมีการแนะนำให้ใช้ยา oxytetracycline ความเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม หรือ furazolidone 10 พีพีเอ็ม ในบ่ออนุบาลลูกกุ้งเพื่อป้องกันโรคนี้ (หมายเหตุ ปัจจุบันยาในกลุ่มไนโตรฟูเรนต์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาและกรมประมงห้ามใช้ในสัตว์น้ำที่นำมาเป็นอาหาร)

4. โรคที่เกิดจากเชื้อรา (fungal diseases)

เชื้อรา *Lagenidium* sp. สามารถทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก มีการติดเชื้อ และมีอัตราการตายเป็นจำนวนมาก ภายใน 24 ชั่วโมง (Gomes *et al.*, 1988) สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ ได้รวดเร็วโดยการสังเกตความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อรา ที่อยู่บนโครงร่างภายนอกของตัวกุ้ง ถ้าพบมากอาจทำให้ลูกกุ้งตายได้ มีสารเคมีหลายชนิดที่ช่วยป้องกัน *Lagenidium* sp. ได้ (Lightner,

1988a) และมีการใช้ยากำจัดวัชพืช trifluralin ในความเข้มข้น 10-100 ส่วนในพันล้านส่วน (พีพีพี) ในถึงเพาะพืชลูกทุ่งทะเลกลุ่ม penaeid และกุ้งก้ามกราม (Armstrong *et al.*, 1976; Lightner, 1988 b) และยังพบเชื้อรา *Fusarium solani* ที่บาดแผลบริเวณผิวหนัง (Burns *et al.*, 1979) สำหรับราที่พบทั่วไปในน้ำจืดคือ *Saprolegnia* sp. (Chien, 1976) พบอยู่ในตัวกุ้งที่ได้รับบาดเจ็บ

Chen (1995) และ Sung *et al.* (1998) รายงานถึงการตายของกุ้งก้ามกรามในบ่ออย่างรุนแรงในประเทศไต้หวัน สาเหตุจากการติดเชื้อ *Debaryomyces hansenii* และ *Metschnikowia bicuspidate* สีของกล้ามเนื้อจะมีสีเหลืองซีด น้ำเงินหรือสีเทาอ่อน พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือก กล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อน และเม็ดเลือด สภาพแวดล้อมที่ทำให้กุ้งเครียด และบางครั้งอุณหภูมิของน้ำอาจมีความเหมาะสมกับเชื้อราบางชนิดได้ (Hsu and Liu, 1994)

5. โรคที่เกิดจากปรสิต (parasitic diseases)

ปรสิตที่มีรายงานการพบในกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มโปรโตซัว ที่พบมากในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมักเป็นแบบมีขนสั้น (cillia) เช่น *Zoothamnium* sp. *Epistylis* sp. *Vorticella* sp. *Opercularia* sp. *Vaginicola* sp. *Cothurnia* sp. และ *Lagenophrys* sp. และพวกยี่ดเกาะ *Acineta* sp. *Podophrya* sp. *Tokophrya* sp. และ *Ephelota* sp. (Johnson 1982; Camacho and Chichilla, 1989)

รายงานเกี่ยวกับปรสิต ที่พบในกุ้งก้ามกรามค่อนข้างน้อย ที่มีรายงานคือ ปรสิตจำพวก isopods และหนอนตัวกลม ที่พบอยู่ในกุ้งก้ามกรามตามในธรรมชาติ Nash (1989) รายงานการพบปรสิตหนอนตัวกลมอยู่ในกล้ามเนื้อและมีเม็ดเลือดมารอบล้อมปรสิตเอาไว้เป็นแคปซูล เป็นผลมาจากการตอบสนองการป้องกันตัวของกุ้งก้ามกราม

6. โรคที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ

โศภา และสมเกียรติ (2531) กล่าวว่า จากการตรวจกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในบ่อดิน อำเภอ บางปลาหมอ จังหวัดสุพรรณบุรี ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2528 พบปรสิตภายนอกจำนวน 7 ชนิด คือ *Acineta* sp. *Epistylis* sp. *Glossatella* sp. *Lagenophrys* sp.

Zoothamnium sp. *Vorticella* sp. และ *Illinobdella* sp. แต่ปรสิตที่พบก็ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

สาหร่ายสีเขียว *Oedogonium* sp. และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Lyngbya* sp. ที่มีการนำในบ่อ เป็นสาเหตุทำให้กุ้งก้ามกรามมีพฤติกรรมเฉื่อยชา (Smith *et al.*, 1979)

Nash *et al.* (1987) พบลูกกุ้งก้ามกรามตายเนื่องจากกล้ามเนื้อขาขุ่นหรือที่เกษตรกรเรียกว่าโรคหลังขาวซึ่งมีกล้ามเนื้อตายเป็นบริเวณกว้างแต่ไม่รู้สาเหตุที่แน่ชัด (idiopathic muscle necrosis) และสรุปว่าอาจจะมาจากคุณสมบัติของน้ำเช่นแอมโมเนีย อยู่ในระดับที่สูงเป็นเวลานาน เช่นเดียวกับที่ Brock (1993) รายงานว่ากุ้งก้ามกรามมีลักษณะกล้ามเนื้อตาย โดยไม่รู้สาเหตุ โดยกล้ามเนื้อจะมีสีซีดที่หางและรยางค์

Pillai *et al.* (2005) ศึกษาลักษณะอาการภายนอกและศึกษาทางพยาธิสภาพของโรค branchiosegal blister disease (balloon disease หรือ BBD) ฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ที่ Nellore ของ Andhra Pradesh ประเทศอินเดีย อาการของโรคคือมีการบวมน้ำบริเวณเปลือกคลุมหัว และรยางค์กุดกร่อน เกษตรกรเรียกอาการของโรคนี้ว่าโรค balloon คือมีอาการเหงือกบวมน้ำ เมื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกพบว่ามีก้อน (cyst) ขนาดใหญ่ ภายในมีของเหลว ซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) เล็กน้อย จากการศึกษานี้พบว่าไม่มีการติดเชื้อของโรคใดๆ ซึ่งอาจเกิดจากคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะของไวรัสสองชนิดที่พบในกึ่งกล้ามเนื้อของประเทศไทย

ในระหว่างการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส MrNV และ XSV ในพ่อแม่พันธุ์ต่อกรอนุบาลลูกกึ่งกล้ามเนื้อได้พบ inclusion bodies ซึ่งเป็นลักษณะของการติดเชื้อไวรัสอีก 2 ชนิดในลูกกึ่งกล้ามเนื้อที่ปลอดเชื้อ MrNV จากโรงเพาะฟักแห่งหนึ่งในจังหวัดราชบุรี ในระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 จึงนำตัวอย่างลูกกึ่งชุดดังกล่าวมาศึกษา ในรายละเอียดของไวรัสทั้ง 2 ชนิด โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

นำลูกกึ่งกล้ามเนื้อระยะโพสตาเร็ว (กึ่งคว่ำ) มาดองในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ ในกรณีที่เป็นกึ่งกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ใช้เข็มฉีดยาน้ำยา Davidson's fixative เข้าไปที่บริเวณตับและตับอ่อน น้ำยาที่ฉีดเข้าตัวอย่างประมาณ 0.1-10 มิลลิลิตร ขึ้นกับขนาดของกึ่งจากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำยาดอง ปริมาตรและเวลาที่ใช้เช่นเดียวกับในวิธีการดองลูกกึ่ง เมื่อครบกำหนดย้ายตัวอย่างไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ตัดชิ้นเนื้อกึ่งบริเวณที่ต้องการศึกษา ได้แก่ ตับและตับอ่อน เหยือก กล้ามเนื้อ บรรจุใน embedding cassette แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration), clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (embedding) ตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำไปย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) จากนั้นทำเป็นสไลด์ถาวร (ภาคผนวก) แล้วนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

1.2 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM)

ดึงเปลือกคลุมบริเวณส่วนหัวของกึ่งออกจากนั้นใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัวโดยตัดเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ใน

น้ำยา 3 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ใน phosphate buffer เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้ายตัวอย่างไป post-fix ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ osmium tetroxide ใน phosphate buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้ว dehydrated ในเอทิลแอลกอฮอล์ ตั้งแต่ 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และล้างต่อ 2 ครั้งด้วย 100 เปอร์เซ็นต์ propylene oxide จากนั้นตัวอย่างไปผ่านกระบวนการฝังตัว (embed) ใน Epon-812 resin แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน 100 เปอร์เซ็นต์ epoxy resin

นำตัวอย่าง plastic block มาตัดด้วยเครื่อง ultra microtome โดยใช้ใบมีดที่เป็นเพชร (diamond-knife) ชั้นแรกตัด semi-thin sections ความหนาประมาณ 1 ไมโครเมตร ย้อมด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ toluidine blue และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง เพื่อหาตำแหน่งที่ต้องการไปตัด ultrathin sections ย้อมด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ uranyl acetate และสารละลาย 0.3 เปอร์เซ็นต์ lead citrate จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดลำแสงส่องผ่านรุ่น JEOL, JEM 1210 electron microscope 100 kV ณ ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 การตรวจหาการติดเชื้อไวรัส โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน

นำลูกกึ่งกำกรมที่ยังมีชีวิตมาทำให้สลบด้วยน้ำเย็น จากนั้นนำมาวางบนสไลด์ที่มีน้ำทะเลหรือน้ำเกลือที่สะอาด ใช้ใบมีดตัดส่วนลำตัวออกจากส่วนหัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำส่วนเปลือกคลุมหัวออกและนำส่วนของคืบและคืบอ่อนวางบนสไลด์หยดด้วยสารละลายมาลาไคท์กรีน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสง Olympus BX51 Microscope Digital System เพื่อศึกษาการติดเชื้อไวรัส โดยการสังเกต inclusion bodies ในคืบและคืบอ่อน

1.4 การตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อ baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ในลูกกึ่งกำกรมกับไวรัสในกลุ่ม baculovirus และ parvovirus ที่พบระบาดในประเทศไทย

ลุ่มลูกกึ่งในระหว่างการอนุบาลภายในโรงเพาะ มาสกัด DNA ของกึ่งโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Genemic DNA purification kit (Fermentas) และความเข้มข้นของตัวอย่าง DNA โดยใช้

เครื่องวัดความยาวที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ชุดตรวจสอบ Eze Gene kit (Shrimp Biotechnology Business Unit, Thai National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok) โดยตรวจไวรัสชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1.4.1 Monodon baculovirus (MBV) (Nested PCR MBV 523/361 IC Nested-PCR) ตามวิธีของ Belcher and Young (1998)

1.4.2 Hepatopancreatic parvovirus (HPV) (Nested PCR HPV 465/183 IC Single step PCR) ตามวิธีของ Phromjai *et al.* (2002)

2. การศึกษาการติดเชื้อ baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ในแม่พันธุ์และลูกกุ้งก้ามกราม

เก็บตัวอย่างลูกกุ้งและแม่พันธุ์ก้ามกรามจากโรงเพาะฟักจำนวน 5 แห่งในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และ จันทบุรี ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สถานที่เก็บตัวอย่างลูกกุ้งและแม่พันธุ์ก้ามกราม

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง
1) เพชรบุรี	ลูกกุ้งอายุ 10 วัน
	ลูกกุ้งอายุ 28 วัน
	ลูกกุ้งอายุ 30 วัน
	ลูกกุ้งอายุ 34 วัน
	แม่พันธุ์กุ้ง
2) ราชบุรี	ลูกกุ้งอายุ 10 วัน
	ลูกกุ้งอายุ 20 วัน
	ลูกกุ้งอายุ 22 วัน
	แม่พันธุ์กุ้ง

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง
3) สุพรรณบุรี	ลูกกึ่งอายุ 10 วัน ลูกกึ่งอายุ 17 วัน แม่พันธุ์กึ่ง
4) กาญจนบุรี	ลูกกึ่งอายุ 11 วัน ลูกกึ่งอายุ 26 วัน แม่พันธุ์กึ่ง
5) จันทบุรี	ลูกกึ่งอายุ 24 วัน ลูกกึ่งอายุ 28 วัน ลูกกึ่งอายุ 30 วัน ลูกกึ่งอายุ 31 วัน แม่พันธุ์กึ่ง

เก็บตัวอย่างลูกกึ่งและแม่พันธุ์มาศึกษาดังรายละเอียดดังนี้

2.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างลูกกึ่งจำนวน 50 ตัว และแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามจำนวน 20 ตัวต่อการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งในแต่ละช่วงเวลา มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ตามวิธีการศึกษาเช่นเดียวกับในข้อ 1.1

2.2 การตรวจหา BLV และ HPLV โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน

นำตัวอย่างลูกกึ่งก้ามกรามจำนวน 50 ตัวต่อการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งในแต่ละเวลาดังตารางที่ 5 มาศึกษาตามวิธีการศึกษาเช่นเดียวกับในข้อ 1.3

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อ baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่ออัตราการรอดตาย ลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก

ศึกษาในโรงเพาะฟักลูกกุ้งก้ามกราม ในกลุ่มเกษตรกรสมบูรณ์ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี นำแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่มีไข่แก่ (ไข่มีสีเทาเกือบเป็นสีดำ) จาก 2 แหล่ง ได้แก่ 1) โรงเพาะฟักจากจังหวัดเพชรบุรีซึ่งตรวจพบการติดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV (ภาพที่ 3 A,B) และ 2) โรงเพาะฟักจากจังหวัดจันทบุรีซึ่งให้ลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV จากการศึกษาในข้อ 2 (ภาพที่ 4 A,B) จากนั้นนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสทรงกลม ขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 ถัง แต่ละถังบรรจุน้ำที่มีความเค็ม 15 พีพีที ในปริมาตร 2.5 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้คลอรีนผง (แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์) มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ จากนั้นปล่อยแม่กุ้งจากแต่ละแหล่งลงเลี้ยง แหล่งละถัง ในอัตราความหนาแน่น น้ำหนักรวมแม่กุ้งรวมกัน ประมาณ 3 กิโลกรัมต่อถัง สุ่มกุ้งจำนวน 20 ตัวจากแต่ละถังมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว หลังจากแม่กุ้งจากแต่ละถังสลัดไข่แล้วลูกกุ้งฟักเป็นตัวจึงช้อนลูกกุ้งวัยอ่อนที่ได้จากแต่ละถังไปอนุบาลต่อถึงไฟเบอร์กลาส ขนาด 3 ลูกบาศก์เมตร บรรจุน้ำความเค็ม 15 พีพีที ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราความหนาแน่น 100,000 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร จำนวนแหล่งละ 3 ถัง อนุบาลลูกกุ้งโดยให้ไข่ตุ๋นและอาร์ทีเมียเป็นอาหารเป็นเวลานาน 22-25 วัน ทำการบันทึกข้อมูลอัตราการรอดตาย การเกิดโรคในระหว่างการอนุบาล

3.1 การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดตายและเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV ในลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก

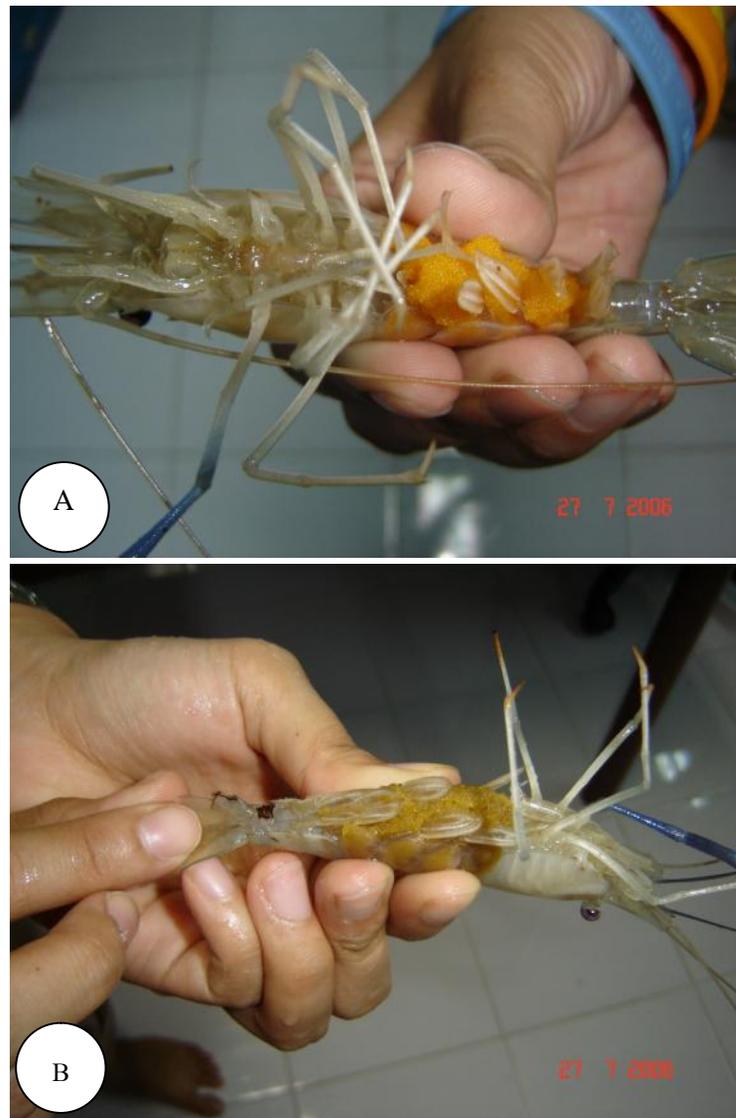
สุ่มลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ทั้ง 2 แหล่ง แหล่งละ 200 ตัว และแม่พันธุ์กุ้งจำนวน 20 ตัวโดยใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 1.1 จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ และระดับของการติดเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3.2 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM)

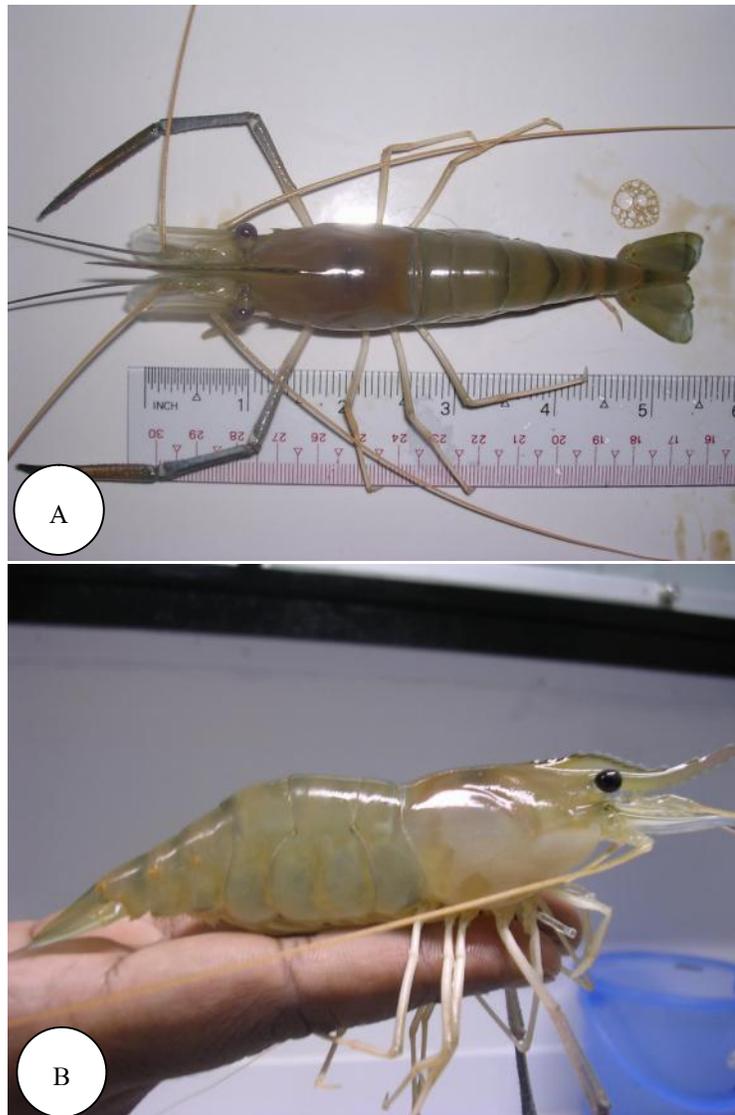
สุ่มตัวอย่างแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามจำนวน 10 ตัว และลูกกุ้งจำนวน 30 ตัว จากทั้ง 2 ชุด การทดลอง นำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน วิธีการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับในข้อ 1.2

3.3 การศึกษาคุณภาพน้ำในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม

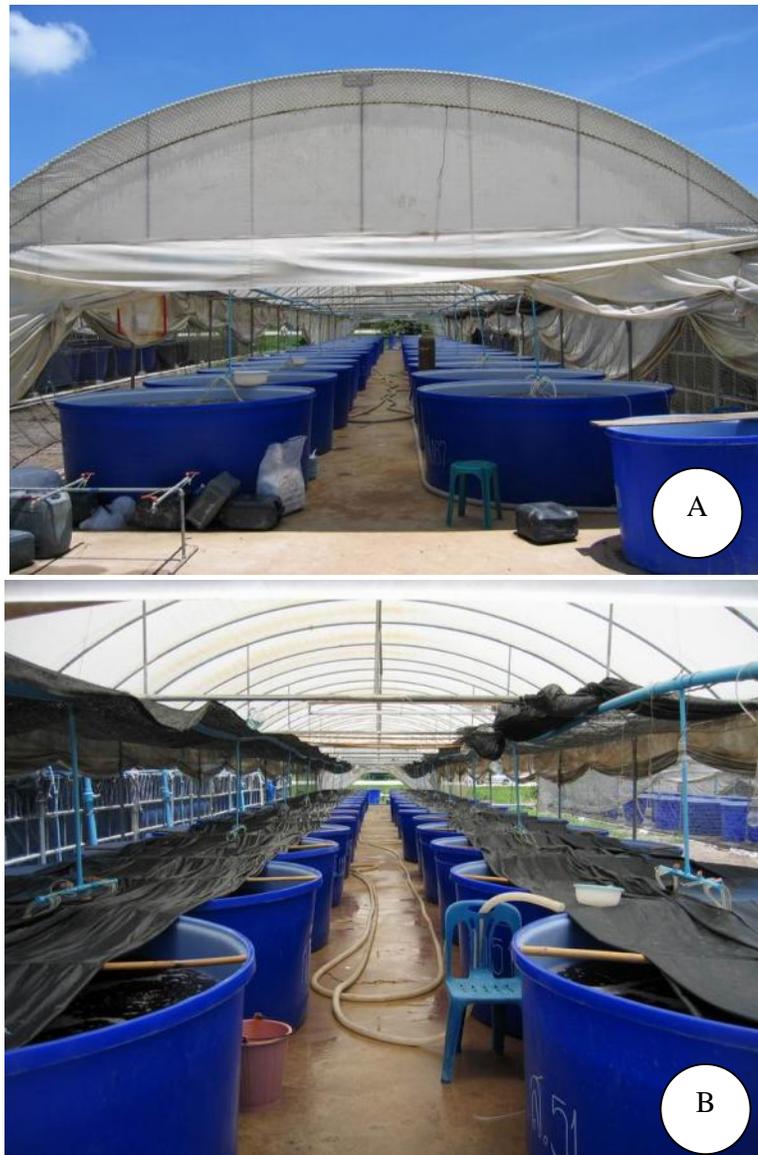
วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำในบ่ออนุบาลทุกถัง โดยเริ่มตั้งแต่วันก่อนซ็อนลูกวัยอ่อน หลังจากแม่กุ้งสลัดไข่ 1 วัน และ วันที่ 3, 7, 11, 15, 20 และ 25 ของการอนุบาล โดยวัดค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และอุณหภูมิของน้ำ โดยใช้เครื่อง YSI DO 200-4M พีเอช ของน้ำ วัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอช รุ่น Ecoscan Series pH 5.0 ความเค็ม และค่าการนำไฟฟ้า วัดโดยใช้เครื่อง YSI 30/10 FT ส่วนคุณสมบัติของน้ำอื่นๆ ตามวิธีการของ APHA *et al.* (1995) ได้แก่ ความเป็นด่างรวม วิเคราะห์โดยใช้วิธี titration ความกระด้างรวม วิเคราะห์โดยใช้วิธี EDTA titrimetric method ปริมาณแอมโมเนียรวม วิเคราะห์โดยใช้วิธี phenol-hypochloride method และปริมาณไนโตรเจนที่กคุณสมบัติของน้ำในทุกกลุ่มทดลอง



ภาพที่ 3 A,B แม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี (ชุดที่ 1)



ภาพที่ 4 A,B แม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรี (ชุดที่ 2)



ภาพที่ 5 A,B โรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 6 A,B ฉีดตัวอย่างกุ้งก้ามกรามด้วยน้ำยา Davidson's fixative เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

4. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย และปริมาณการติดเชื้อ baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) และผลผลิตในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบพัฒนา

ปล่อยลูกกุ้งระยะที่คว่ำแล้วจากแหล่งแม่พันธุ์ทั้ง 2 ชุดจากการทดลองที่ 3 ที่ผ่านการตรวจเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสว่าไม่มีไวรัส MrNV โดยที่ลูกกุ้งที่ได้จากแม่พันธุ์จังหวัดเพชรบุรีซึ่งพบการติดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV จะถูกปล่อยลงเลี้ยงบ่อดินขนาด 3 ไร่ (บ่อ P) และสำหรับลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จังหวัดจันทบุรี ซึ่งปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวจะถูกปล่อยลงเลี้ยงบ่อดินขนาด 3 ไร่ (บ่อ C) ในอัตราความหนาแน่น 60,000 ตัวต่อไร่ มีเครื่องให้อากาศแบบใบพัดตีน้ำแขนยาว 1 เครื่อง หลังจากอนุบาลลูกกุ้งนาน 60 วัน ใช้อวนตาดึงขนาดช่องตา 1.7 เซนติเมตร ลากลูกกุ้ง คัดลูกกุ้งไปเลี้ยงในบ่อใหม่ขนาด 3 ไร่ ในอัตราความหนาแน่น 10,000 ตัวต่อไร่ โดยกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จังหวัดเพชรบุรี (บ่อ P) เลี้ยงต่อบ่อ P1 และ บ่อ P2 และลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จังหวัดจันทบุรี (บ่อ C) แบ่งเลี้ยงเป็น 2 บ่อคือ บ่อ C1 และ บ่อ C2 เมื่อกุ้งมีอายุ 120 วัน ใช้อวนลากคัดเอากุ้งก้ามกรามเพศเมียที่สมบูรณ์ไปเลี้ยงไว้เป็นแม่พันธุ์ในบ่อดิน ส่วนกุ้งเพศเมียที่มีขนาดเล็กคัดเอาไปขาย ส่วน กุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรง จะคัดไปเลี้ยงในบ่อใหม่ โดยบ่อหมายเลข P1 และ P2 ทำการย้ายลงสู่บ่อขนาด 3 ไร่ หมายเลข P3 และ P4 ในอัตราความหนาแน่นไร่ละ 5,000 ตัว และกุ้งก้ามกรามเพศผู้จากบ่อหมายเลข C1 และ C2 ย้ายลงสู่บ่อขนาด 3 ไร่หมายเลข C3 และ C4 ในอัตราความหนาแน่นไร่ละ 5,000 ตัว แต่ละบ่อจะมีเครื่องให้อากาศแบบใบพัดตีน้ำแขนยาว 1 เครื่อง ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งก้ามกรามตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง และ จะมีการเติมจุลินทรีย์เพื่อบำบัดพื้นบ่อและวัสดุปูนเป็นระยะ ๆ จนกระทั่งจับกุ้ง โดยใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมด 180 วัน

4.1 การศึกษาปริมาณการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในตับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเลี้ยง

เริ่มสุ่มน้ำหนัก เก็บตัวอย่างกุ้งในแต่ละกลุ่มเพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน เมื่อกุ้งมีอายุ 60, 120, 150 และ 180 วัน โดยการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะแบ่งกุ้งออกเป็น 2 ขนาดคือขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ และเก็บตัวอย่างกุ้งแต่ละขนาดจำนวน ขนาดละ 20 ตัวอย่าง

4.2 การศึกษาปริมาณผลผลิต อัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ต่างกัน

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 180 วัน จึงจับกุ้งนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณหาอัตราการรอดตาย เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ลูกพันธุ์มีการติดเชื้อ BLV และ HPLV กับกลุ่มที่ลูกกุ้งไม่มีการติดเชื้อด้วยวิธี Independent Samples T Test (t-test) โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 for Windows

4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ทำการศึกษาค่าคุณสมบัติของน้ำที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในบ่อดิน ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ อุณหภูมิของน้ำ พีเอช ความเป็นด่างรวม ความกระด้างรวม ปริมาณแอมโมเนียรวม และปริมาณไนโตรที่ ซึ่งวิธีการศึกษาและเครื่องมือและวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดเช่นเดียวกันกับการศึกษาในข้อ 3.3 จากนั้นเปรียบเทียบระหว่างชุดข้อมูลด้วยวิธี Independent Samples T Test (t-test) โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 for Windows

ผลและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาลักษณะของไวรัสสองชนิดที่พบในกุ้งก้ามกรามของประเทศไทย

1.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

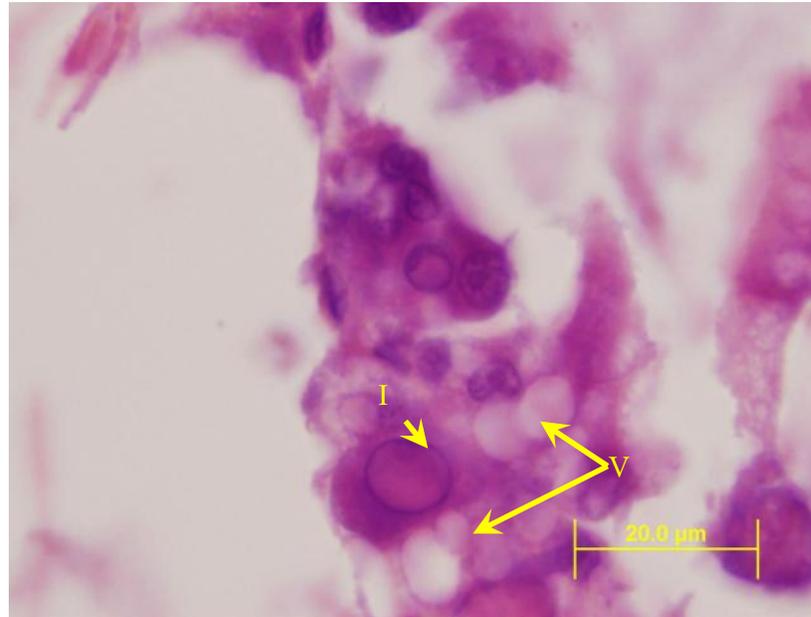
1.1.1 ดับและดับอ่อน

ลักษณะทางพยาธิสภาพของดับและดับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกราม ที่มีการติดเชื้อ พบ inclusion bodies ที่แตกต่างกัน 2 ลักษณะ ซึ่งลักษณะแรกพบว่านิวเคลียสของเซลล์ดับและดับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น (nuclear hypertrophy) กว่าปกติ มี inclusion bodies ย้อมติดสีแดงของอีโอซิน ซึ่ง inclusion ลักษณะนี้เคยมีรายงานในกุ้งทะเล penaeid shrimp (Lightner, 1996) และในกลุ่มปู (Huger and Krieg, 1991) โดยทั่วไปเรียกว่า baculoviruses หรือ baculovirus-like agents ในการศึกษาครั้งนี้จะเรียกว่า baculo-like virus (BLV) สำหรับในกุ้งก้ามกรามมีรายงานการพบ eosinophilic inclusion bodies ลักษณะเดียวกันนี้ในลูกกุ้งก้ามกราม (Nash *et al.*, 2003) ลูกกุ้งบางตัว จะพบ B-cell หรือ vacuolated cell มากซึ่งการที่พบ B-cell มากนั้นอาจหมายถึงกุ้งไม่สมบูรณ์ หรือไม่กินอาหารสอดคล้องกับรายงานของอนุตรา (2534) ที่รายงานว่าถ้ากุ้งอดอาหารนานๆ จะไม่พบไขมันใน R-cell และ F-cell มีขนาดเล็กกลง ในขณะที่ B-cell จะพบมากที่สุด (ภาพที่ 7)

ในส่วนของ inclusion bodies ที่พบอีกชนิดหนึ่งจะติดสีแดงของอีโอซิน พบใน R-cells และ E-cell ของเนื้อเยื่อดับและดับอ่อน (ภาพที่ 8) ซึ่งลักษณะ inclusion bodies มีตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นจนถึงระยะกำลังพัฒนา นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เนื่องจาก inclusion body มีขนาดใหญ่ขึ้น และจะย้อมติดสีแดงของอีโอซินในการศึกษาครั้งนี้จะเรียกว่า hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ซึ่งลักษณะคล้ายกับที่มีรายงานในเซลล์ของดับและดับอ่อนของกุ้งกุลาดำ คือ hepatopancreatic parvovirus (HPV) โดยไวรัส HPV จะสร้าง inclusion body ขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์และทำให้นิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้น และ เบียดให้นิวคลีโอไลต์และโครมาตินไปอยู่บริเวณขอบผนังของนิวเคลียส สามารถสังเกต inclusion body ของไวรัส HPV ได้ โดยการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยการย้อมสี H&E (ศุภกร, 2549; Flegel, 2006) สำหรับ HPV เชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้อุ้งกุลาดำแคะแกระแกร็นและทำให้ผลผลิตลดลง (Flegel *et al.*, 1999; 2004)

1.1.2 กล้ามเนื้อและอวัยวะอื่นๆ

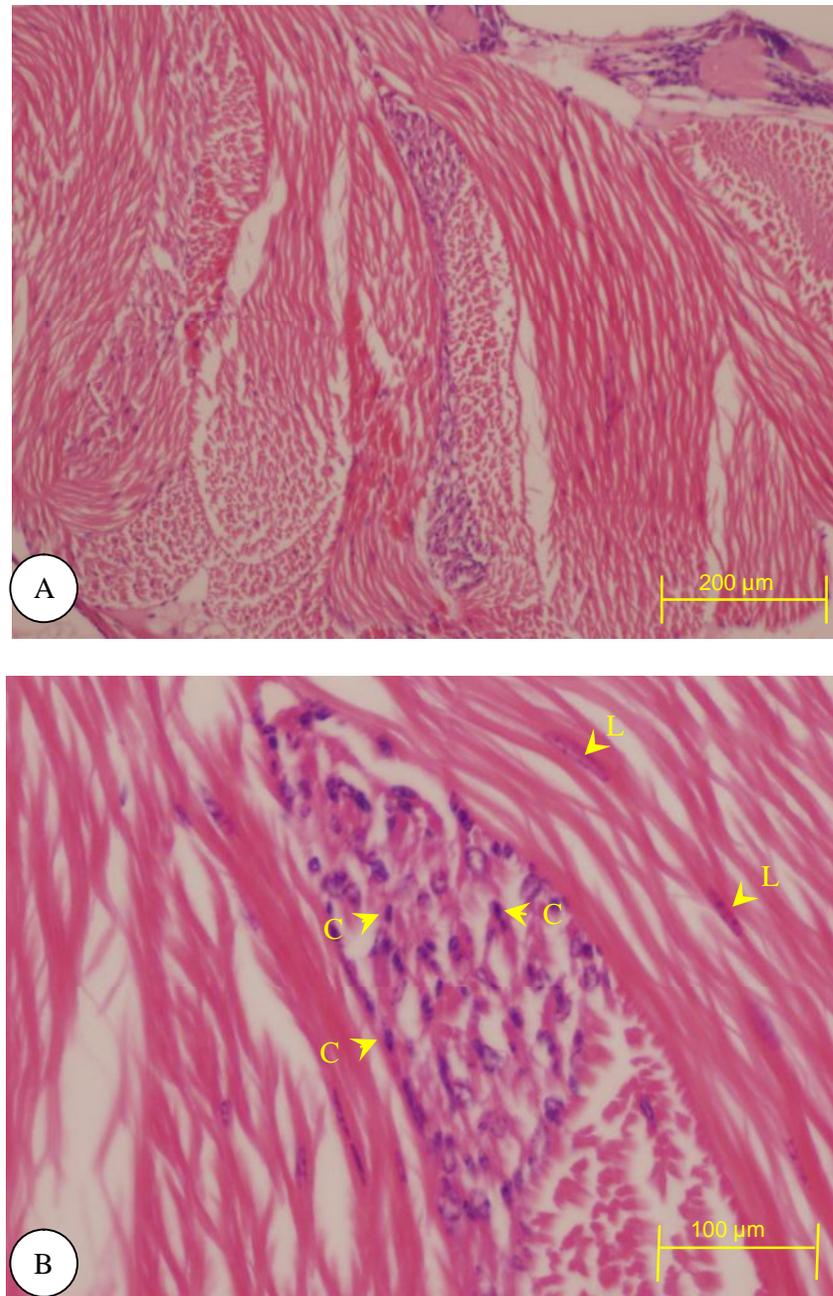
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ลูกกุ้งก้ามกราม ที่พบ inclusion bodies 2 ชนิดในตับและตับอ่อนนั้น ในส่วนของกล้ามเนื้อ ของลำตัวซึ่งเป็นกล้ามเนื้อลาย มีลักษณะปกติ นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินและอยู่ห่าง ๆ กัน ทำให้มองเห็นเฉพาะส่วนของไซโทพลาซึม ซึ่งจะติดสีชมพูชัดเจนจากการย้อมด้วย H&E (ภาพที่ 9) แตกต่างจากการศึกษาของศุภมาศ (2549) ซึ่งทำการศึกษาทางพยาธิสภาพของลูกกุ้งก้ามกรามที่มีอาการกล้ามเนื้อขาว ขุ่นจากการติดเชื้อไวรัส MrNV และ XSV โดยพบว่าการตายของกล้ามเนื้อในส่วนของ myofibril เป็นบางส่วนพบ pyknotic nucleus และ intranuclear inclusion bodies ในนิวเคลียสของกล้ามเนื้อที่ตายติดสีน้ำเงิน (basophilic intranuclear inclusion) สำหรับกุ้งก้ามกรามบางตัวจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเหงือกมีการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) มีการแทรกตัวของ hemocyte ในบริเวณเหงือกที่พบการอักเสบ (ภาพที่ 10 A,B) อย่างไรก็ตามกุ้งก้ามกรามทุกตัวในการศึกษานี้ไม่พบลักษณะการเกิด inclusion bodies ที่บริเวณเหงือก และไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียหรือปรสิตภายนอกบริเวณผิวหนังของลูกกุ้ง



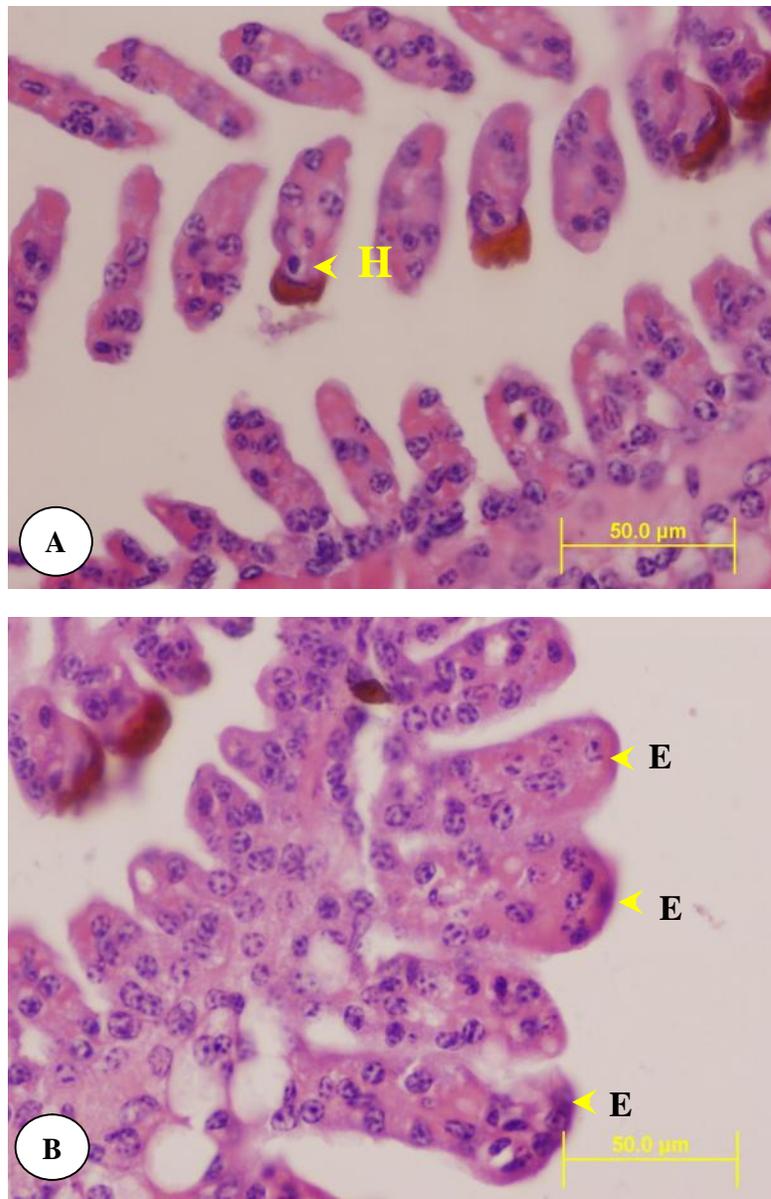
ภาพที่ 7 Inclusion bodies ของ BLV (I) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งกำกรมพบ B-cell หรือ Vacuolated cell มาก (V) (H&E)



ภาพที่ 8 Inclusion bodies ของ HPLV (สรชี้) ติดสีแดงของอิโอสซิน ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่ง (H&E)



ภาพที่ 9 พยาศภาพของกล้ามเนื้อลำตัวมีลักษณะปกติ นิลเทศิตตสิน้ำเงิน (Cross; C, Longitudinal; L) (H&E)

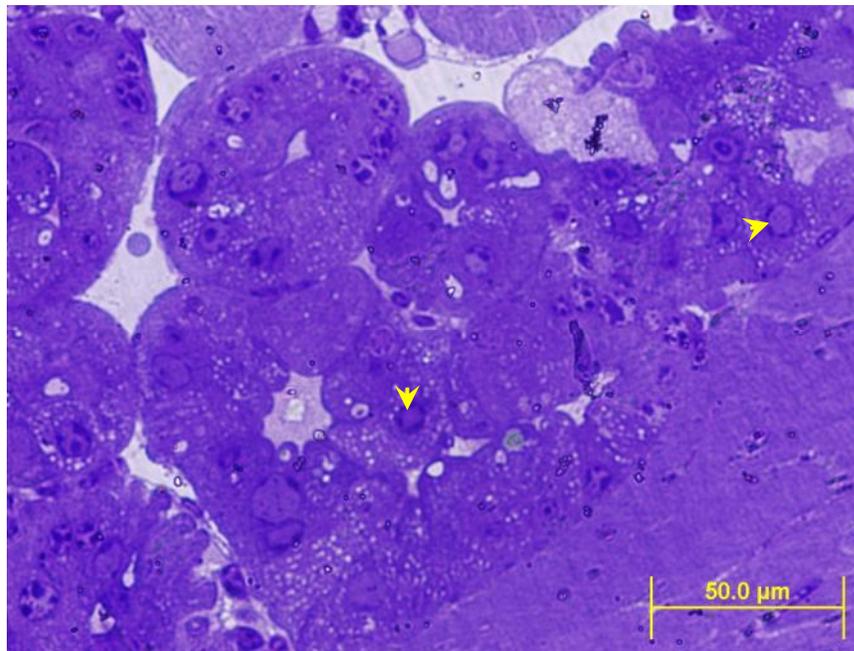


ภาพที่ 10 A,B พยาธิสภาพของเหงือกที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) มี hemocyte (H) บริเวณที่มีการอักเสบเริ่มแรก (E) (H&E)

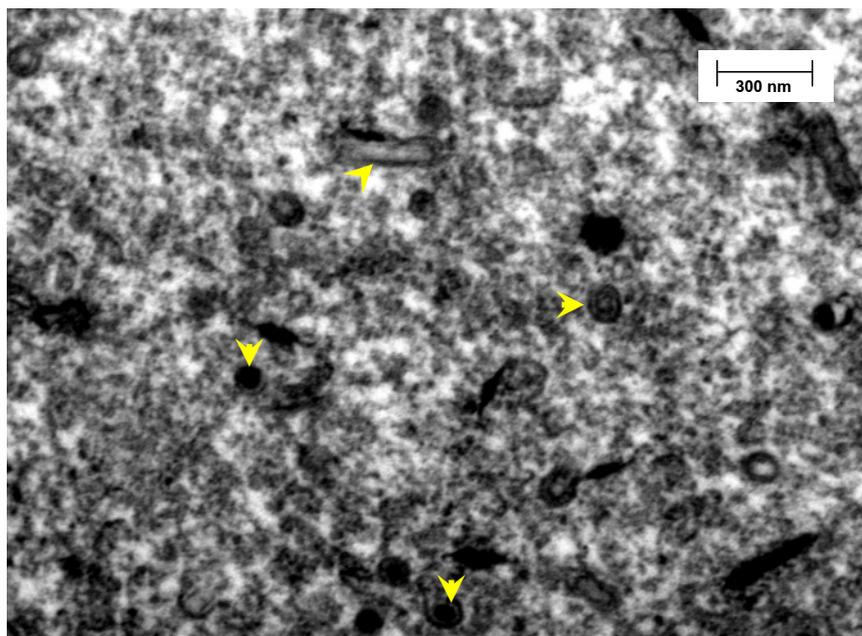
1.2 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM)

จากการศึกษา semi-thin sections ย้อมด้วยสี toluidine blue ของตับและตับอ่อนลูกกึ่งก้ามกรามที่ติดเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง พบ inclusion bodies 2 ชนิด โดยชนิดแรกมีลักษณะคล้าย inclusions ของกลุ่ม baculoviruses ในการศึกษาครั้งนี้เรียกว่า baculo-like virus (BLV) (ภาพที่ 11) ในขณะที่ inclusions อีกชนิดหนึ่งซึ่งมีลักษณะคล้าย inclusions ของกลุ่ม parvoviruses ในที่นี้เรียกว่า hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) (ภาพที่ 13) ซึ่งลักษณะของ inclusion bodies ของไวรัสแต่ละชนิดคล้ายกับการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ย้อมด้วย H&E โดย inclusion bodies ของ BLV มีลักษณะเต็มเซลล์นิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น และ inclusion bodies ของ HPLV พบว่านิวเคลียสของตับและตับอ่อนขยายใหญ่ขึ้น และบีบคั้นนิวคลีโอลัสและโครมาตินไปอยู่บริเวณขอบผนังของนิวเคลียส และพบตั้งแต่ระยะเริ่มต้นและระยะพัฒนาเช่นเดียวกัน

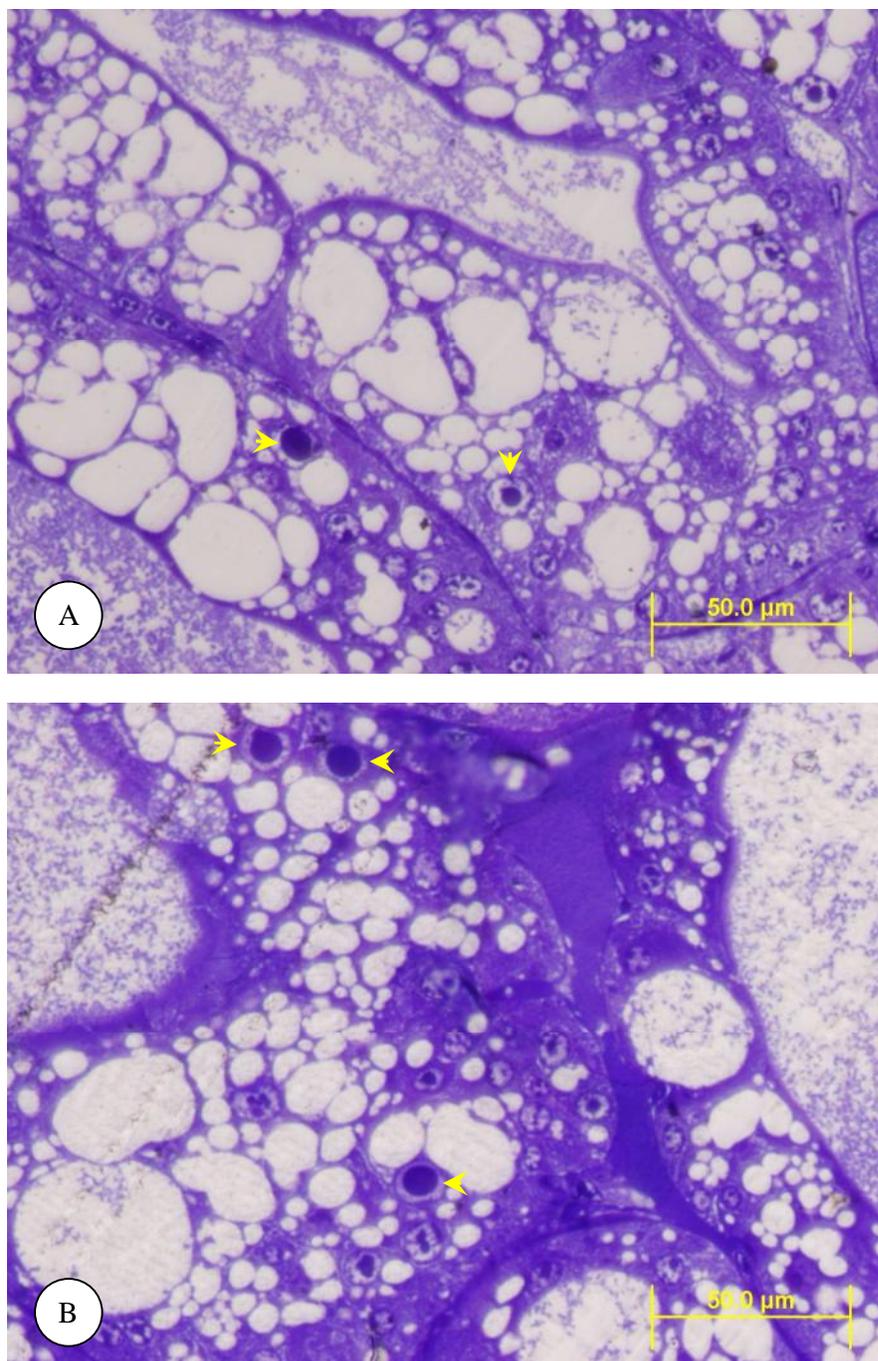
เมื่อนำ ultra thin sections ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน พบว่าอนุภาคของ BLV มีลักษณะแบบแท่ง (rod-shaped) มี enveloped ขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70-75 นาโนเมตร อยู่ในนิวเคลียส โครมาตินชิดขอบเซลล์ (ภาพที่ 12) ลักษณะของไวรัสคล้ายกับที่เคยมีรายงานซึ่งเรียกว่า baculovirus penaei (Lightner, 1993; 1996) จากกุ้งขาวแวนนาไม และคล้ายกับที่เคยมีรายงานใน กุ้งกุลาดำ (*P. monodon* nucleopolyhedrovirus ; PemoNPV หรือ monodon baculovirus; MBV) ในประเทศไทย (Fegan *et al.*, 1991; Flegel, 2006) โดยไวรัสดังกล่าวที่พบในกุ้งทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิต polyhedral occlusion bodies (OB) ได้ แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งไม่พบลักษณะเป็น OB และสำหรับ inclusion bodies ของ HPLV จาก ultrathin sections พบว่าภายใน inclusion มีอนุภาคคล้ายไวรัสอัดตัวกันแน่น เป็นไวรัสไม่มี ไม่มีผนังหุ้ม (nonenveloped) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-24 นาโนเมตร (ภาพที่ 14) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับอนุภาคของ HPV ที่มีรายงานในกุ้งทะเลสกุล *Penaeus* (Lightner, 1993; Flegel, 2006) ซึ่ง HPV เป็นไวรัสขนาดเล็กไม่มีผนังหุ้ม ชนิด DNA สายเดี่ยว (ssDNA) จัดอยู่ในกลุ่มพาร์โวไวรัส (parvovirus) อยู่ในวงศ์ Parvoviridae อนุภาคไวรัส HPV มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 – 24 นาโนเมตร มีรูปร่างแบบ icosahedral (Sukhumsirichart *et al.*, 1999; Flegel, 2006)



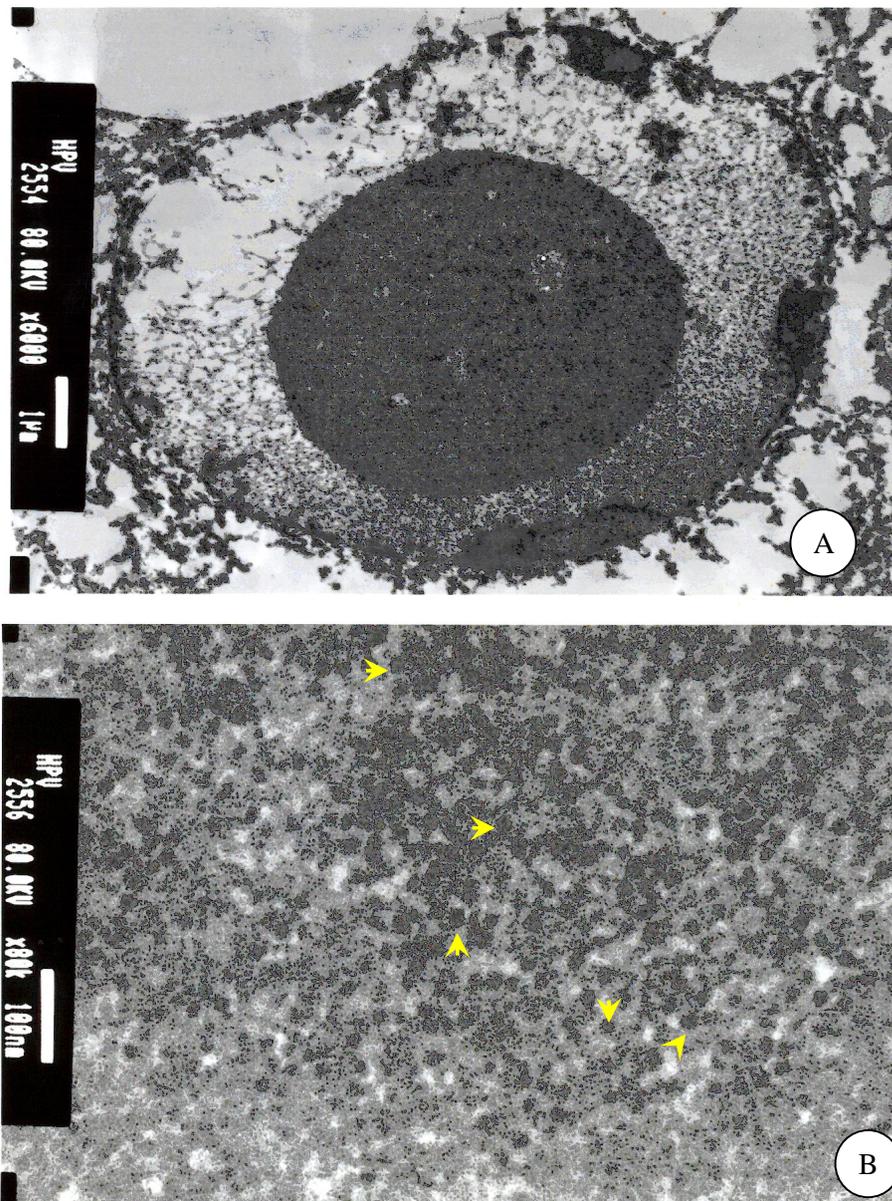
ภาพที่ 11 ภาพจาก semi-thin section ย้อมด้วย toluidine blue พบ inclusion bodies ของ BLV (ศรีษี) ลักษณะเต็มเซลล์ในตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคม



ภาพที่ 12 อนุภาคไวรัสของ BLV ขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 70-75 นาโนเมตร (ศรีษี) ในตับและตับอ่อนของลูกกิ้งก่ามกราคม



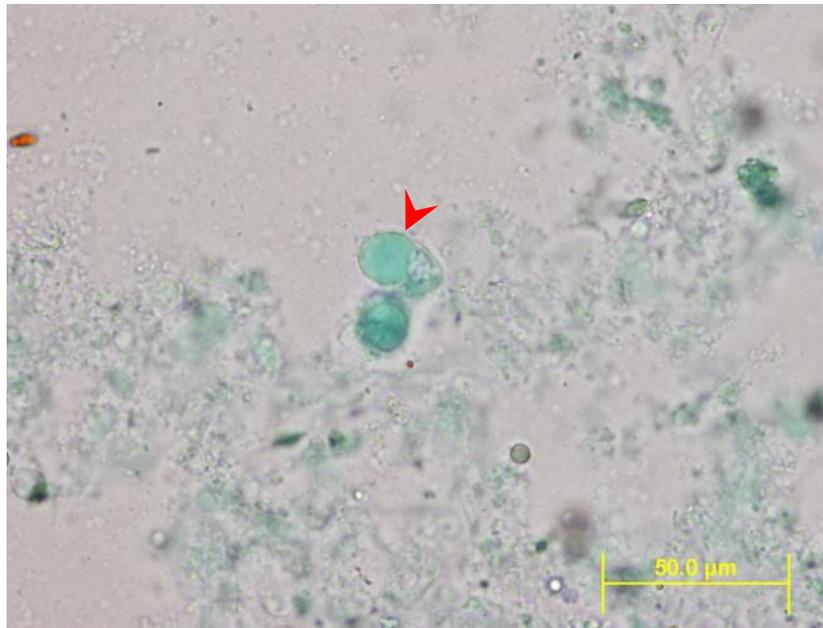
ภาพที่ 13 A,B Semi-thin section ย้อมด้วย toluidine blue พบ inclusion bodies (ครี) ของ HPLV นิวเคลียสของเซลล์ต้นและต้นอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ



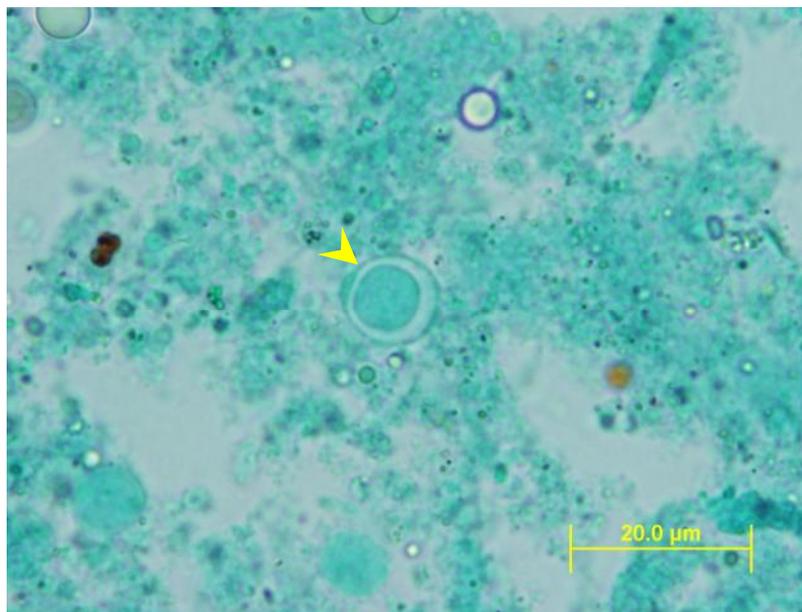
ภาพที่ 14 A,B อนุภาคไวรัสของ HPLV ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-24 นาโนเมตร ใน
ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคม (ศรีษี)

1.3 การตรวจหาการติดเชื้อไวรัส โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน

จากผลการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามทำให้ทราบว่าไวรัสที่พบในกึ่งกรามครั้งนี้อยู่ในกลุ่ม baculovirus และ กลุ่ม parvovirus ซึ่งที่ผ่านมามีรายงานเกี่ยวกับวิธีการตรวจสอบไวรัสทั้ง 2 กลุ่มอย่างง่าย ๆ ในลูกกึ่งทะเลโดยใช้วิธีการย้อมสีด้วยมาลาไคท์กรีน โดยกึ่งที่ติดเชื้อ baculovirus และ parvovirus จะสังเกตเห็น occlusion body และ inclusion body ย้อมติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีนอย่างชัดเจนแตกต่างกับเม็ดไขมันทั่วไปในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งซึ่งย้อมไม่ติดสี (Flegel, 2003) สำหรับผลการศึกษาครั้งนี้พบ inclusion bodies ของ BLV ลักษณะเต็มเซลล์ภายในเซลล์ตับและตับอ่อน ซึ่งติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีน แต่ไม่พบลักษณะที่เป็น OB เหมือนกับที่เคยมีรายงานในกึ่ง กูลาคำ (ภาพที่ 15) และพบลักษณะ inclusion bodies ของ HPLV นิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ (ภาพที่ 16) จากผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าวิธีการย้อมสีด้วยมาลาไคท์กรีนเป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในลูกกึ่งก้ามกรามและเป็นอีกวิธีที่เกษตรกรทั่วไปสามารถทำการตรวจสอบได้เอง



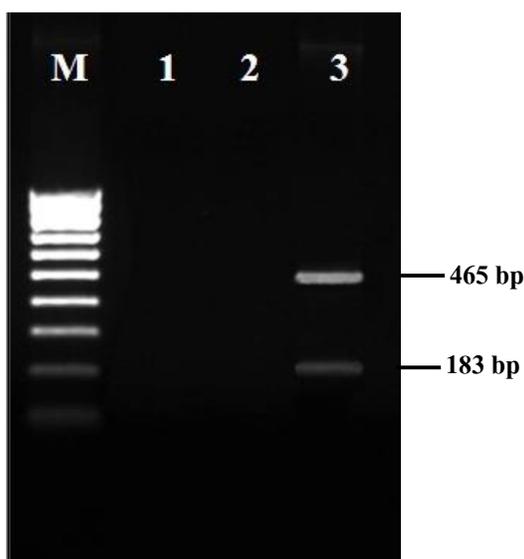
ภาพที่ 15 Inclusion bodies ของ BLV (ศรีษี) ในดับและดับอ่อนของลูกกึ่งกำมารวมโดยการ
ย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน



ภาพที่ 16 Inclusion bodies ของ HPLV และนิวเคลียสของเซลล์ดับและดับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น
กว่าปกติ (ศรีษี) จากการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน

1.4 การตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อ BLV และ HPLV ในลูกกึ่งกำมกรามกับไวรัสในกลุ่ม baculovirus และ parvovirus ที่พบระบาดในประเทศไทย

ผลการตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดที่พบในลูกกึ่งกำมกรามครั้งนี้กับไวรัสในกลุ่ม baculovirus (ได้แก่เชื้อ MBV) และไวรัสในกลุ่ม parvovirus (ได้แก่เชื้อ HPV) ซึ่งพบระบาดอย่างแพร่หลายในกึ่งทะเลของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแสดงไว้ดังภาพที่ 17-18 พบว่าเชื้อ BLV และ HPLV ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีความแตกต่างกับไวรัส MBV และ HPV ที่พบระบาดในกึ่งทะเลของประเทศไทย



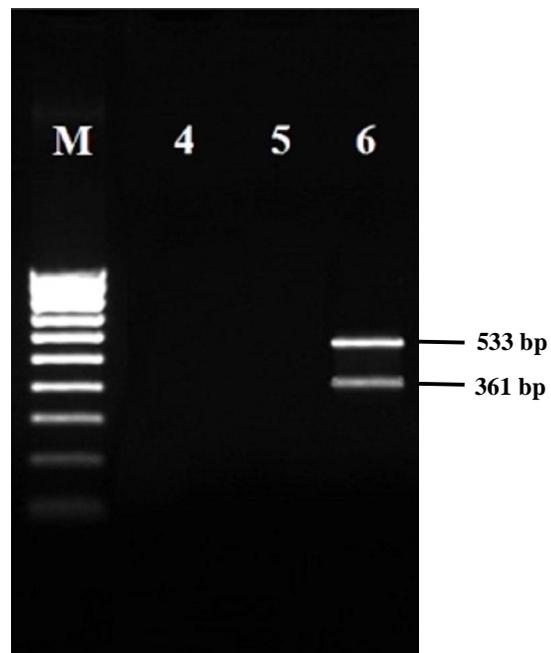
ภาพที่ 17 ผลการทดสอบการติดเชื้อ hepatopancreatic parvo virus (HPV) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Lane M: 100 bp DNA Marker

Lane 1: ตัวอย่าง DNA ของลูกกึ่งกำมกรามที่ใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ให้ผลเป็นลบ

Lane 2: HPV Negative Control

Lane 3: HPV Positive Control (465 bp, 183 bp)



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบการติดเชื้อ monodon baculovirus (MBV) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Lane M: 100 bp DNA Marker

Lane 4: ตัวอย่าง DNA ของลูกกุ้งก้ามกรามที่ใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ MBV ให้ผลเป็นลบ

Lane 5: MBV Negative Control

Lane 6: MBV Positive Control (533 bp, 361 bp)

2. การศึกษาการติดเชื้อ baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus ในแม่พันธุ์และลูกกุ้งก้ามกราม

2.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ผลการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อดับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามและแม่พันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ พบว่าลูกกุ้งและแม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรีเท่านั้นที่มีการพบ การติดเชื้อ BLV และ HPLV ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนลูกกุ้งและแม่พันธุ์ก้ามกรามจากจังหวัดราชบุรีพบเพียงการติดเชื้อ HPLV เท่านั้น ในขณะที่แม่พันธุ์ก้ามกรามจากจังหวัดเพชรบุรีมีการติดเชื้อทั้ง BLV และ HPLV ซึ่งลักษณะทางพยาธิสภาพของลูกกุ้งที่มีการพบเชื้อ BLV จากจังหวัดเพชรบุรีพบลักษณะ intranuclear inclusion bodies ของ BLV มีลักษณะเต็มเซลล์ติดสีแดงของอีโอซิน และด้านส่วนของโครมาตินชิดขอบเซลล์ (ภาพที่ 19-20) ซึ่งจะเหมือนกันกับการศึกษาใน ข้อ 1.1 แต่จะแตกต่างกับการเกิด occlusion bodies ของ MBV ที่เคยมีรายงานในกุ้งกุลาดำซึ่งในระยะแรกโครมาตินและนิวคลีโอลัสถูกดันให้เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ผนังนิวเคลียส (marginated chromatin) พบอนุภาคไวรัสอิสระอยู่ในนิวเคลียส และไวรัสเริ่มสร้างผลึก polyhedrin จะสังเกตเห็นเป็น occlusion body รูปร่างกลม แต่ยังมีขนาดเล็ก ปรากฏขึ้นในนิวเคลียส ซึ่งเมื่อย้อมด้วยสี H&E จะเห็น occlusion body เป็นเกล็ดสีชมพูเล็กๆ (eosinophilic occlusion body) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยเล็กๆ ของพาราคริสตัลไลน์ (paracrystalline) และพบอนุภาคไวรัสฝังตัวอยู่ใน occlusion body ด้วย ระยะพัฒนาพบว่าขนาดของนิวเคลียสขยายใหญ่มากขึ้นอีก ส่วนโครมาตินและนิวคลีโอลัสหดเล็กลง บางส่วนเริ่มแตกสลาย และถูกอัดแน่นจนแทบเป็นส่วนหนึ่งของผนังนิวเคลียส ส่วนเนื้อที่ภายในของไซโตพลาสซึมลดลงมาก เพราะว่ามี vacuole ขนาดใหญ่เกิดขึ้น ซึ่งต่อเนื่องมาจากที่ occlusion body ของไวรัส MBV ในนิวเคลียส ขยายใหญ่ขึ้นและมีหลายก้อน และ occlusion body ติดสีแดงเข้มของอีโอซิน (Anderson *et al.*, 1978; Johnson *et al.*, 1983; Lightner *et al.*, 1983, 1990; Johnson and Lightner, 1988; Nash *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1989) ในขณะที่ BLV ที่พบในกุ้งก้ามกรามจากการศึกษารังนี้้นั้นไม่มีการเกิด occlusion body ของไวรัสในลักษณะที่เป็นหลายก้อน แต่อนุภาคของไวรัสอัดกันแน่นอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนซึ่งติดสีแดงของอีโอซิน สำหรับพยาธิสภาพของลูกกุ้งก้ามกรามที่มีการพบเชื้อ HPLV จากทั้งเพชรบุรีและราชบุรี พบ inclusion bodies ของ HPLV ในเซลล์ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 21 A, B) โดย inclusion bodies ที่พบมีลักษณะคล้ายกับ HPV ในกุ้งกุลาดำ (Lightner, 1985; Sindermann and Lightner, 1988) โดย HPLV จะสร้าง inclusion body ขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์และทำให้นิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้น และบีบคั้นนิวคลี

โอลลิสและโครมาติน ไปอยู่บริเวณขอบผนังของนิวเคลียส เมื่อกุ้งเริ่มติดเชื้อไวรัส HPLV ในระยะเริ่มต้นหรือในขณะที่ยังติดเชื้อไวรัสกำลังพัฒนา พบ inclusion body จะมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 22) เมื่อย้อมด้วยสีย้อม H&E จะติดสีแดงของอีโอซิน (acidophilic inclusion body)

ผลการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกุ้งและแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามจากจังหวัด สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และจันทบุรี ไม่พบการติดเชื้อ BLV และ HPLV แต่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อดังนี้ คือ ลูกกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสุพรรณบุรี อายุ 10 วัน ตับและตับอ่อนมีขนาดเล็กลง (atrophy) เม็ดไขมันมีปริมาณน้อยมากสังเกตจากช่องว่างในเซลล์ ตับมีน้อย (ภาพที่ 23) และพบการเกิด melanization (ภาพที่ 24 A,B) ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งเมื่อมีสิ่งแปลกปลอม หรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) โดยเซลล์เม็ดเลือดจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอม ทำให้เกิดเป็น nodule ขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย พร้อมทั้งเกิดการสร้างเม็ดสี melanin จากกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ซึ่งการเกิด melanization มีรายงานครั้งแรกในกุ้งในสกุล *Penaeus* ที่เป็นโรค โดยจะพบในบริเวณที่มีการอักเสบ (Lightner and Redman; 1977) ลูกกุ้งบางส่วนพบ โปรโตซัว *Epistylis* sp. เกาะอยู่ที่บริเวณเหงือก (ภาพที่ 25) โปรโตซัวเหล่านี้มักจะปนมากับน้ำที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อหรือติดมากับอาหารของลูกกุ้ง เช่นติดมากับเปลือกอาร์ทีเมีย ตามปกติเมื่อกุ้งลอกคราบ โปรโตซัวเหล่านี้ก็จะหลุดไปกับคราบด้วย แต่ถ้าหากยังไม่ถูกกำจัดออกจากบ่อ โปรโตซัวกลุ่มนี้ก็จะเข้าไปเกาะตัวกุ้งใหม่ ถ้ามีเป็นจำนวนมากบริเวณเหงือกก็อาจจะทำให้การหายใจของกุ้งไม่สะดวก กุ้ง จะอ่อนแอลอกคราบช้าลง หรือไม่ลอกคราบทำให้กุ้งไม่โต และอาจถึงตายได้ โดยลูกกุ้งบางส่วนพบ ลักษณะคล้ายกับกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ในท่อของตับและตับอ่อน (ภาพที่ 26) ในขณะที่ลูกกุ้งบางส่วนตับและตับอ่อนมีความสมบูรณ์โดยดูจากมีเม็ดไขมันในปริมาณมาก (ภาพที่ 27) สำหรับลูกกุ้งก้ามกรามจากจังหวัด กาญจนบุรี ในกลุ่มที่อายุ 11 วัน พบลักษณะคล้ายกับกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ในท่อของตับและตับอ่อนเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 28) ในขณะที่กลุ่มลูกกุ้งอายุ 26 วัน พบการติดเชื้อ microsporidian ในเซลล์ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 29) อีกทั้งยังพบการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย (ภาพที่ 30)

2.2 การตรวจหา BLV และ HPLV โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน

จากการศึกษาการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในลูกกึ่งกำกรมโดยการย้อมสีด้วยมาลาไคท์กรีนพบว่าลูกกึ่งจากจังหวัดเพชรบุรีพบ การติดเชื้อ BLV และ HPLV ในขณะที่ลูกกึ่งกำกรมจากจังหวัดราชบุรีพบเพียงการติดเชื้อไวรัส HPLV เท่านั้น โดยลักษณะ inclusion bodies ของ HPLV ที่พบจะมีลักษณะเกือบเต็มเซลล์และติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีน อย่างชัดเจน (ภาพที่ 31-32) ในขณะที่ลักษณะ inclusion bodies ของ BLV ที่จะพบลักษณะเต็มเซลล์และติดสีเขียวของมาลาไคท์กรีนไม่เข้มเท่ากับการติดสีของ HPLV (ภาพที่ 33) ทำให้บางครั้งจะแยกลักษณะ inclusion bodies ของ BLV กับลักษณะของเม็ดไขมันที่พบในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งได้ยาก โดยเฉพาะเกษตรกรทั่วไปซึ่งไม่มีความชำนาญอาจทำให้เกิดปัญหาการวินิจฉัยที่ผิดพลาดได้ แตกต่างกับ HPLV ที่สามารถเห็น inclusion bodies ได้ชัดเจนจากการย้อมสีด้วยมาลาไคท์กรีน

ตารางที่ 6 ผลการตรวจการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในลูกกึ่งและแม่กึ่งกำกรม โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและการตรวจโดยการย้อมสีมาลาไคท์กรีน

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ		มาลาไคท์กรีน	
		BLV	HPLV	BLV	HPLV
1) เพชรบุรี	ลูกกึ่งอายุ 10 วัน		-		-
	ลูกกึ่งอายุ 28 วัน				
	ลูกกึ่งอายุ 30 วัน	-		-	
	ลูกกึ่งอายุ 34 วัน		-		-
	แม่พันธุ์				
2) ราชบุรี	ลูกกึ่งอายุ 10 วัน	-	-	-	-
	ลูกกึ่งอายุ 20 วัน	-		-	
	ลูกกึ่งอายุ 22 วัน	-		-	
	แม่พันธุ์	-		-	
	ลูกกึ่งอายุ 10 วัน	-	-	-	-
3) สุพรรณบุรี	ลูกกึ่งอายุ 17 วัน	-	-	-	-
	แม่พันธุ์	-	-	-	-

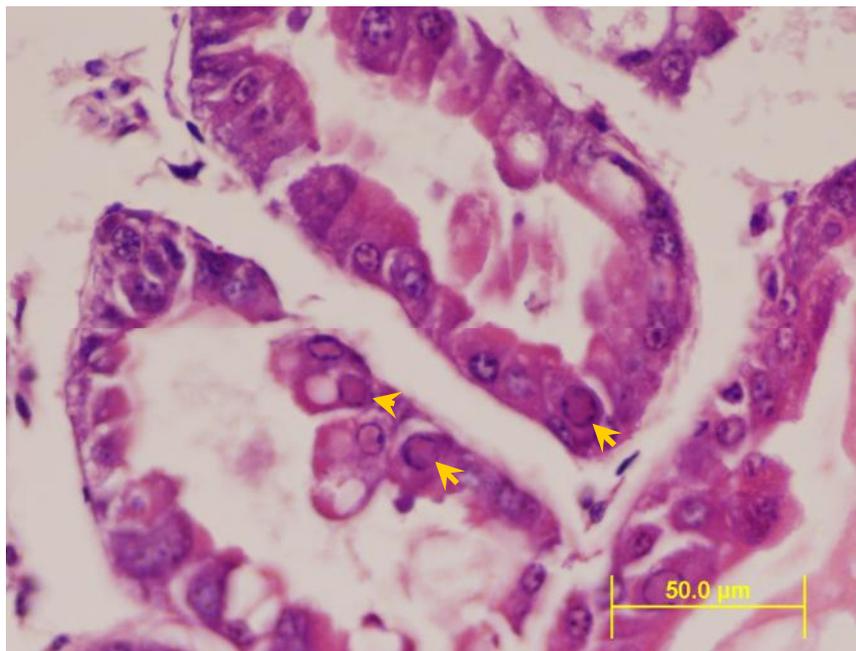
ตารางที่ 6 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ		มาลาไลต์กรีน	
		BLV	HPLV	BLV	HPLV
4) กาญจนบุรี	ลูกกึ่งอายุ 11 วัน	-	-	-	-
	ลูกกึ่งอายุ 26 วัน	-	-	-	-
	แม่พันธุ์	-	-	-	-
5) จันทบุรี	ลูกกึ่งอายุ 24 วัน	-	-	-	-
	ลูกกึ่งอายุ 28 วัน	-	-	-	-
	ลูกกึ่งอายุ 30 วัน	-	-	-	-
	ลูกกึ่งอายุ 31 วัน	-	-	-	-
	แม่พันธุ์	-	-	-	-

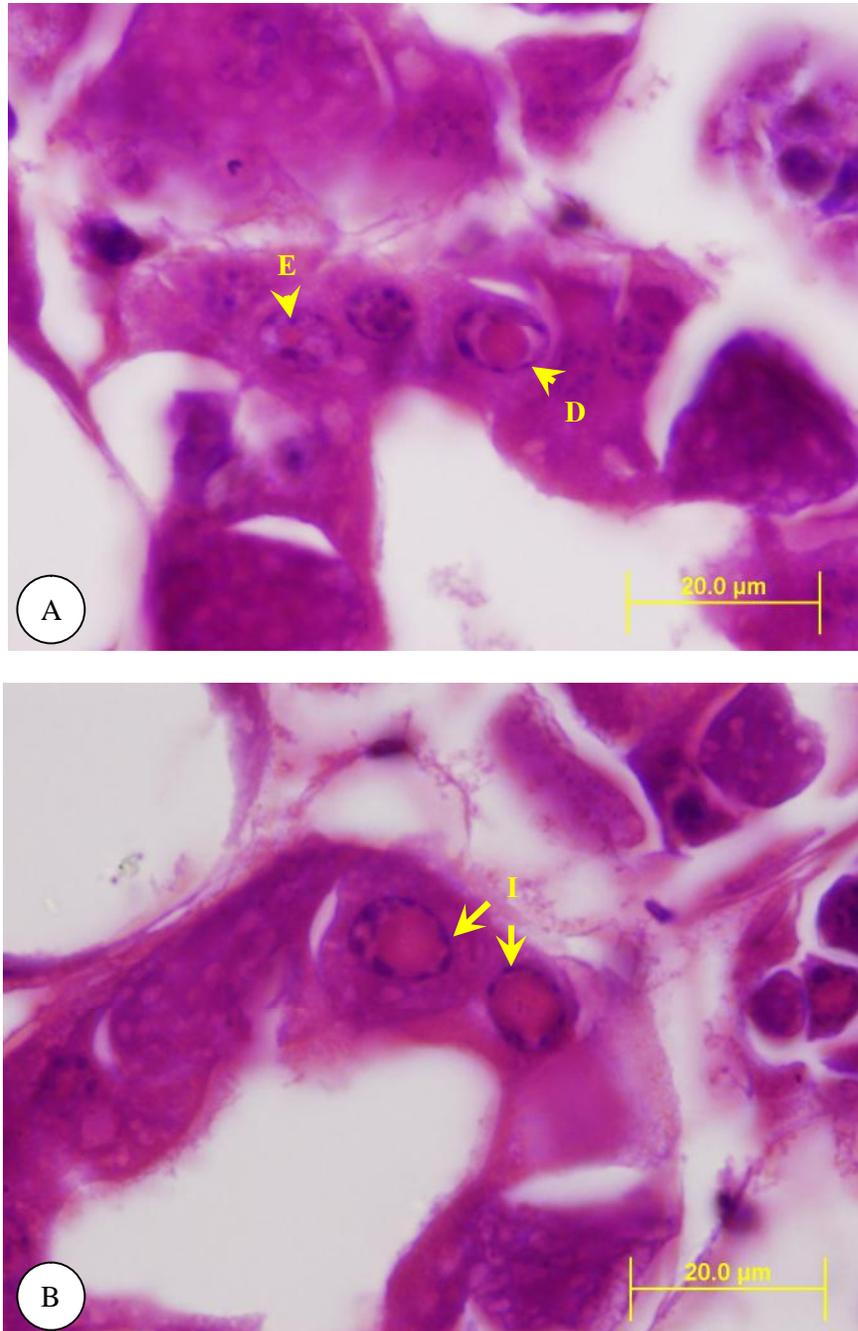
หมายเหตุ เครื่องหมาย หมายถึงตรวจพบเชื้อ
- หมายถึงตรวจไม่พบเชื้อ



ภาพที่ 19 Inclusion bodies มีลักษณะเต็มเซลล์ของตับและตับอ่อนของลูกกิ้งก่ามกราคม อายุ 10 วัน จากเพชรบุรี (H&E)



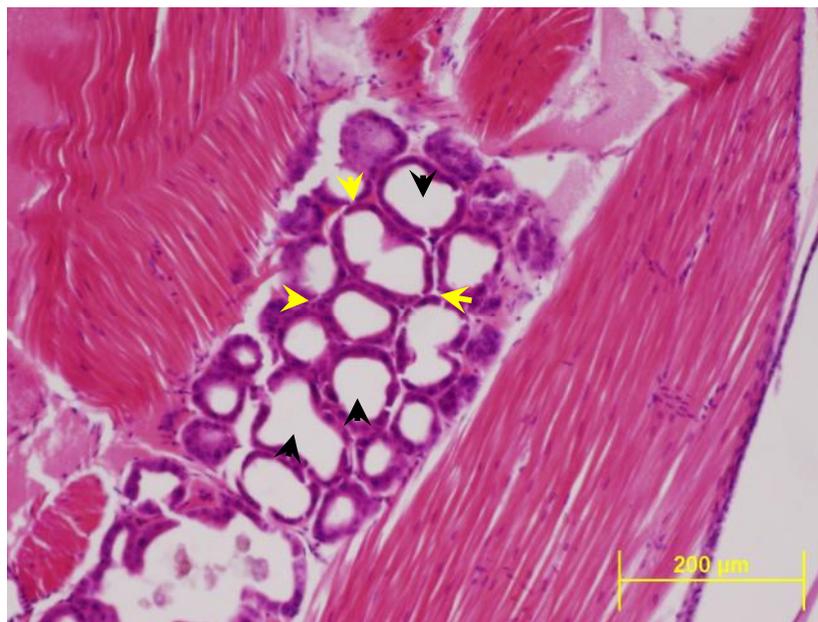
ภาพที่ 20 Inclusion bodies ของ BLV (ศรชี้) ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกิ้งก่าอายุ 34 วัน จากเพชรบุรี (H&E)



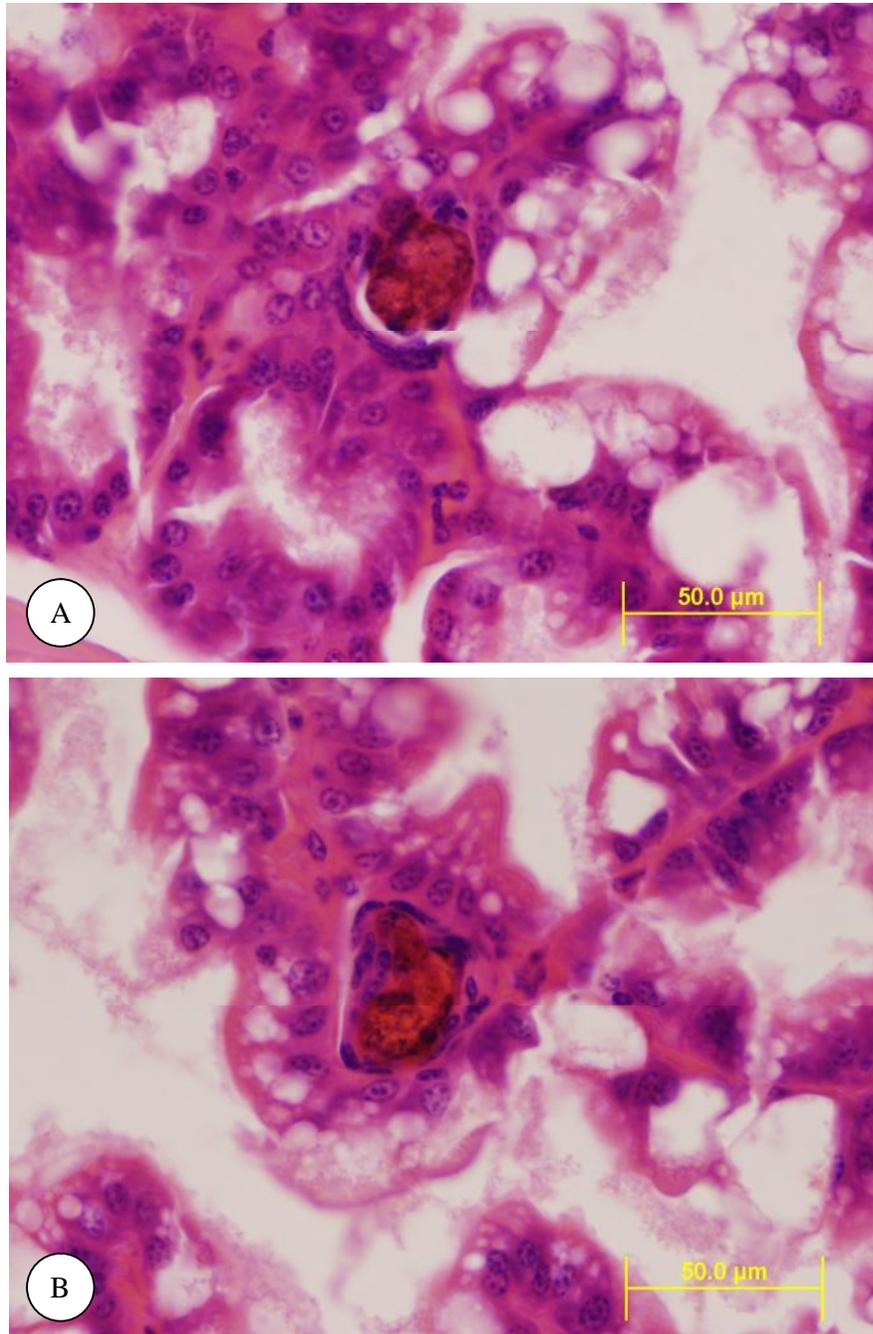
ภาพที่ 21 A,B Inclusion body ของ HPLV ในระยะเริ่มต้น (E) ระยะกำลังพัฒนา (D) และระยะพัฒนาเต็มที่ (I) (H&E)



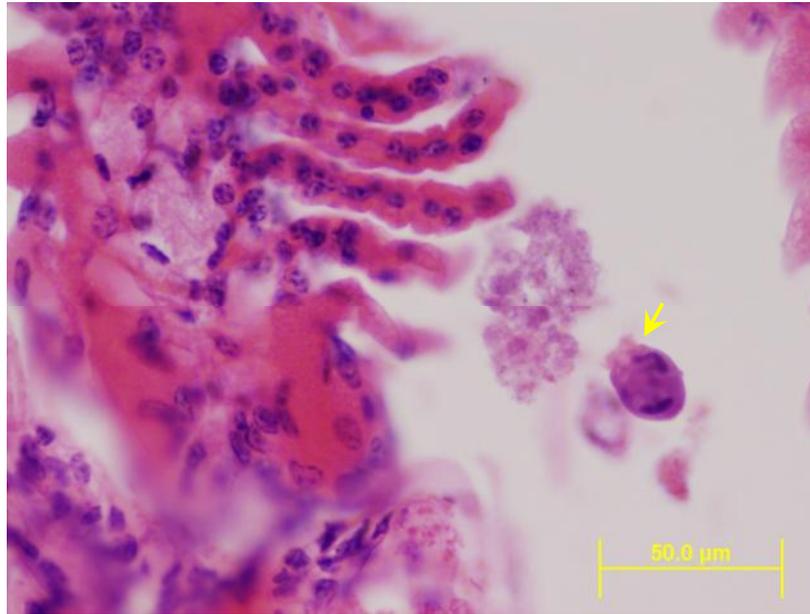
ภาพที่ 22 Inclusion bodies (สรสี) ของ HPLV ติดสีแดงของอีโอซินในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูก กุ้งอายุ 22 วัน จากราชนบุรี (H&E)



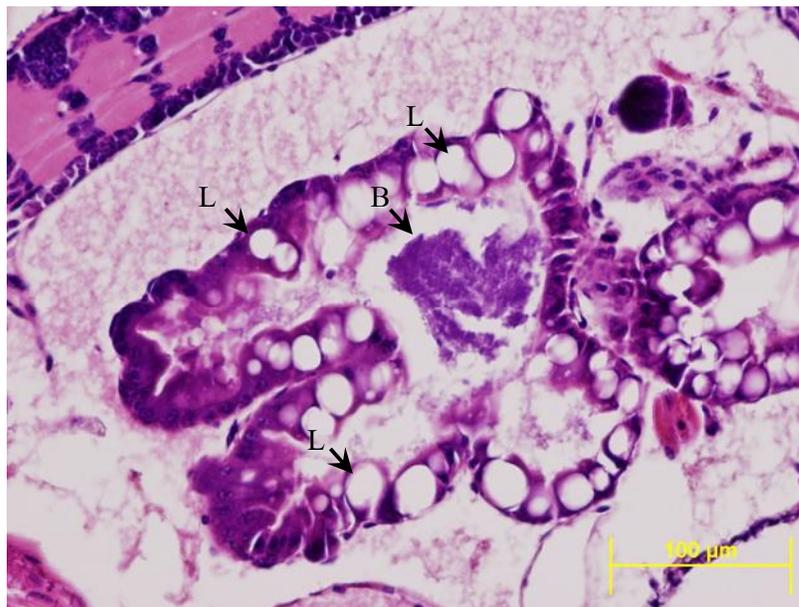
ภาพที่ 23 ลูกกุ้งก้ามกรามอายุ 10 วันจากสุพรรณบุรีตับและตับอ่อนมีขนาดเล็กลง (atrophy) (สรสีเหลือง) เม็ดไขมันมีปริมาณน้อยมากสังเกตจากช่องว่างในเซลล์ตับแต่ช่องว่างในท่อตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (สรสีดำ) (H&E)



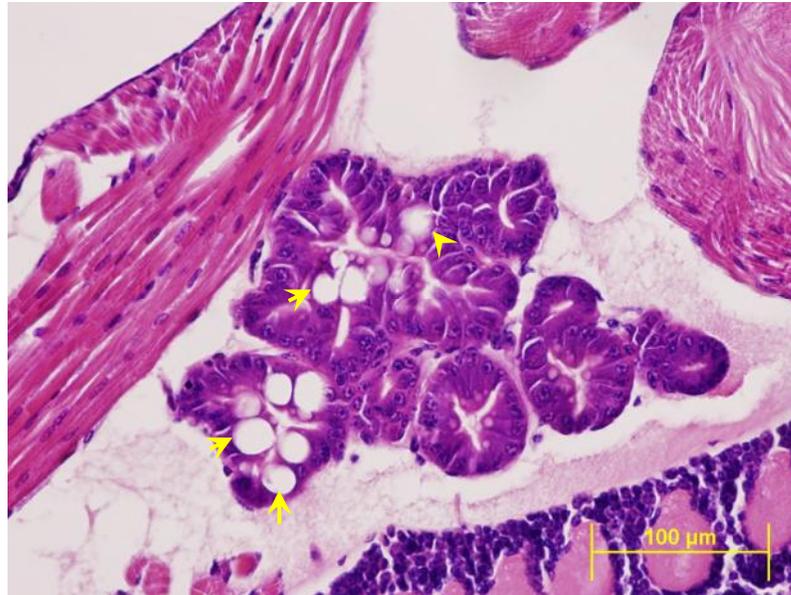
ภาพที่ 24 A, B ตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกราม จากจังหวัดสุพรรณบุรี พบการเกิด melanization (H&E)



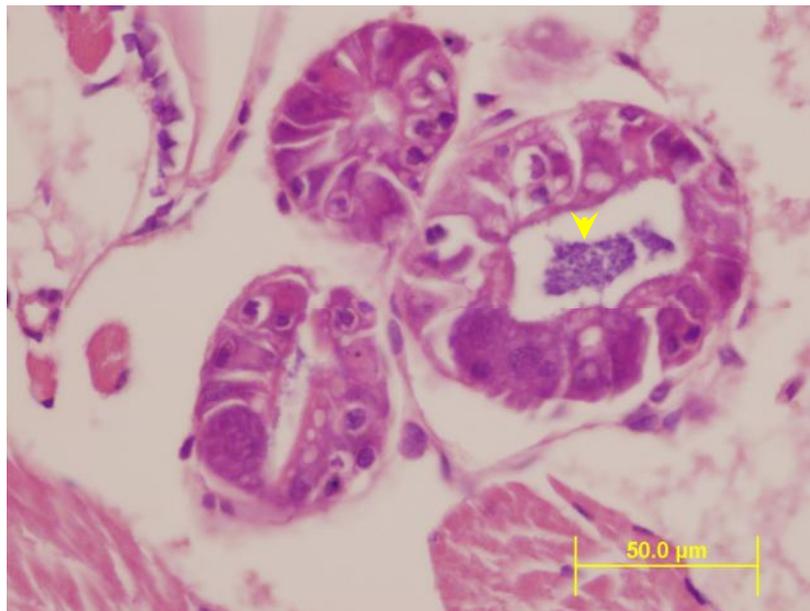
ภาพที่ 25 โปรโตซัว *Epistylis* sp. (สรชี) ที่พบบริเวณเหงือกของลูกกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดสุพรรณบุรี (H&E)



ภาพที่ 26 ลูกกุ้งก้ามกรามบางตัวจาก จังหวัดสุพรรณบุรี คับและคับอ่อนสมบูรณ์มีเม็ดไขมันจำนวนมาก (L) และพบลักษณะคล้ายกับกลุ่มของแบคทีเรียอยู่ในท่อของคับและคับอ่อน (B) (H&E)



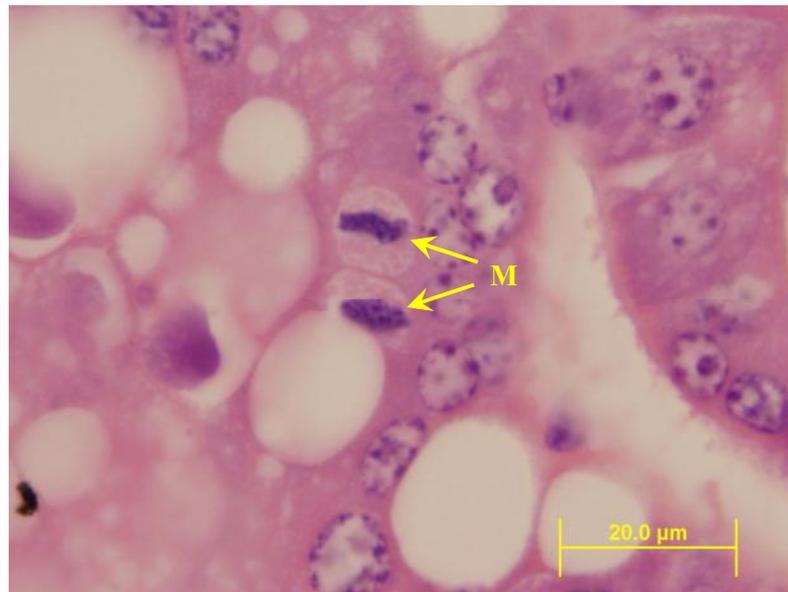
ภาพที่ 27 ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกรามจากจังหวัดสุพรรณบุรี สมบูรณ์ดีมีเม็ดไขมันจำนวนมาก (ศรีชัย) (H&E)



ภาพที่ 28 ลักษณะคล้ายกับกลุ่มของแบคทีเรียในท่อของตับและตับอ่อน (ศรีชัย) จากลูกกึ่งอายุ 11 วันจากจังหวัดกาญจนบุรี (H&E)



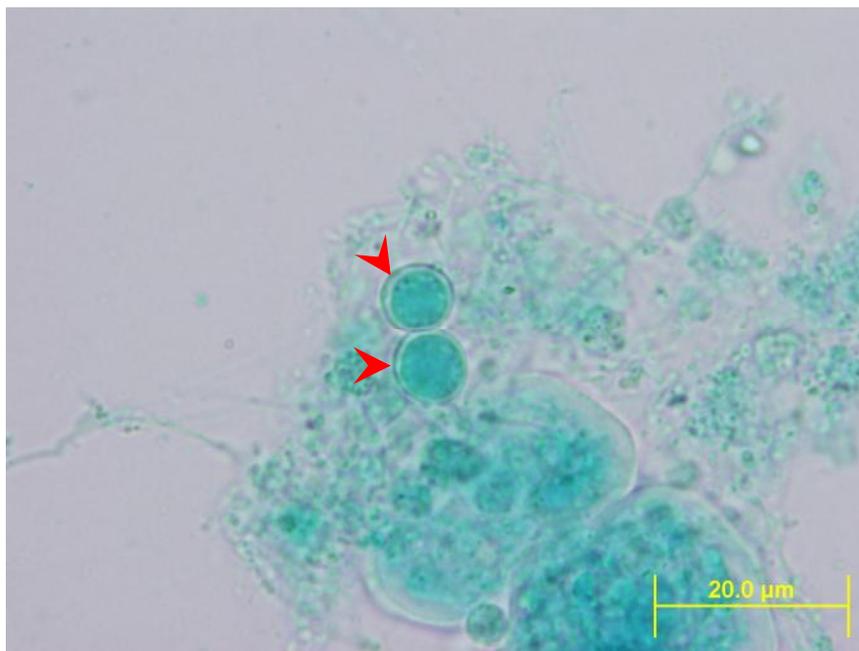
ภาพที่ 29 Microsporidian (สปอร์ซี้) ภายในเซลล์ตັบและตັบอ่อนในลูกกึ่ง้ามกรมอายุ 26 วันจาก
จังหวัดกาญจนบุรี (H&E)



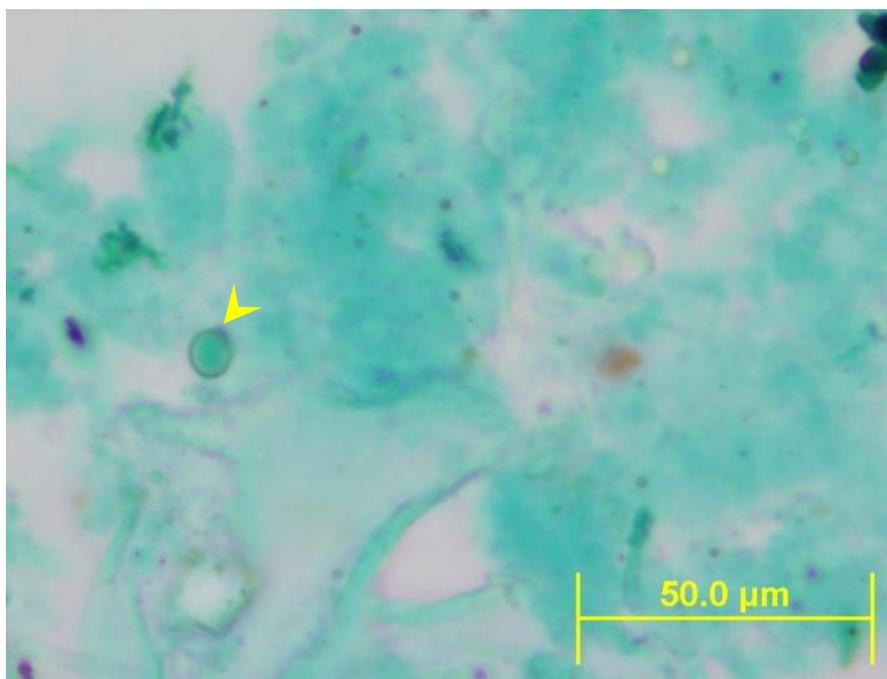
ภาพที่ 30 เซลล์ตັบและตັบอ่อนของลูกกึ่ง้ามกรมจากจังหวัดกาญจนบุรี มีการแบ่งเซลล์แบบ
ไมโทซิส เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย (M) (H&E)



ภาพที่ 31 Inclusion body ของ HPLV (สตรอว์) ในตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกราม จากเพชรบุรี โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน



ภาพที่ 32 Inclusion bodies ของ HPLV (สตรอว์) ในตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกราม จากเพชรบุรี โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน



ภาพที่ 33 Inclusion bodies ของ BLV (สรชี) ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกราม จาก เพชรบุรี โดยการย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน

3. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อไวรัส baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ในตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ต่ออัตราการรอดตาย ลูกกึ่งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก

3.1 การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดตายและเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV ในลูกกึ่งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก

คัดเลือกแม่พันธุ์กึ่งที่มีไข่แก่ จำนวน 2 ชุด จากแหล่งต่างกัน ได้แก่

ชุดที่ 1 แม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามซึ่งตรวจพบการติดเชื้อ BLV และ HPLV จากการวินิจฉัยทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนจากจังหวัดเพชรบุรี จากการทดลองที่ 2

ชุดที่ 2 แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV ที่ผ่านการวินิจฉัยทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนจากจังหวัดจันทบุรี จากการทดลองที่ 2

โดยในแต่ละชุดสุ่มแม่กึ่งจำนวน 20 ตัว ทำการชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวแม่กึ่งแต่ละตัว ดังตารางที่ 7 และตารางผนวกที่ ก1-ก2

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยและความยาวเฉลี่ยของแม่พันธุ์กึ่งก้ามกราม ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัด เพชรบุรีและแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรี

แหล่งแม่พันธุ์กึ่งก้ามกราม	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)
	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV	21.68 \pm 3.86 ^a	12.58 \pm 0.79 ^a
แม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ	29.65 \pm 2.27 ^b	14.02 \pm 0.43 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ เล็กที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการศึกษาพบว่าแม่พันธุ์กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 21.68 \pm 3.86 กรัม น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับน้ำหนักเฉลี่ยของแม่พันธุ์กึ่งที่ปลอดเชื้อซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 29.65 \pm 2.27 กรัม ในขณะที่ค่าความยาวเฉลี่ยของแม่พันธุ์กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีความยาวเฉลี่ยเพียง 12.58 \pm 0.79 เซนติเมตร น้อยกว่าความยาวเฉลี่ยแม่พันธุ์กึ่งที่ปลอดเชื้อซึ่งมีความยาวเฉลี่ย 14.02 \pm 0.43 เซนติเมตร

จากการสุ่มลูกกึ่ง จำนวน 200 ตัวจากแม่พันธุ์แต่ละแหล่งหลังจากอนุบาลลูกกึ่งเป็นเวลา 25 วันมาศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ามกราม เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดพบว่าแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดให้ลูกกึ่งติดเชื้อ HPLV จำนวน 100 ตัว (50 เปอร์เซ็นต์) ติดเชื้อ BLV จำนวน 40 ตัว (20 เปอร์เซ็นต์) และมีการติดเชื้อร่วมกันของ HPLV และ BLV จำนวน 20 ตัว (10 เปอร์เซ็นต์) และไม่พบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดจำนวน 40 ตัว (20 เปอร์เซ็นต์) ส่วนลูกกึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไม่พบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ สำหรับอัตราการรอดตายของลูกกึ่งก้ามกรามที่ได้จากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ เท่ากับ 72.0 \pm 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการรอดตายของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการรอดตายเพียง 63.0 \pm 1.0 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 8 และตารางผนวกที่ ข1-ข2

ตารางที่ 8 ปริมาณการพบ HPLV และ BLV จากของแม่พันธุ์และลูกกึ่งกำมารวมและอัตราการรอดตายของลูกกึ่งกำมารวมจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัสและติดเชื้อไวรัส

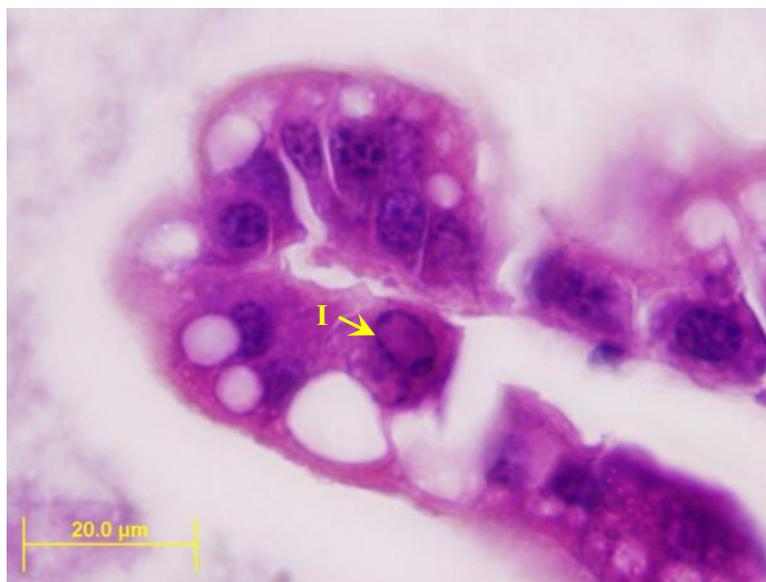
แหล่งที่มาของกึ่ง		การติด	การติด	การติดเชื้อ	ไม่ติด	รวม	อัตราการรอดตาย (%)
		เชื้อ BLV	เชื้อ HPLV	BLV/ HPLV	เชื้อ		
แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด	จำนวนกึ่ง (ตัว)	8	4	2	6	20	
	เปอร์เซ็นต์	40	20	10	30	100	
ลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด	จำนวนกึ่ง (ตัว)	40	100	20	40	200	63.0±1.0 ^a
	เปอร์เซ็นต์	20	50	10	20	100	
แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ	จำนวนกึ่ง (ตัว)	0	0	0	20	20	
	เปอร์เซ็นต์	0	0	0	100	100	
ลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ปลอดเชื้อ	จำนวนกึ่ง (ตัว)	0	0	0	200	200	72.0±2.0 ^b
	เปอร์เซ็นต์	0	0	0	100	100	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

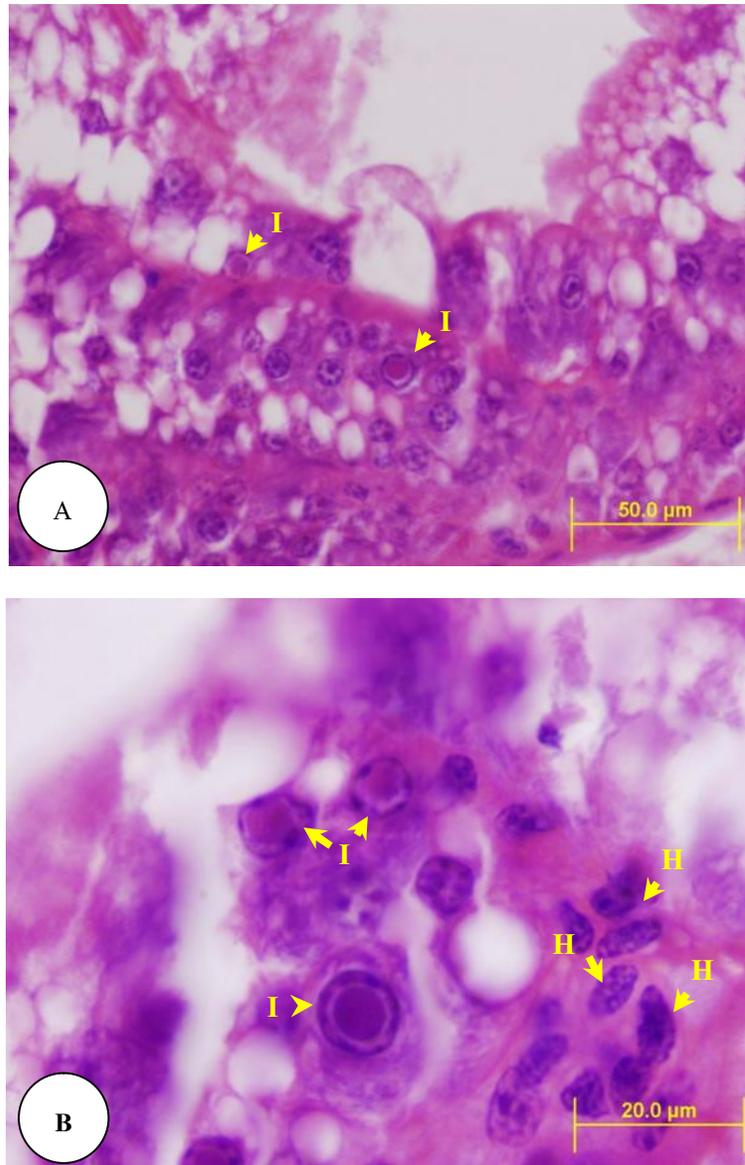
การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนในแม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี ซึ่งติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด พบ inclusion bodies ของ BLV จำนวน 8 ตัว (40 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 34) และพบว่าเซลล์ตับและตับอ่อนบางส่วนตายในขณะที่กึ่งบางตัวมีปริมาณเม็ดไขมันน้อย และมีเม็ดเลือดแทรกกระหว่างท่อตับและตับอ่อน การศึกษาครั้งนี้พบการติดเชื้อ HPLV ในแม่กึ่งจำนวน 4 ตัว (20 เปอร์เซ็นต์) โดยพบลักษณะของ inclusion body ภายในเซลล์ตับและตับอ่อนทำให้นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ และพบ inclusion body อยู่ภายใน (ภาพที่ 35 A,B) สำหรับแม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรีตับและตับอ่อนมีความสมบูรณ์ มีปริมาณเม็ดไขมันอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 36 A,B)

สำหรับการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกึ่งกำมารวมจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสพบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมากโดยความรุนแรงในลูกกึ่งแต่ละตัวจะแตกต่างกันบ้าง แต่มีส่วนที่เหมือนกันคือตับและตับอ่อน ของลูกกึ่งจะมีปริมาณเม็ดไขมันน้อยกว่าลูกกึ่งปกติ พบ

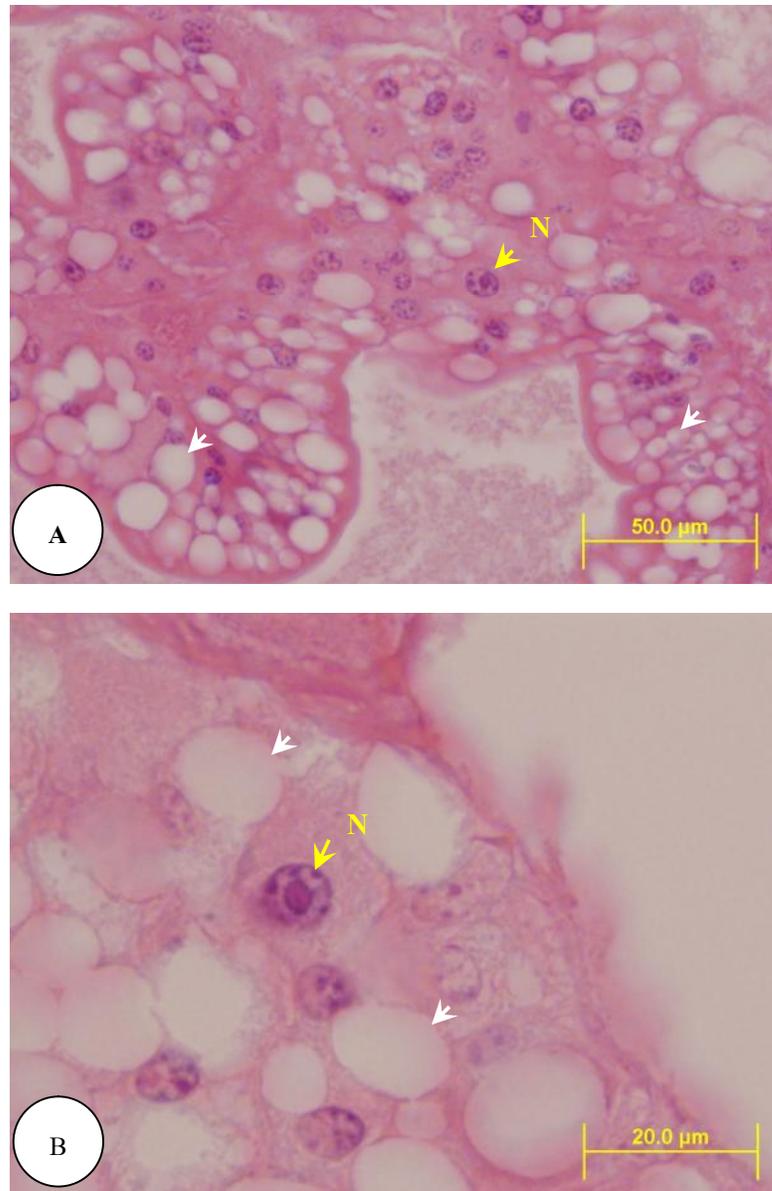
เซลล์ตับและตับอ่อนตายเป็นจำนวนมาก มีเม็ดเลือดแทรกระหว่างท่อตับและตับอ่อน (interstitial hemocyte) (ภาพที่ 37) พบ inclusion bodies คล้ายการติดเชื้อไวรัส BLV หลุดออกมากในท่อตับและตับอ่อนเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 38) inclusion body ของ BLV ในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 39) ในลูกกึ่งบางตัวพบเซลล์ตับและตับอ่อนมีรูปร่างผิดปกติ และพบ inclusion ของ HPLV ติดสีชมพู (eosinophilic inclusion) (ภาพที่ 40) มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย โครมาตินอยู่ที่ขอบของเซลล์ (chromatin margination) (ภาพที่ 41-42) เกิด vacuole (vacuolization) เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 43) ในลูกกึ่งบางตัวยังพบการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับด้วยสำหรับลักษณะของ inclusion body ของ BLV ภายในเซลล์ตับและตับอ่อน ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีลักษณะคล้ายกับการศึกษาของ Nash *et al.* (2003) ที่ศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อลูกกึ่งก้ำมกรมระยะโพสลาว่าที่มีลักษณะสีลำตัวผิดปกติ พบว่านิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่และพบโครมาติน ชิดขอบของเซลล์ และภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อน พบ inclusion สีชมพูในการศึกษาครั้งนี้ ลูกกึ่งบางตัวที่ติดเชื้อ HPLV จะพบลักษณะของเซลล์ตับและตับอ่อนมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นและพบ inclusion bodies ติดสีโอชินอยู่ภายใน (ภาพที่ 44 A,B) นอกจากนี้ในลูกกึ่งบางตัวยังพบการติดเชื้อ HPLV ร่วมกับการติดเชื้อ BLV หรือ dual infection (ภาพที่ 45 A,B) สำหรับลูกกึ่งก้ำมกรมที่ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรี นั้นพบว่าตับและตับอ่อน ลักษณะปกติมีปริมาณเม็ดไขมันอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 46 A,B)



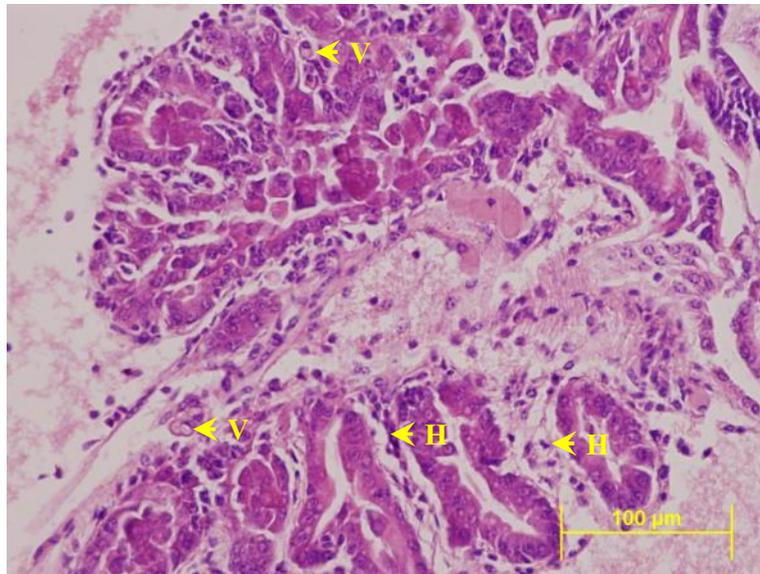
ภาพที่ 34 Inclusion body (I) ของ BLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)



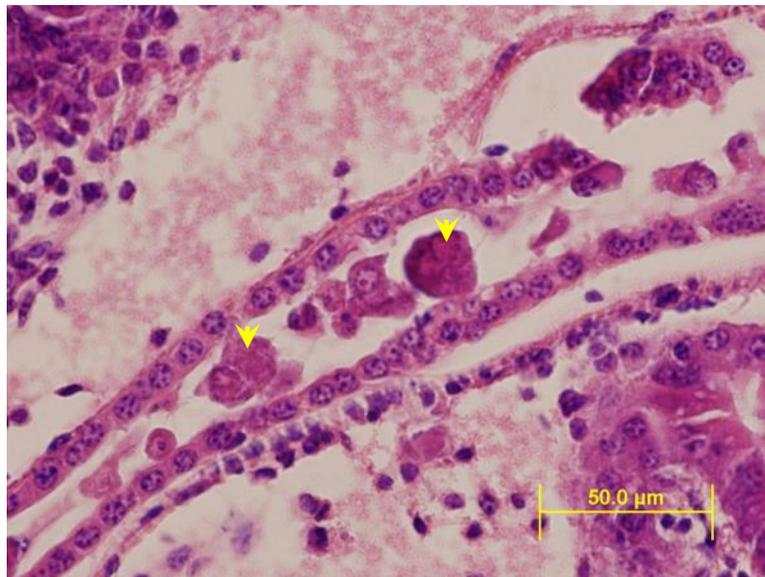
ภาพที่ 35 A,B Inclusion bodies (I) ของ HPLV และมีเซลล์เม็ดเลือด (H)แทรกระหว่างท่อตับและตับอ่อนจากแม่พันธุ์กึ่งกำกรมที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



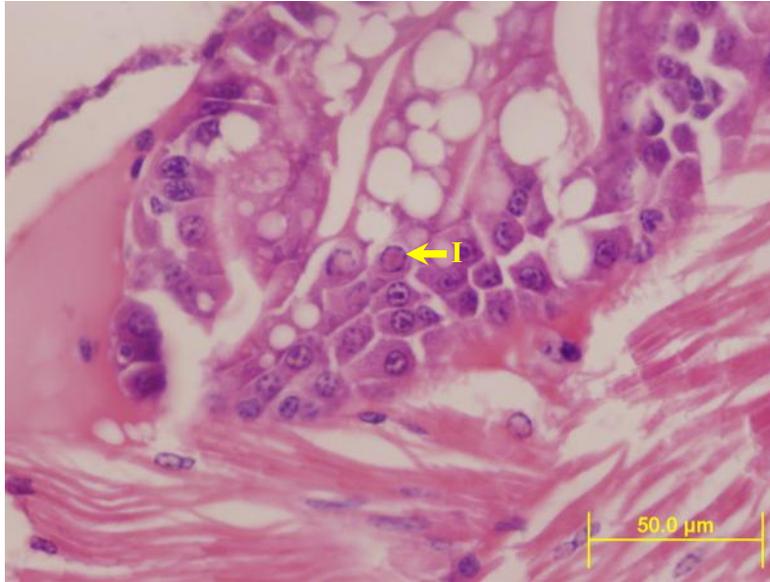
ภาพที่ 36 A,B ตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรีแสดงลักษณะปกติพบ ปริมาณไขมันจำนวนมาก (ลูกศรขาว) นิวเคลียสของเซลล์ (nucleolous: N) (H&E)



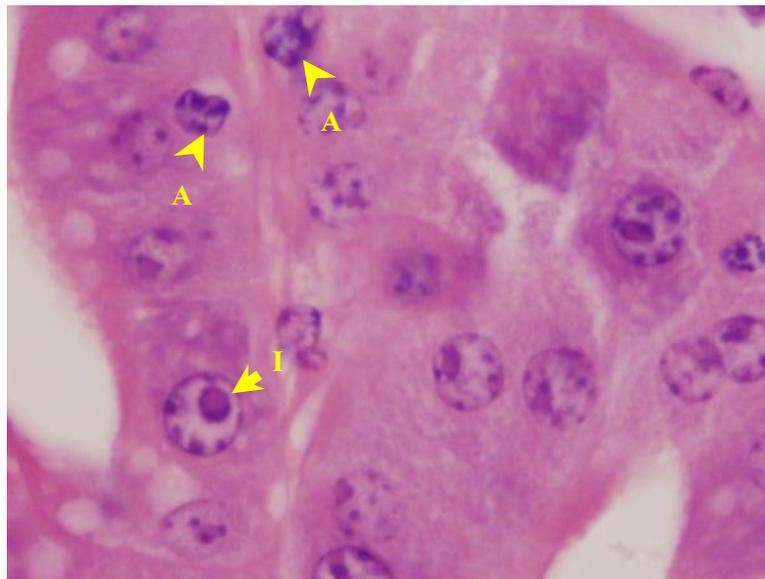
ภาพที่ 37 แสดงลักษณะของตับและตับอ่อนของลูกกึ่ง จากแม่พันธุ์ ที่ติดเชื้อไวรัสมีเซลล์ตับและตับอ่อนตายเป็นจำนวนมาก (severe necrosis) เกิด vacuole (V) แสดงถึงการเกิดกระบวนการ phagocytosis มีเม็ดเลือดแทรกกระหว่างท่อตับและตับอ่อน (interstitial hemocyte; H) (H&E)



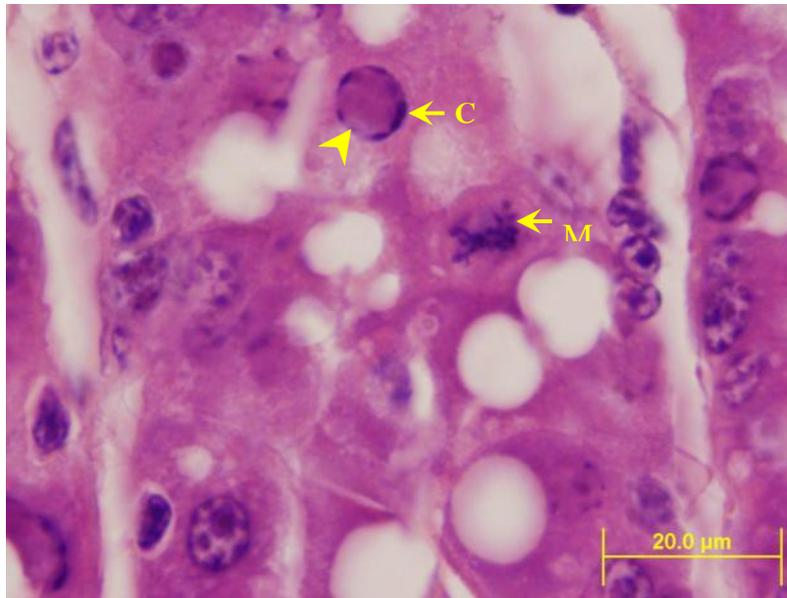
ภาพที่ 38 แสดงลักษณะของตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์จาก ที่ติดเชื้อไวรัส พบเซลล์ที่ตายหลุดออกมาในท่อตับและตับอ่อนเป็นจำนวนมาก (ครี) (H&E)



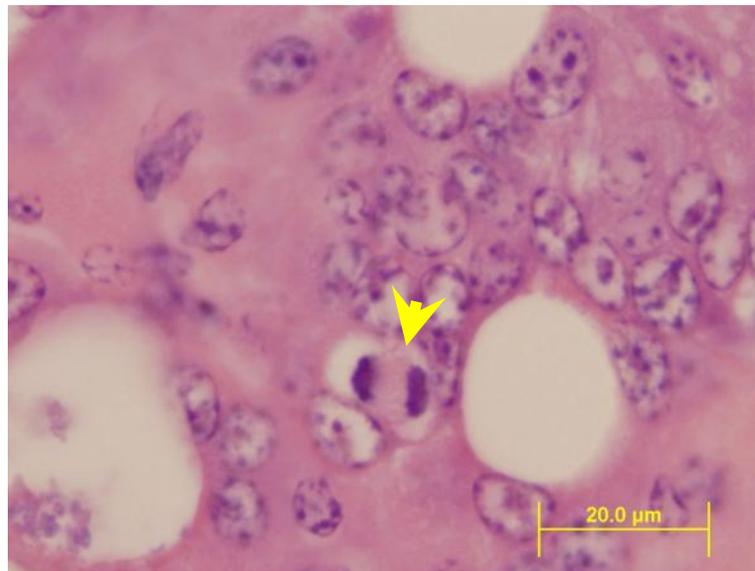
ภาพที่ 39 Inclusion body (I) ของ BLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (H&E)



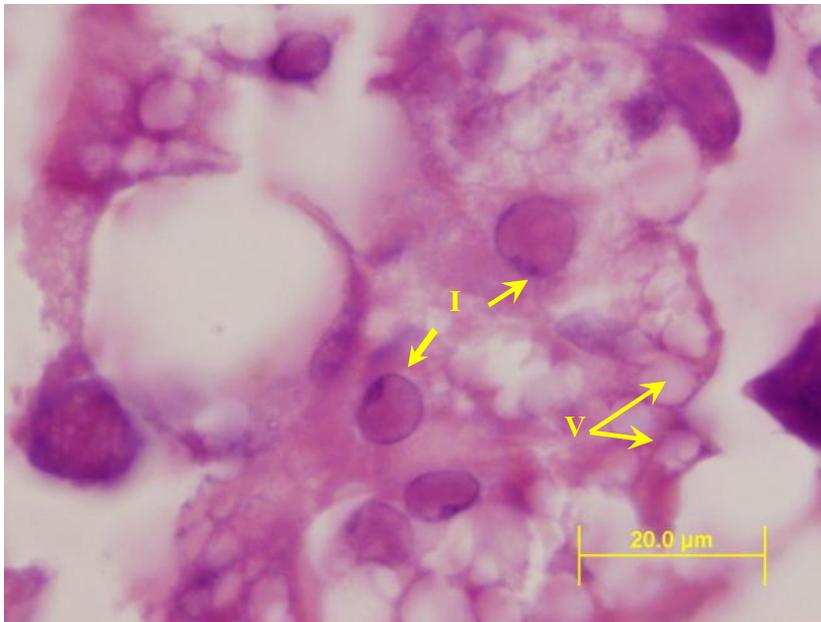
ภาพที่ 40 ลักษณะของเซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสบางเซลล์มีรูปร่างผิดปกติ (A) และพบ inclusion body (I) ของ HPLV (H&E)



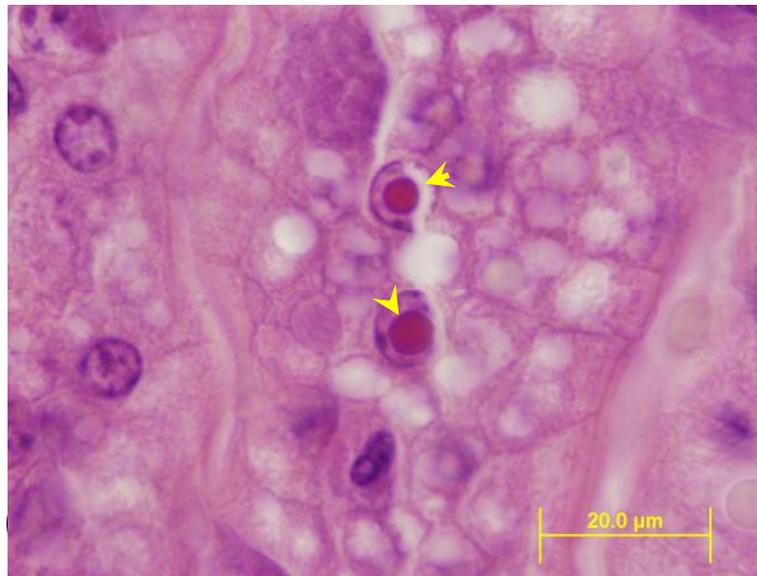
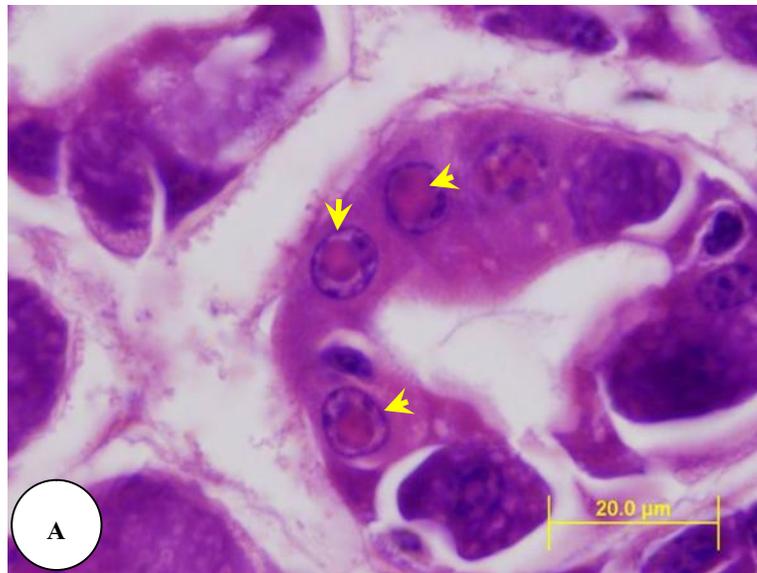
ภาพที่ 41 เซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัส มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitotic figure; M) inclusion body (I) ของ BLV และโครมาตินชิดขอบของเซลล์ (C) (H&E)



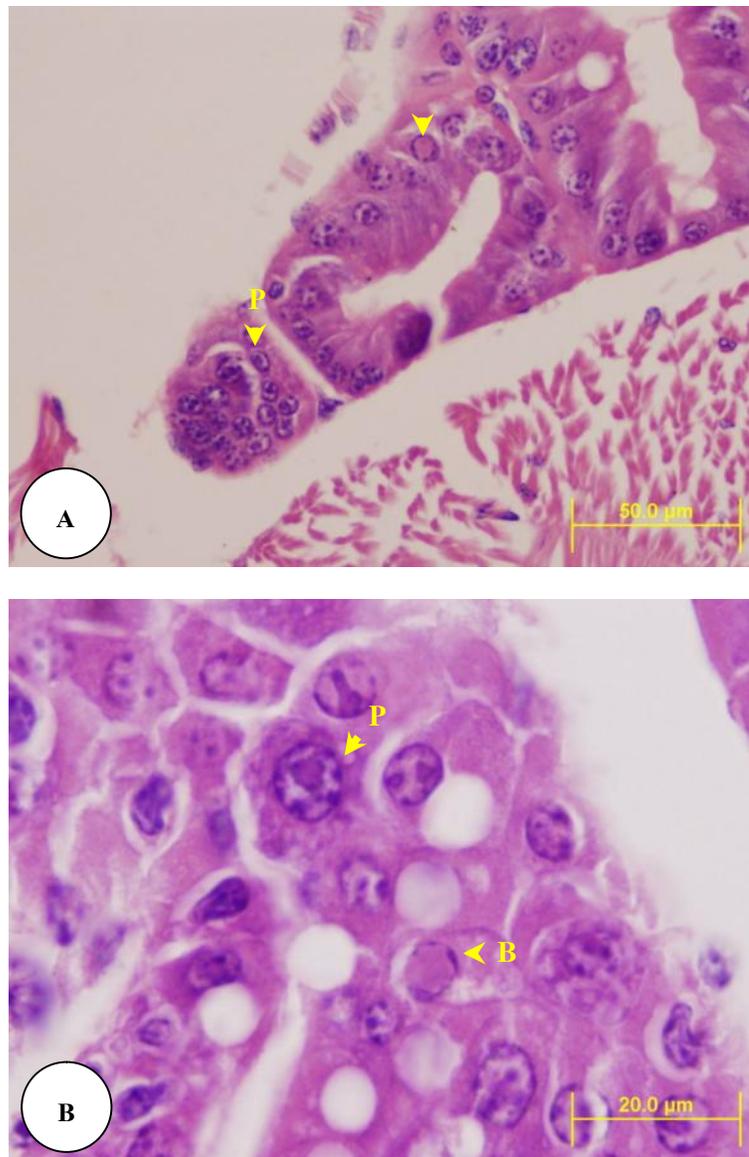
ภาพที่ 42 เซลล์ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัส พบการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย (M) (H&E)



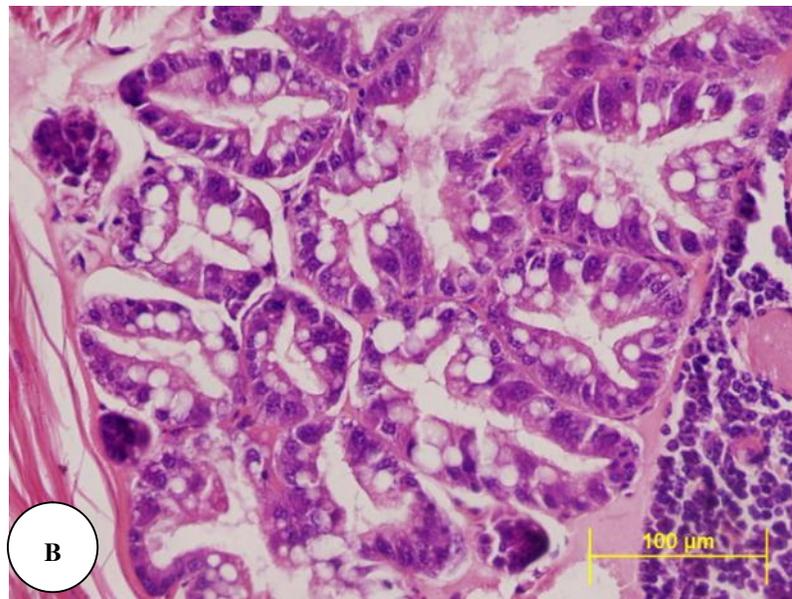
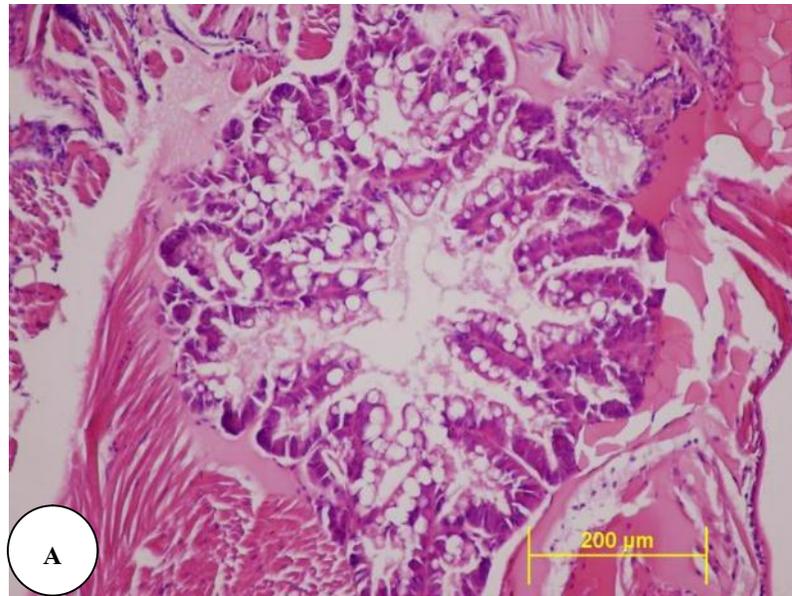
ภาพที่ 43 Inclusion bodies (I) ของ BLV และเกิด vacuole (vacuolization; V) เป็นจำนวนมากของ
ลูกกึ่งจากแม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัส (H&E)



ภาพที่ 44A,B Inclusion bodies (สรชี้) ของ HPLV ในเซลล์ดัดและดัดอ่อนของลูกกุ้งจากแม่พันธุ์
ติดเชื้อไวรัส (H&E)



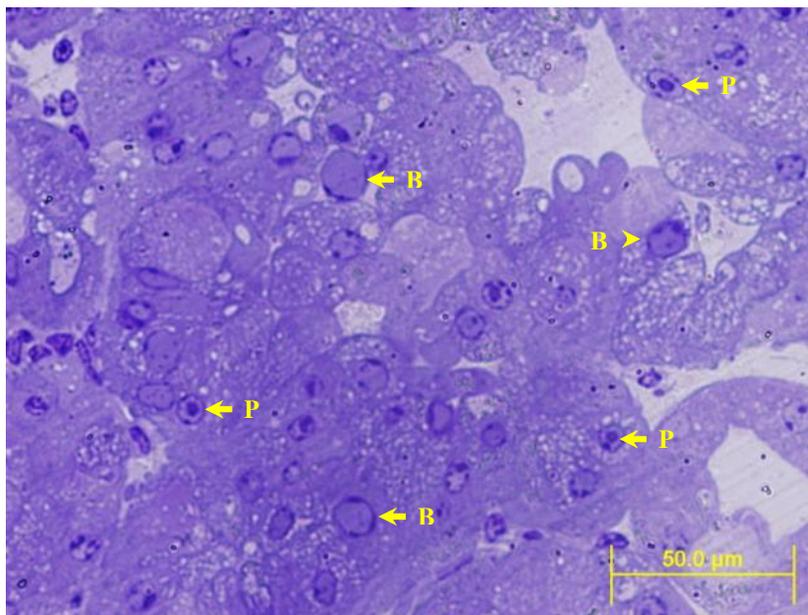
ภาพที่ 45 A,B การติดเชื้อ HPLV (P) ร่วมกับการติดเชื้อ BLV (B) ในเซลล์ตับและตับอ่อนของลูก
กึ่งจากแม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัส (H&E)



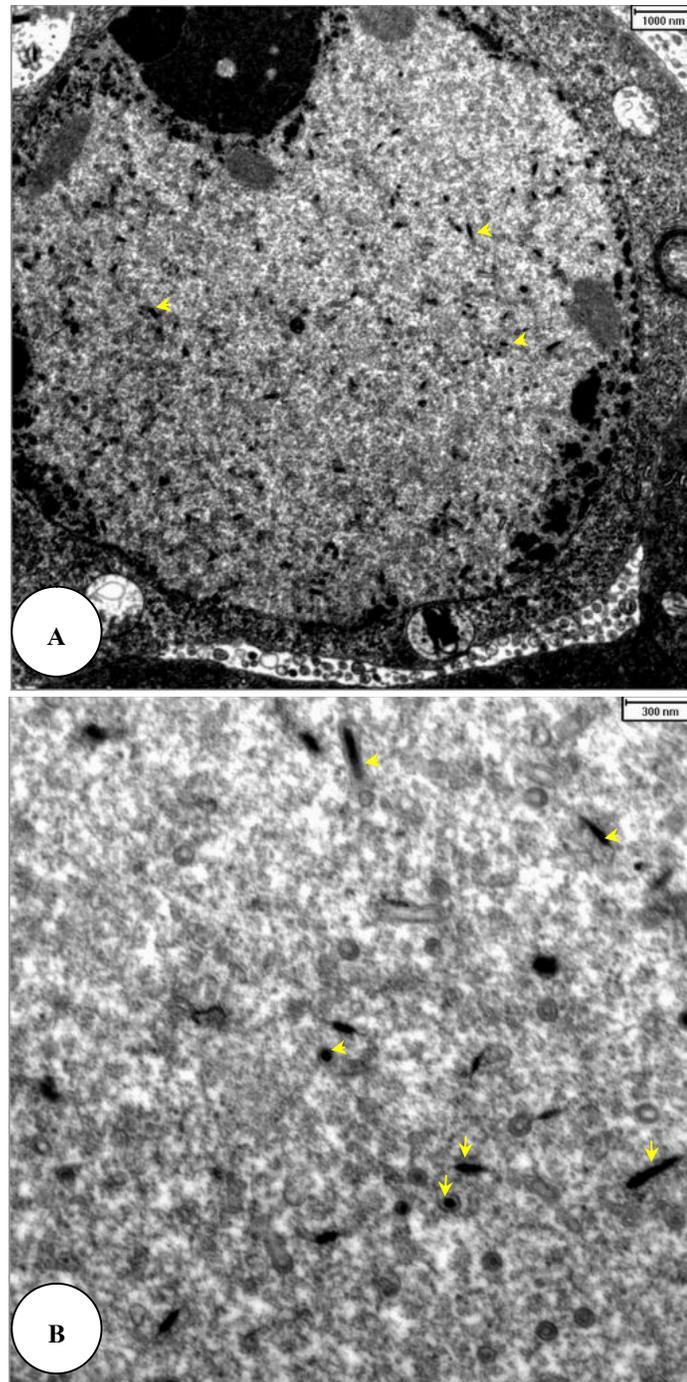
ภาพที่ 46 A,B ตับและตับอ่อนของลูกกึ่งกำมกรามที่ได้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรีมีปริมาณไขมันจำนวนมาก (H&E)

3.2 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแม่พันธุ์และลูกพันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM)

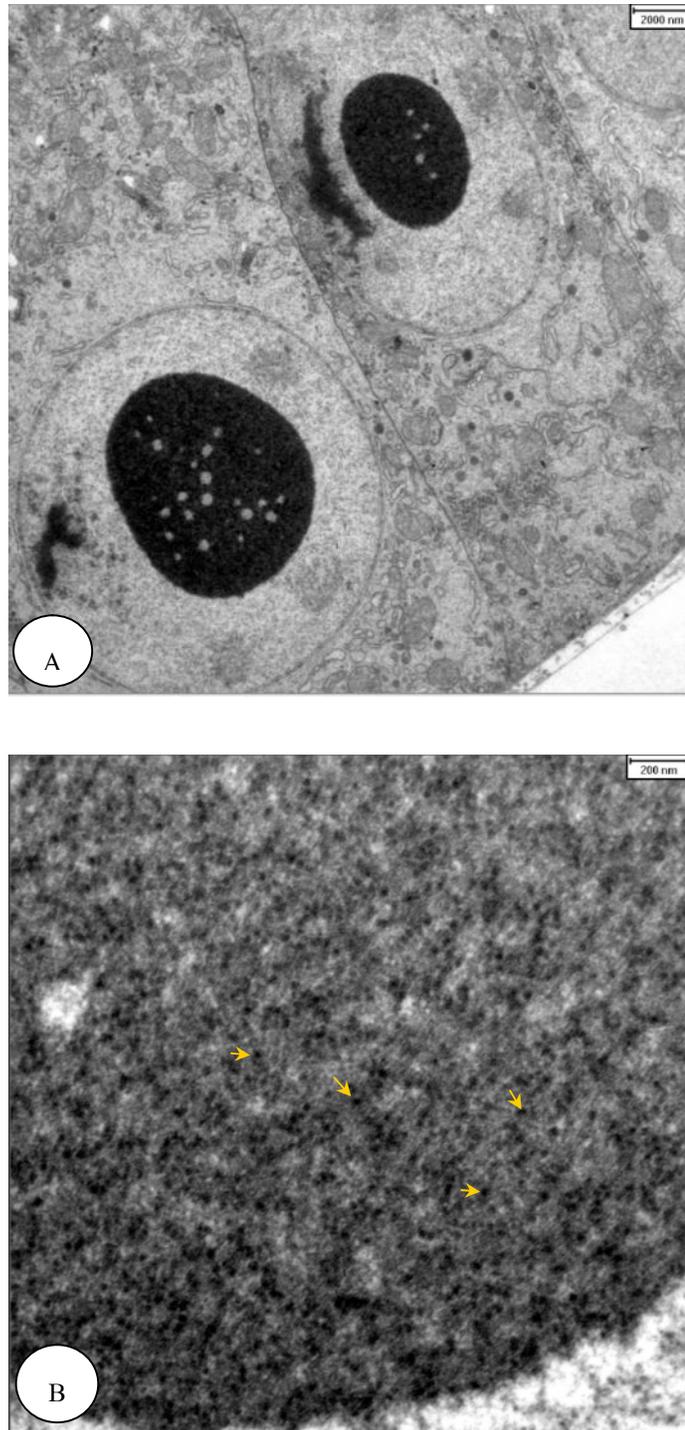
จาก semi-thin sections ของตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์และลูกพันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรีพบ inclusion bodies ในลักษณะของการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV (ภาพที่ 47) เมื่อนำบริเวณส่วนนี้ไปศึกษาด้วย TEM อนุภาคของไวรัส 2 ชนิด ชนิดแรกมีขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 70-75 นาโนเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของไวรัสในกลุ่ม baculovirus (ภาพที่ 48 A,B) สำหรับไวรัสชนิดที่สองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-24 นาโนเมตร (ภาพที่ 49 A,B) อนุภาคของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้มีขนาดและรูปร่างเหมือนกับผลการศึกษาในข้อ 1.2



ภาพที่ 47 ภาพจาก semi-thin section ย้อมด้วย toluidine blue พบการติดเชื้อ BLV (B) ร่วมกับการติดเชื้อ HPLV (P) ในตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกราม



ภาพที่ 48 A,B ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบอนุภาคไวรัสขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 70-75 นาโนเมตรของ BLV ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งก้ำมกราม



ภาพที่ 49 A,B อนุภาคไวรัสของ HPLV ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-24 นาโนเมตร ในตับและตับอ่อนของลูกกึ่งกำกรม

3.3 การศึกษาคุณภาพน้ำในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม

ค่าคุณภาพน้ำเฉลี่ยในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามทั้ง 2 กลุ่มทดลองตลอดระยะการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 9

3.2.1 ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำหรือพีเอช

สำหรับค่าเฉลี่ยของพีเอชในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง โดยค่าเฉลี่ยของพีเอชในกลุ่มการทดลองที่ อนุบาลลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีค่าเท่ากับ 7.99 ± 0.21 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยพีเอชของกลุ่มอนุบาลลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ปลอดเชื้อมีค่าเท่ากับ 8.08 ± 0.12 โดยค่าเฉลี่ยพีเอชตลอดระยะเวลาการอนุบาลครั้งนี้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามคือมีค่า อยู่ระหว่าง 7.0-8.5 (Boyd and Zimmermann, 2000) ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจะมีการเติมน้ำปูนใสลงไปเป็นระยะ ๆ เพื่อควบคุมค่าพีเอชของน้ำให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการ อนุบาลลูกกุ้ง

3.2.2 อุณหภูมิ

ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิระหว่างทั้ง 2 กลุ่มการทดลองในการศึกษานี้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) คืออุณหภูมิเฉลี่ยของกลุ่มอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิเท่ากับ 29.93 ± 0.91 องศาเซลเซียส ในขณะที่ลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ปลอดเชื้อมีค่า 30.1 ± 0.91 องศาเซลเซียส โดยค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิในการศึกษาครั้งนี้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม คือมีค่าอยู่ระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส (Sebastian, 1996) เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่อุณหภูมิของอากาศไม่มีการเปลี่ยนแปลงมาก อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการพัฒนาของลูกกุ้งวัยอ่อนถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส ลูกกุ้งจะพัฒนาเป็นลูกกุ้งคว่ำระยะโพสลาเร็วซ่าหรือการเจริญเติบโตช้า และถ้าอุณหภูมิของน้ำสูงมาก เช่น 35 องศาเซลเซียส มักจะทำให้ลูกกุ้งตาย (New, 2000) โดยอุณหภูมิจะส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของกุ้ง ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าอุณหภูมิช่วงที่เหมาะสม จะส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการเผาผลาญ (metabolic rate) จะลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า กุ้งจะกินอาหารลดลงในขณะที่อัตราการเผาผลาญจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าช่วงที่เหมาะสม ทำให้กุ้งกินอาหารจะเพิ่มขึ้นแต่การเจริญเติบโตไม่เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ที่อุณหภูมิสูงกว่าระดับที่สัตว์สามารถทนได้ อัตราการเผาผลาญ

จะเริ่มลดลงพร้อม ๆ กับการทำงานของระบบอื่น ๆ เริ่มล้มเหลว การกินอาหาร จะลดลงและในที่สุดสัตว์น้ำก็จะตาย

3.3.3 ออกซิเจนที่ละลายน้ำ

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในบ่อลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีค่าเฉลี่ย 7.34 ± 0.65 มิลลิกรัมต่อลิตร และในบ่อลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ มีค่าเฉลี่ย 7.36 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อลิตรและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการอนุบาลและเลี้ยงกุ้ง ซึ่งปริมาณออกซิเจนอยู่ในระดับที่เหมาะสมคือ (Boyd, 1989; Sebastian, 1996; New, 2000) เนื่องจากในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งจะมีการให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดเวลา

3.3.4 การนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้าในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) คือค่าการนำไฟฟ้าในบ่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีค่าเฉลี่ย 22.44 ± 1.57 $\mu\text{mhos/cm}$ และในบ่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ มีค่าเฉลี่ย 21.78 ± 2.17 $\mu\text{mhos/cm}$ ซึ่งค่าการนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์กับปริมาณธาตุชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำคือความเค็ม ซึ่งในการอนุบาลลูกกุ้งจากการศึกษาครั้งนี้อยู่ในช่วง 12-15 พีพีที เนื่องจากมีการควบคุมระดับความเค็มให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกกุ้งตลอดระยะเวลา การเปลี่ยนแปลงของความเค็มในทั้ง 2 กลุ่มจึงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ค่าการนำไฟฟ้าจึงไม่แตกต่างกัน

3.3.5 ความเค็ม

ในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าค่าเฉลี่ยของความเค็มในแต่ละกลุ่มทั้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด และแม่พันธุ์ปลอดเชื้อ จะมีค่าเฉลี่ยความเค็มเท่ากับ 13.79 ± 0.95 และ 13.36 ± 1.52 พีพีที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ความเค็มที่เหมาะสมในการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามอยู่ในช่วง 10-15 พีพีที สมพงษ์ (2546) ในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามครั้งนี้มีการ ควบคุมระดับความเค็มให้เหมาะสมสำหรับการพัฒนาการและอัตราการรอดตายต่อลูกกุ้ง ความเค็มในทั้ง 2 กลุ่มทดลองจึงมีค่าไม่แตกต่างกัน

3.3.6 ความกระด้างรวม

ค่าความกระด้างรวมในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ความกระด้างรวมในบ่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด และแม่พันธุ์ปลอดเชื้อ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $2,631.88 \pm 572.53$ และ $2,679 \pm 266.29$ มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับซึ่งถือว่ามีความสูง เนื่องจากน้ำที่ใช้อนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามมีความเค็มค่อนข้างสูงประมาณ 12-15 พิพิติ ทำให้ปริมาณเกลือแร่ต่าง ๆ ละลายอยู่มากจึงมีผลให้ค่าความกระด้างรวมของน้ำสูงตามไปด้วย เนื่องจากความกระด้างของน้ำจะมีความสัมพันธ์กับความเค็มซึ่งปริมาณ แมกนีเซียม และแคลเซียม จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของค่าความกระด้างของน้ำ ถ้าน้ำมีความเค็มสูง ค่าความกระด้างจะสูงตามไปด้วย

3.3.7 ความเป็นด่าง

ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญโดยเป็นตัวควบคุม ไม่ให้ค่าพีเอชของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันมาก Boyd (1989) รายงานว่าค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรมีค่ามากกว่า 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเป็นด่างจากการอนุบาลลูกกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความเฉลี่ยอยู่ในช่วง 129-133 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงและอนุบาลลูกกุ้งสอดคล้องกับการศึกษาของ สุภมาศ (2549) และ จักรพงษ์ (2549) ที่ค่าความเป็นด่างนั้นอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม

3.3.8 แอมโมเนีย

ปริมาณแอมโมเนียรวมระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในการศึกษานี้พบว่ามีความไม่แตกต่างกันโดยมีค่าผันแปรอยู่ในช่วง 0-0.0765 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณแอมโมเนียรวมในบ่ออนุบาลลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0277 ± 0.0289 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าปริมาณแอมโมเนียในบ่ออนุบาลลูกกุ้งจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0252 ± 0.0267 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่ง โดยปกติแล้วระดับแอมโมเนียที่ปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้งควรน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชโล และ พรเลิศ, 2547) อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นจะมีความสัมพันธ์กับค่าพีเอชของน้ำโดย ถ้าพีเอชของน้ำสูงขึ้น แอมโมเนียที่อยู่ในรูป NH_3 ที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำก็จะสูงขึ้นทำให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากขึ้น แต่

ในการศึกษาครั้งนี้ควบคุมระดับพีเอชไม่ให้สูงมาก คือมีค่าเฉลี่ยประมาณ 8.0 ดังนั้นโอกาสที่ปริมาณแอมโมเนียอยู่ในรูป NH_3 จึงมีไม่มาก ส่วนแต่ในระดับของแอมโมเนียที่ทำให้กึ่งระยะวัยรุ่นเครียด คือควรมีค่าน้อยกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 8.5 มีค่าน้อยกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 9.0 และมีค่าน้อยกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 9.5 (Boyd and Zimmermann, 2000)

3.3.9 ไนไตรท์

ค่าไนไตรท์ในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแหล่งแม่พันธุ์ทั้ง 2 กลุ่มอยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Boyd and Zimmermann, 2000) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าไนไตรท์จากการอนุบาลพบว่าในบ่ออนุบาลจากทั้ง 2 กลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เนื่องจากปริมาณไนไตรท์เกิดจากกระบวนการไนตริฟิเคชันโดยแบคทีเรียเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่ในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามครั้งนี้ปริมาณแอมโมเนียอยู่ในระดับที่ต่ำ ดังนั้นการเกิดไนไตรท์จึงอยู่ในระดับที่ต่ำและสอดคล้องกับปริมาณแอมโมเนียด้วย

ตารางที่ 9 คุณภาพน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม

คุณภาพน้ำ	ชุดที่ 1 แม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี	ชุดที่ 2 แม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรี
พีเอช	7.99±0.21 ^a	8.08±0.12 ^a
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.93±0.21 ^a	30.12±0.91 ^a
ออกซิเจนละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	7.34±0.65 ^a	7.36±0.63 ^a
การนำไฟฟ้า ($\mu\text{mhos/cm}$)	22.44±1.57 ^a	21.78±2.17 ^a
ความเค็ม (พีพีที)	13.79±0.95 ^a	13.36±1.52 ^a
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	2,631.88±572.53 ^a	2,679±266.29 ^a
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	129.56±9.86 ^a	133.40±7.25 ^a
ปริมาณแอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.0277±0.0289 ^a	0.0252±0.0267 ^a
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.004±0.005 ^a	0.007±0.006 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในแนวนอนเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษ

ตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย และปริมาณการติดเชื้อ baculo-like virus (BLV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ในการเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามแบบพัฒนา

4.1 การศึกษาปริมาณการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในตับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเลี้ยง

ปริมาณการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในระหว่างการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในบ่อดินแสดงไว้ในตารางที่ 10 และ 11 พบว่าขนาดของกุ้งไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการติดเชื้อ HPLV และ BLV และปริมาณการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยง โดยในช่วงระยะเวลาการเลี้ยง 150 และ 180 วัน พบการติดเชื้อ HPLV เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 50) คล้ายกันกับที่มีการศึกษาในกุ้งกุลาดำที่พบว่าปริมาณการติดเชื้อไวรัส MBV และ HPV ในกุ้งแต่ละขนาดจะลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยง (อุมาภรณ์, 2548) และ วรินธา (2548) ซึ่งพบว่าปริมาณเชื้อไวรัสทั้งสองผันแปรตามตามอายุกุ้ง กล่าวคือ เมื่อกุ้งอายุประมาณ 50 วัน พบกุ้งขนาดเล็กในบ่อมีการติดเชื้อ MBV (50%) มากกว่า HPV (30%) เมื่อกุ้งอายุประมาณ 100 วัน กุ้งขนาดเล็กหรือกุ้งแคระแกร็นในบ่อจะพบการติดเชื้อ HPV (40%) มากกว่า MBV (2.5%) และเมื่อกุ้งอายุ 156 วัน กุ้งแคระแกร็นในบ่อ จะตรวจพบ เชื้อ HPV (37.5%) เพียงอย่างเดียว ไม่พบเชื้อ MBV เช่นเดียวกับรายงานของกรรมวิท (2545) ที่ระบุว่า เชื้อ MBV มีผลต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้งระยะโพสลาร์วาในโรงเพาะฟัก และกุ้งในบ่อเลี้ยงอายุ 1 - 2 เดือน เท่านั้น ส่วน HPV มีผลทำให้กุ้งในบ่อดินเจริญเติบโตช้าหลังอายุ 2 เดือนขึ้นไป ในการศึกษาครั้งนี้หลังจากเลี้ยงนาน 150 วัน พบการติดเชื้อ *Epistylis* sp. เกาะที่ไรย์ของกุ้งบางตัว (ภาพที่ 52) จากบ่อที่กุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จังหวัดเพชรบุรี พบกุ้งบางส่วนเปลือกคลุมส่วนหัวเน่ากร่อนเป็นรอยเว้าแหว่ง สาเหตุอาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 53) และกุ้งก้ามกรามบางตัวบริเวณเปลือกคลุมหัวด้านในของแผ่นปิดเหงือกของกุ้งเป็นสีดำ สาเหตุอาจเกิดจากการมีของเสียที่สะสมอยู่มากที่บริเวณพื้นบ่อ (ภาพที่ 54 A,B)

สำหรับลักษณะ inclusion body ของ HPLV ที่พบในกุ้งทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่มีลักษณะเหมือนกันคือ พบ inclusion bodies อยู่ภายในทำให้นิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อย้อมด้วยสี H&E จะเห็นนิวเคลียสของเซลล์ที่มี inclusion ติดสีอีโอซิน (ภาพที่ 55-56) นอกจากนี้ภายใน inclusion bodies บางเซลล์อาจพบลักษณะของหมวก (cap) หรือรูปพระจันทร์เสี้ยวจะอยู่บริเวณริมสุดด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 57)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามขนาดเล็กยังพบ ว่ามีการตายของเซลล์ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 58-59) และกึ่งบางตัวพบการติดเชื้อ microsporidian ในเซลล์ตับและตับอ่อน เซลล์ตับและตับอ่อนมีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม (ภาพที่ 60) กึ่งบางตัวถึงแม้จะพบปริมาณ R-cell มากแต่ก็ยังพบการตายของเซลล์เป็นจำนวนมากด้วย (ภาพที่ 61-62) ในขณะที่กึ่งก้ามกรามขนาดเล็กจำนวนหนึ่งพบว่าท่อตับและตับอ่อนฝ่อ (ภาพที่ 64) ทั้งนี้เนื่องจากอุปนิสัยของกึ่งก้ามกรามที่มีขนาดใหญ่กว่าจะ ครอบครองอาณาเขตเป็นบริเวณกว้าง ทำให้กึ่งก้ามกรามตัวที่ขนาดเล็กกว่าไม่สามารถเข้ามายังบริเวณที่มีอาหาร หรือบริเวณที่เป็นพื้นสะอาดได้ จึงทำให้กึ่งที่มีขนาดเล็กไปอยู่ตามบริเวณแนว เวนที่มีของเสียสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก จึงส่งผลให้กึ่งเหล่านี้อ่อนแอพบลักษณะเซลล์ท่อตับและตับอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรง เกิด nodule formation (ภาพที่ 65 A,B) โดยกลุ่มของ hemocytes จะเรียงตัวกันเกิดเป็น encapsulation และ nodule formation ซึ่งเป็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงคล้ายกับการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง Smith and Ratcliffe (1980) กล่าวว่ากระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดได้ทั่วร่างกาย แต่จะพบมากบริเวณซี่เหงือก ลำตัว หัวใจ ตับและตับอ่อน

นอกจากนี้ยังพบการเกิด melanization ในบริเวณที่มีการอักเสบ (ภาพที่ 66-68) และยังพบลักษณะของ spheroid ในช่องว่างของท่อตับและตับอ่อน ด้วย (ภาพที่ 69-71) การศึกษาพยาธิสภาพของเหงือกพบมีของเหลวอยู่ภายใน และเกิด hyperplasia ของ epithelial cells คือมีจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นทำให้กึ่งเหงือกจำนวนมากจะติดกัน ซึ่งมีผลต่อการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของกึ่ง (ภาพที่ 72 A,B) และพบโปรโตซัว *Epistylis* sp. เกาะที่บริเวณเหงือก เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 73 A,B)

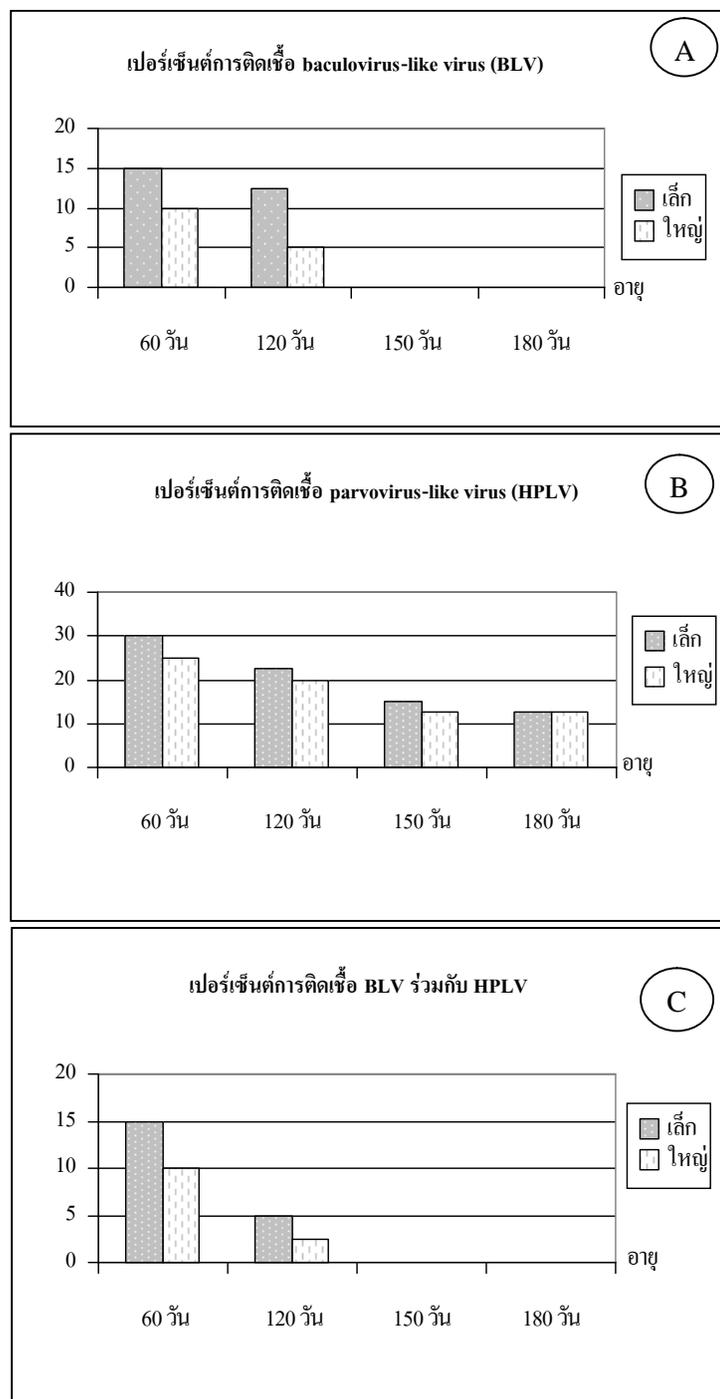
อย่างก็ตามกึ่งก้ามกรามขนาดใหญ่จำนวนหนึ่งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีลักษณะตับและตับอ่อนสมบูรณ์มากเพราะมีปริมาณ R-cell เป็นจำนวนมาก โดย R-cell ทำหน้าที่สะสมอาหารที่ย่อยแล้ว เม็ดไขมัน กลีโธแร และสารที่จำเป็นต่อร่างกาย (อนุตรา, 2534 และ Vogt, 1992) (ภาพที่ 74 A,B) กึ่งบางตัวพบปริมาณ B-cell จำนวนมาก (ภาพที่ 75) และมีเซลล์เม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับและตับอ่อน (interstitial cell) (ภาพที่ 76) พบเซลล์เม็ดเลือดห้อมล้อมเซลล์ตายซึ่งอยู่ระหว่างท่อตับและตับอ่อน (ภาพที่ 77)

ในขณะที่กึ่งก้ามกรามขนาดใหญ่ที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรี พบว่าตับและตับอ่อนมีปริมาณ R-cell จำนวนมาก (ภาพที่ 78) ในกึ่งขนาดเล็กบางตัวพบการเกิด nodule

formation และการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลจากกระบวนการ melanization (ภาพที่ 79-80 A,B) และยังพบว่ากึ่งบางตัวพบลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกมีของเหลวอยู่ภายใน (ภาพที่ 81-82)

ตารางที่ 10 ปริมาณการติดเชื้อ BLV, HPLV และการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV ในตับ และตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

บ่อ	อายุ (วัน)	ขนาด	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	จำนวนตัว ที่ตรวจ (ตัว)	ติดเชื้อ BLV (เปอร์เซ็นต์)	ติดเชื้อ HPLV (เปอร์เซ็นต์)	ติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV (เปอร์เซ็นต์)
บ่อ P	60	เล็ก	2.83±0.67	20	15	30	15
		ใหญ่	6.80±0.77	20	10	25	10
บ่อ P1	120	เล็ก	10.15±0.65	20	10	25	5
		ใหญ่	19.63±1.0	20	5.0	25	5
บ่อ P2	120	เล็ก	9.25±0.92	20	15	20	5
		ใหญ่	18.93±1.22	20	5.0	15	0
เฉลี่ย	120	เล็ก	9.70±0.91		12.5	22.5	5.0
		ใหญ่	19.28±1.15		5.0	20.0	2.5
บ่อ P3	150	เล็ก	30.13±1.13	20	0	15	0
		ใหญ่	42.48±1.52	20	0	10	0
บ่อ P4	150	เล็ก	31.15±1.41	20	0	15	0
		ใหญ่	45.35±1.29	20	0	15	0
เฉลี่ย	150	เล็ก	30.64±1.41		0	15.0	0
		ใหญ่	43.91±2.01		0	12.5	0
บ่อ P3	180	เล็ก	41.18±0.91	20	0	20	0
		ใหญ่	69.25±1.69	20	0	10	0
บ่อ P4	180	เล็ก	40.48±1.11	20	0	5	0
		ใหญ่	68.93±1.77	20	0	15	0
เฉลี่ย	180	เล็ก	40.83±1.06		0	12.5	0
		ใหญ่	69.09±1.69		0	12.5	0



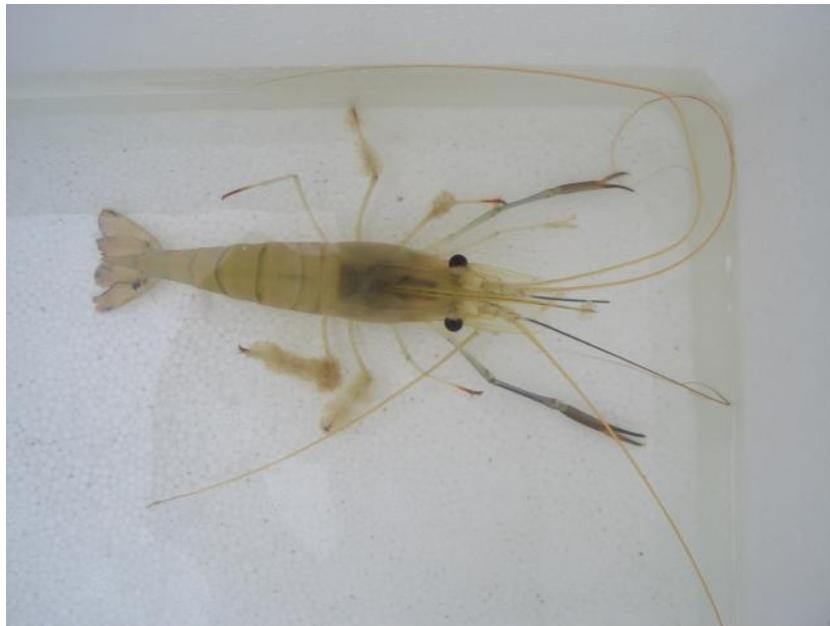
ภาพที่ 50 A,B,C เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ BLV (A), HPLV (B) และการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV (C) ในตัวและตัวอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรี

ตารางที่ 11 ปริมาณการติดเชื้อ BLV, HPLV และการติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV ในตับและตับอ่อนของกึ่งกัมกรามที่ใช้แม่พันธุ์จังหวัดจันทบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

บ่อ	อายุ (วัน)	ขนาด	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	จำนวนตัว ที่ตรวจ (ตัว)	ติดเชื้อ BLV (เปอร์เซ็นต์)	ติดเชื้อ HPLV (เปอร์เซ็นต์)	ติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV (เปอร์เซ็นต์)
บ่อ C	60	เล็ก	3.08±0.69	20	0	0	0
		ใหญ่	7.25±0.75	20	0	0	0
บ่อ C1	120	เล็ก	12.20±0.64	20	0	0	0
		ใหญ่	21.33±0.83	20	0	0	0
บ่อ C2	120	เล็ก	11.35±0.92	20	0	0	0
		ใหญ่	20.65±1.01	20	0	0	0
เฉลี่ย	120	เล็ก	11.78±0.89		0	0	0
		ใหญ่	20.99±0.98		0	0	0
บ่อ C3	150	เล็ก	32.08±1.71	20	0	0	0
		ใหญ่	48.95±1.71	20	0	0	0
บ่อ C4	150	เล็ก	31.88±2.90	20	0	0	0
		ใหญ่	47.63±2.04	20	0	0	0
เฉลี่ย	150	เล็ก	31.98±2.35		0	0	0
		ใหญ่	48.29±1.97		0	0	0
บ่อ C3	180	เล็ก	48.50±2.49	20	0	0	0
		ใหญ่	73.10±3.76	20	0	0	0
บ่อ C4	180	เล็ก	47.50±3.24	20	0	0	0
		ใหญ่	74.03±2.68	20	0	0	0
เฉลี่ย	180	เล็ก	48.00±2.90		0	0	0
		ใหญ่	73.56±3.26		0	0	0



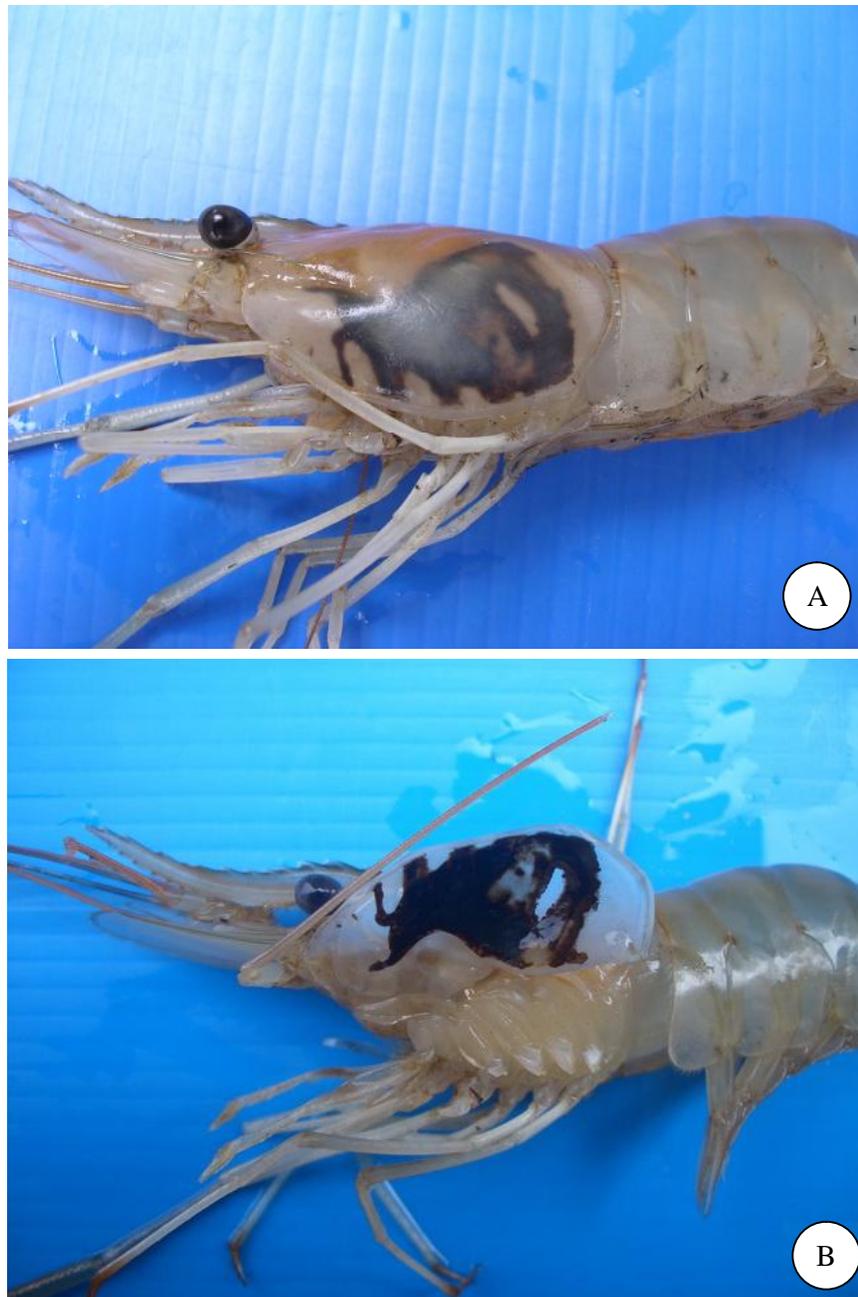
ภาพที่ 51 A,B บ่อดินขนาด 3 ไร่ สำหรับลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ (A) และบ่อดินขนาด 3 ไร่ สำหรับลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (B) มีเครื่องให้อากาศแบบใบพัดตีน้ำแขนยาว 1 เครื่อง



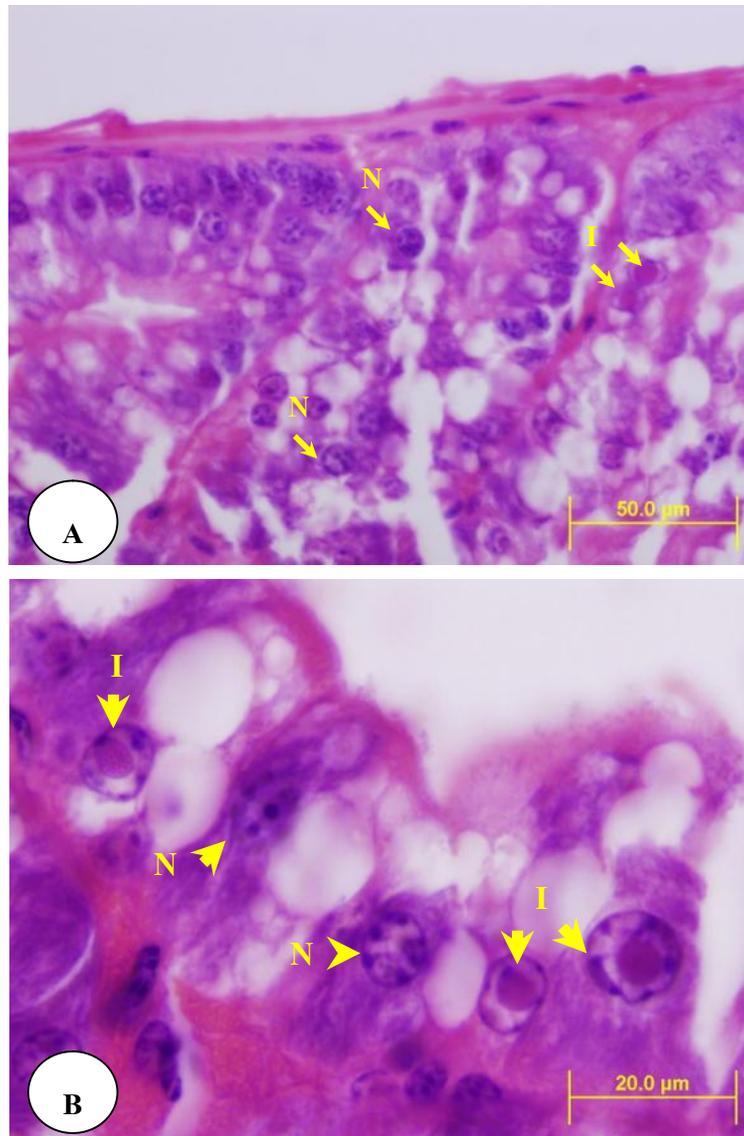
ภาพที่ 52 กุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรี พบ มี *Epistylis* sp. เกาะบริเวณ
รยางค์เป็นจำนวนมาก



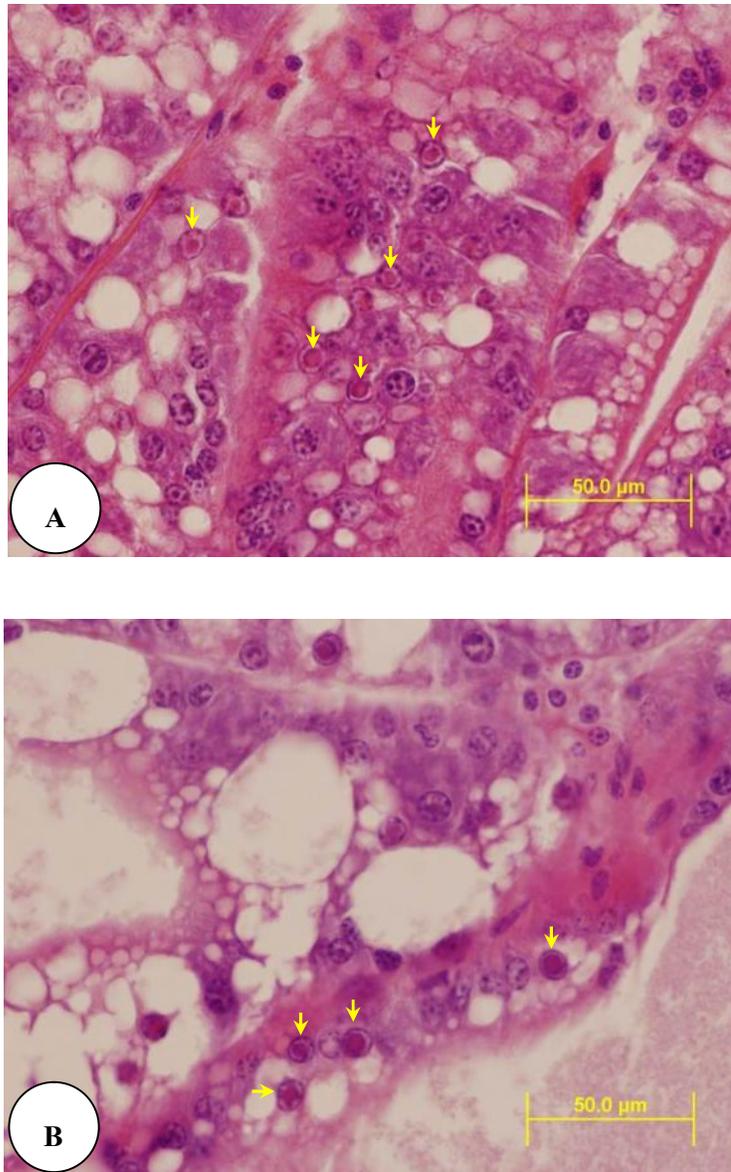
ภาพที่ 53 กุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีบางตัวแผ่นปิดเหงือกกร่อน



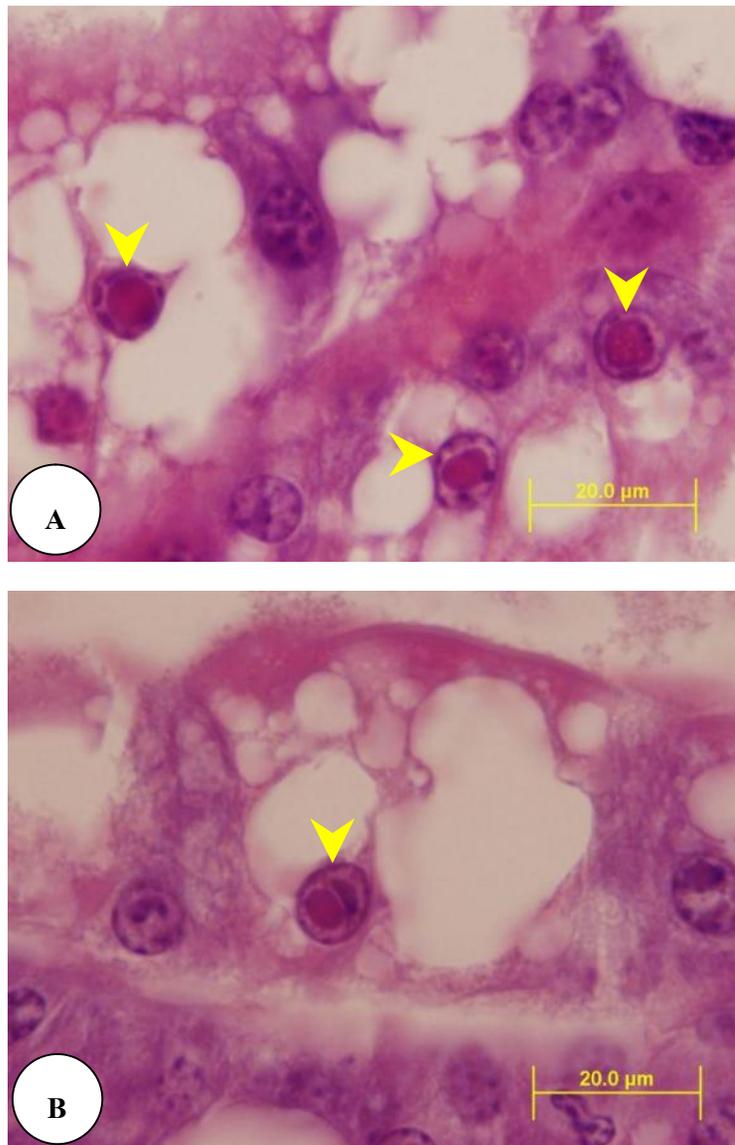
ภาพที่ 54 A,B กุ้งก้ามกรามพ่อแม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัสบางตัวพบเปลือกคลุมหัวมีสีดำ (A) เมื่อเปิดเปลือกออกพบคราบสีดำเกาะด้านในของเปลือก (B)



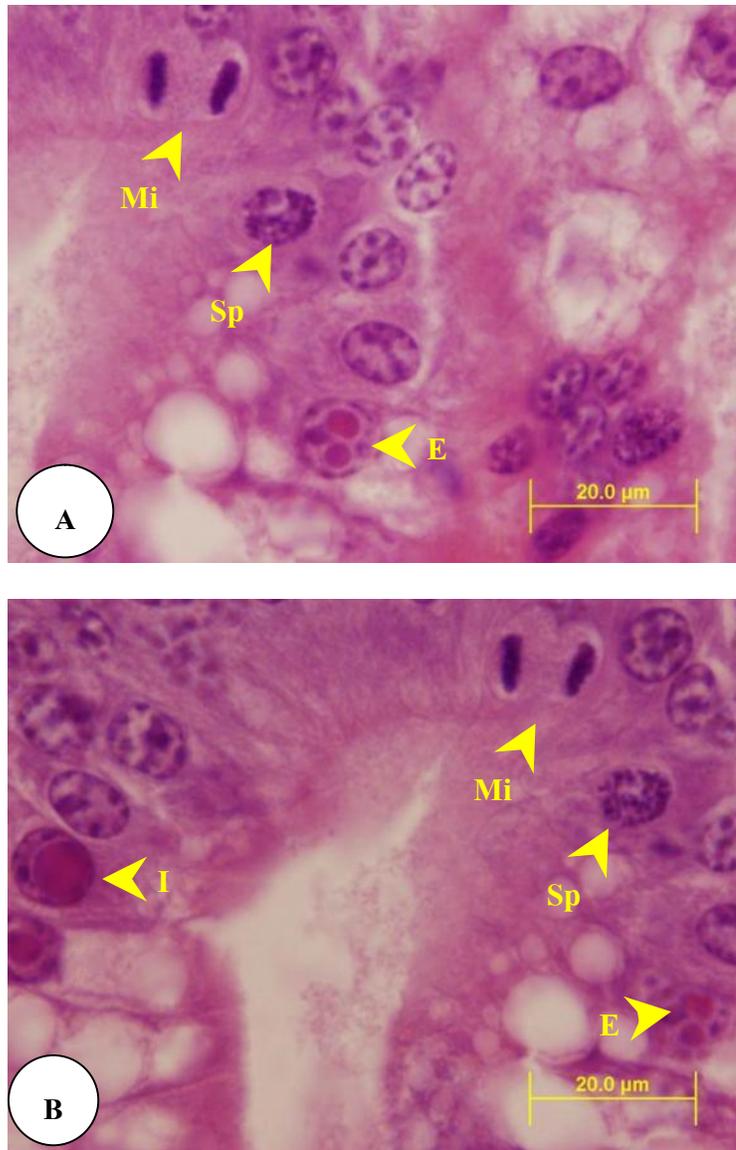
ภาพที่ 55 A,B ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรีพบ inclusion bodies (I) ของ HPLV และมีเซลล์ปกติ (N) (H&E)



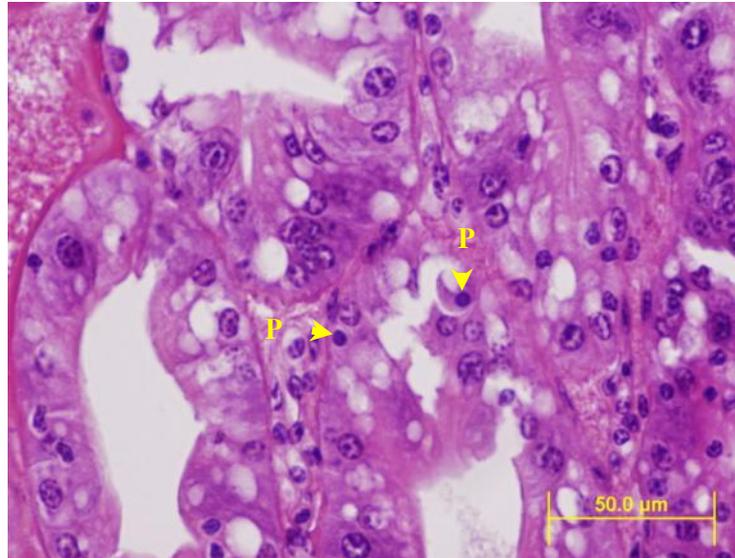
ภาพที่ 56 A,B Inclusion bodies (สรีรี) ของ HPLV ในเซลล์ต้นและตัวอ่อนของกึ่งกำกรมที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ (H&E)



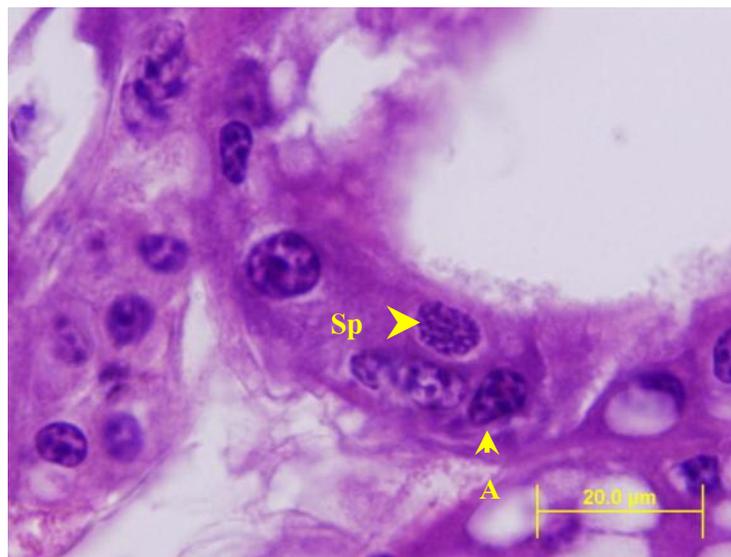
ภาพที่ 57 A,B Intranuclear inclusion (สรชี) ของ HPLV ในเซลล์ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ากรมที่
ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



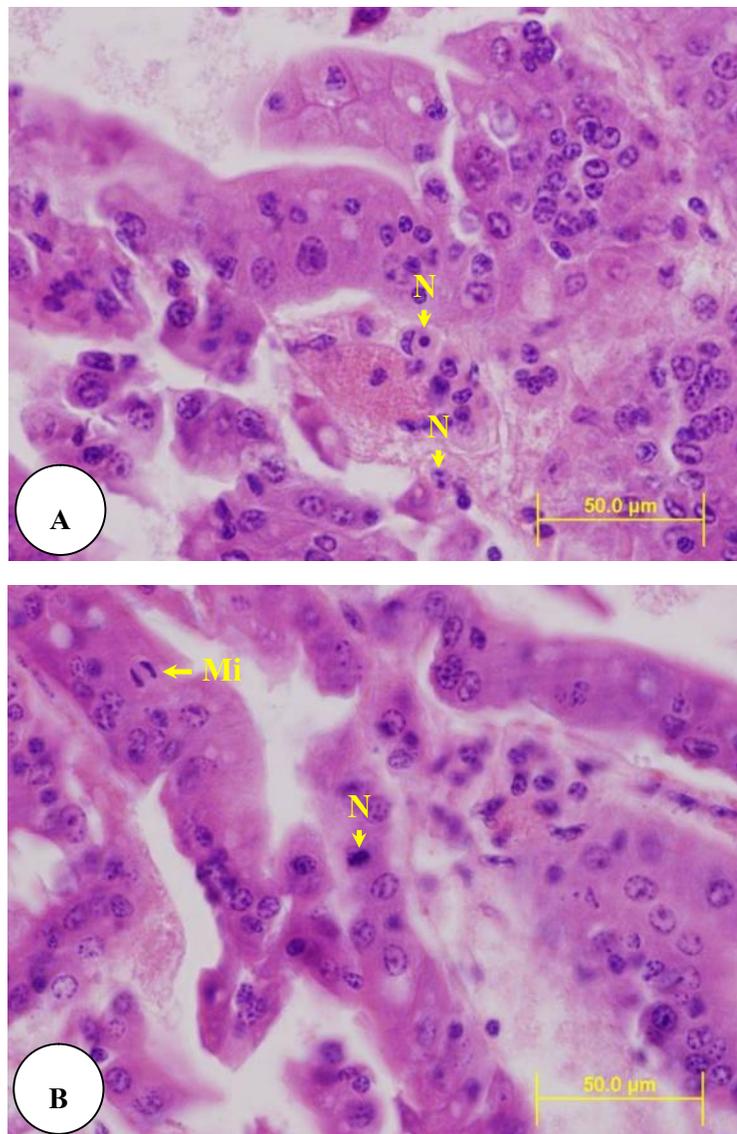
ภาพที่ 58 A,B Intranuclear inclusion (I) และ inclusion body ของ HPLV ในระยะเริ่มต้น (early stage) ในเซลล์ตับและตับอ่อน มีการติดเชื้อ microsporidian (Sp) ร่วมด้วย และพบมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis (Mi) (H&E) จากตัวอย่างกึ่งกำมกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด จากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



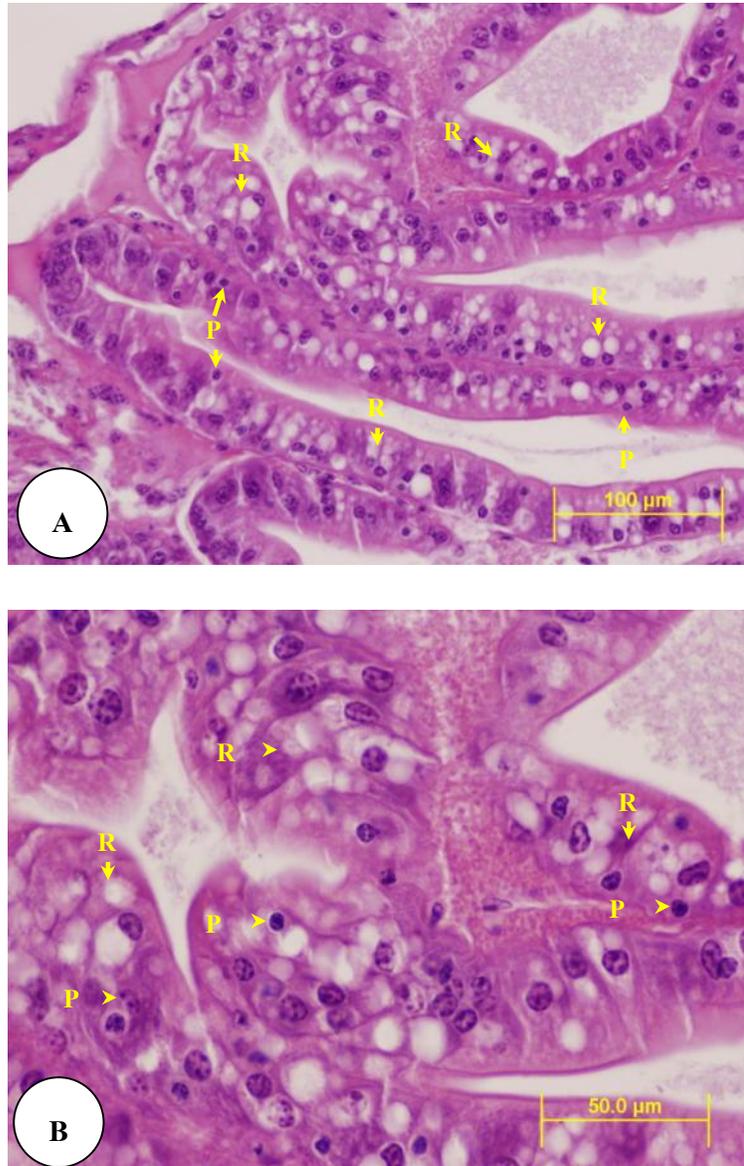
ภาพที่ 59 กิ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี มีของเซลล์ตับและตับอ่อนบางส่วนตาย (pyknotic nuclei:P) (H&E)



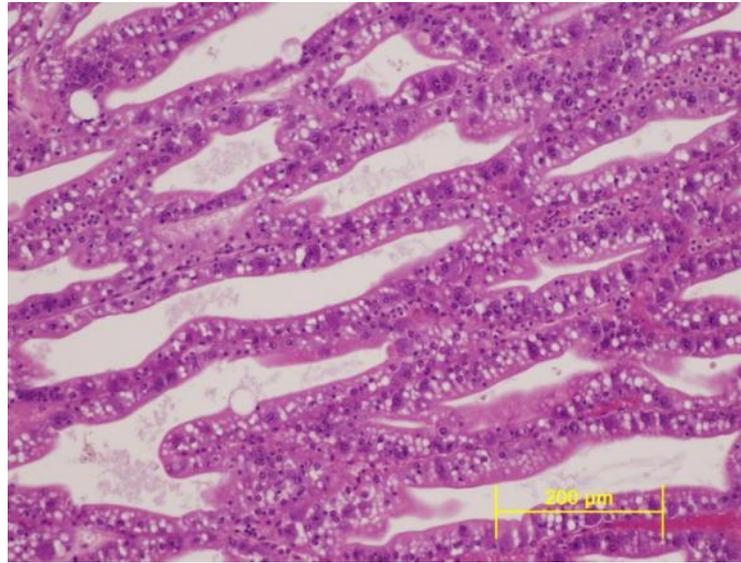
ภาพที่ 60 ลักษณะของ microsporidian (Sp) ที่พบในเซลล์ตับและตับอ่อนซึ่งมีรูปร่างผิดปกติ (A) ในกิ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



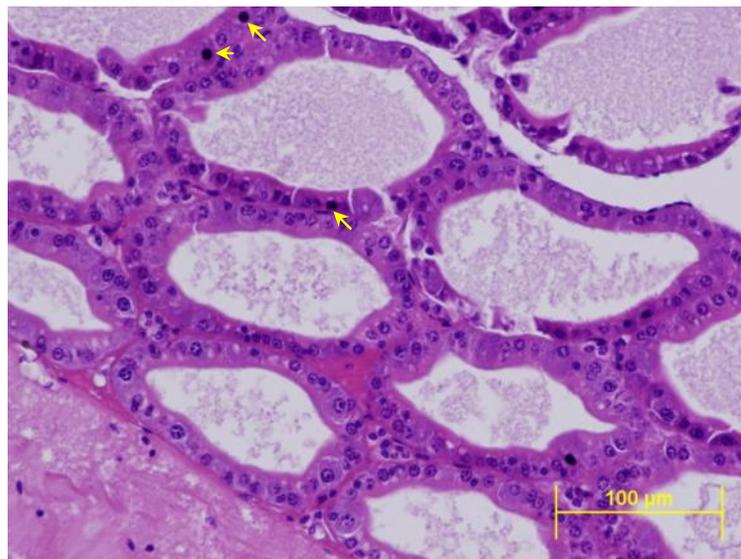
ภาพที่ 61 A,B เซลล์ตับและตับอ่อนที่ตาย (necrosis; N) และมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitotic figure; mi) ในกึ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



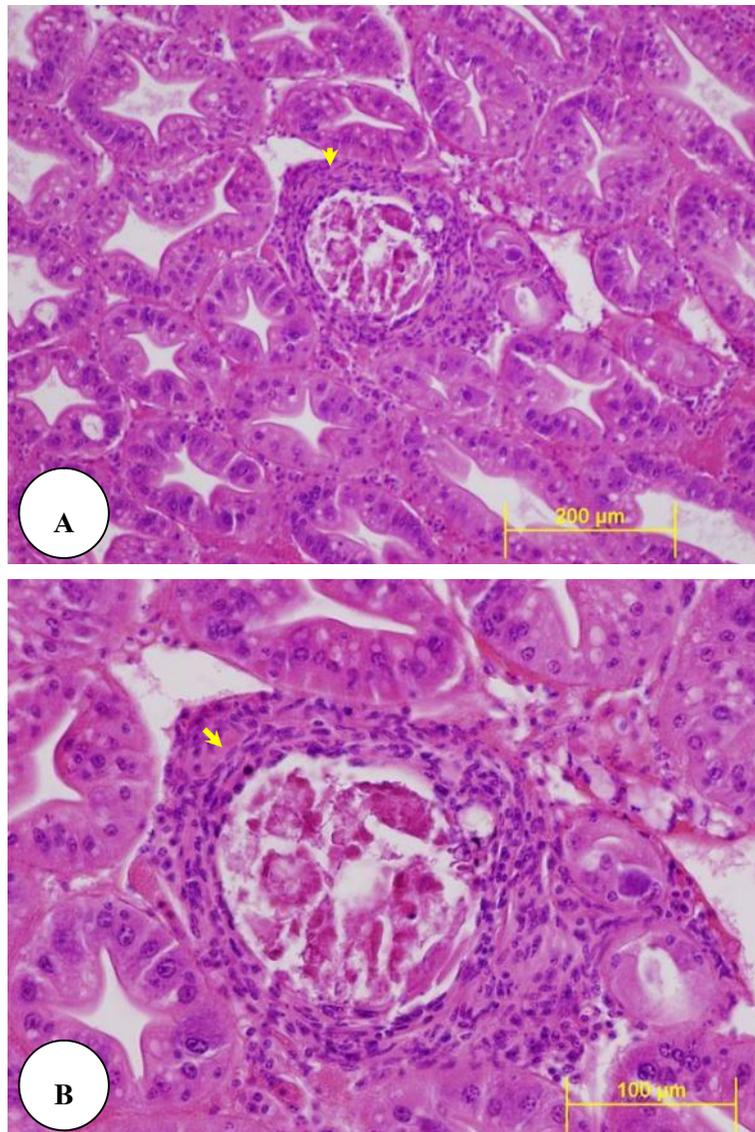
ภาพที่ 62 A,B R-cell (R) จำนวนมากในเซลล์ตับและตับอ่อนและเซลล์ที่ตาย (pyknosis;P) ในกึ่ง
 ก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



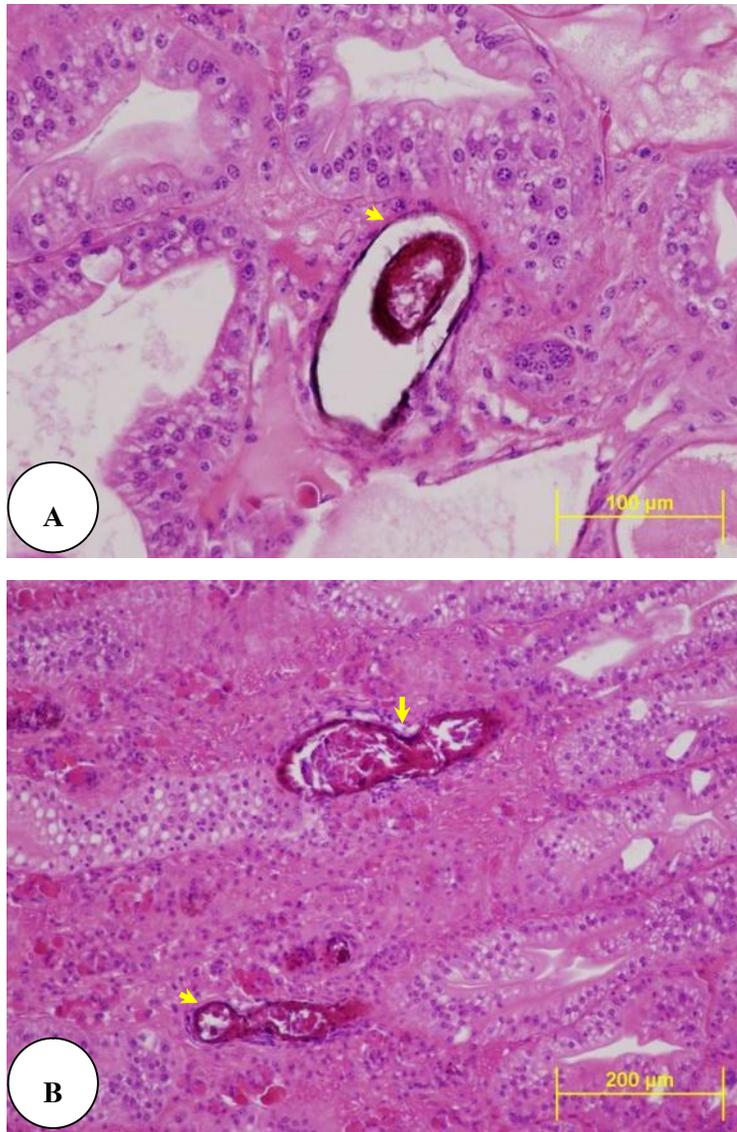
ภาพที่ 63 ปริมาณเม็ดไขมันมากจำนวนในเซลล์สืบและตัวอ่อนในกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



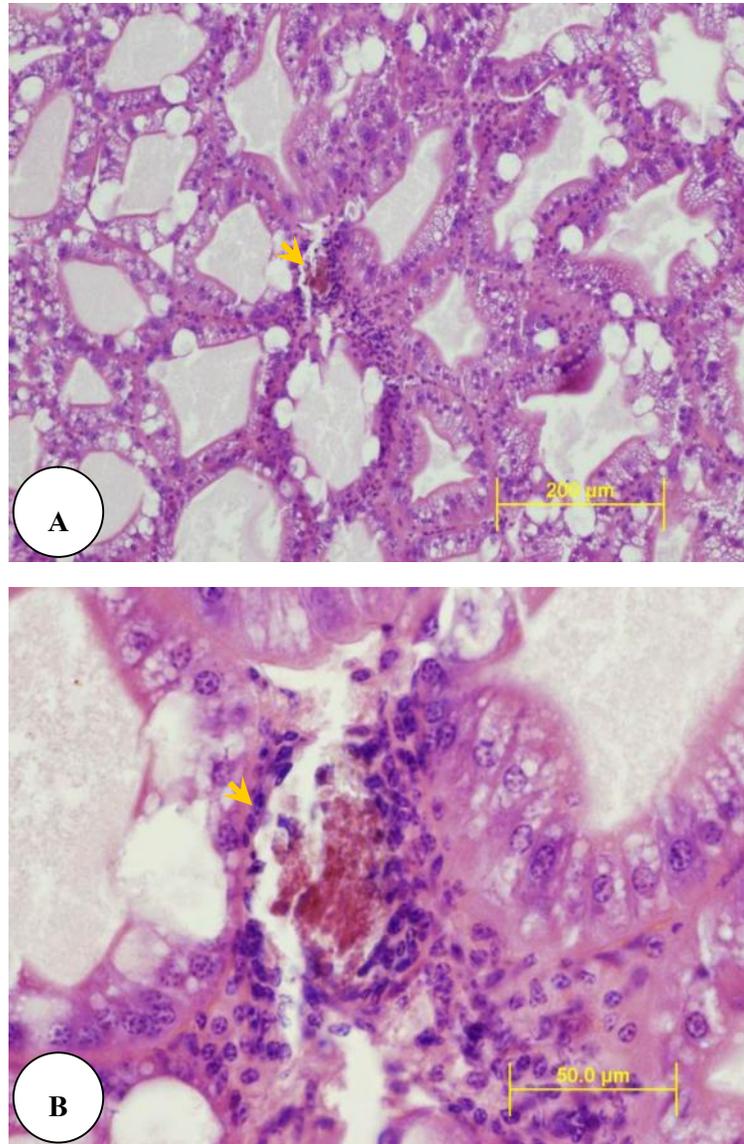
ภาพที่ 64 ลักษณะของท่อตัวและตัวอ่อนที่ฝ่อ (atrophy tubule) ของเซลล์สืบและตัวอ่อนและพบเซลล์ตาย (ครี) จำนวนมากในกึ่งก้ามกรามขนาดเล็กที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจากจังหวัดเพชรบุรี (H&E)



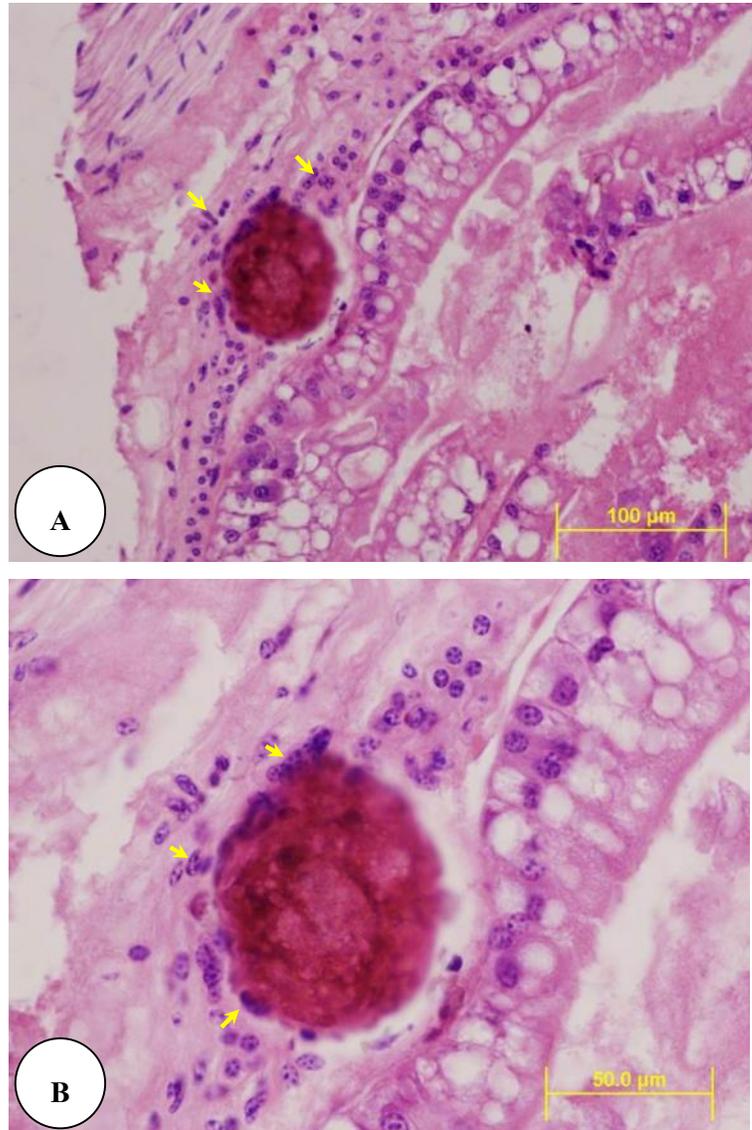
ภาพที่ 65 A,B การเกิด nodule formation มีเซลล์เม็ดเลือดห้อมล้อมเซลล์ตับและตับอ่อนที่ตาย จาก ตัวอย่างกุ้งที่ไซ้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



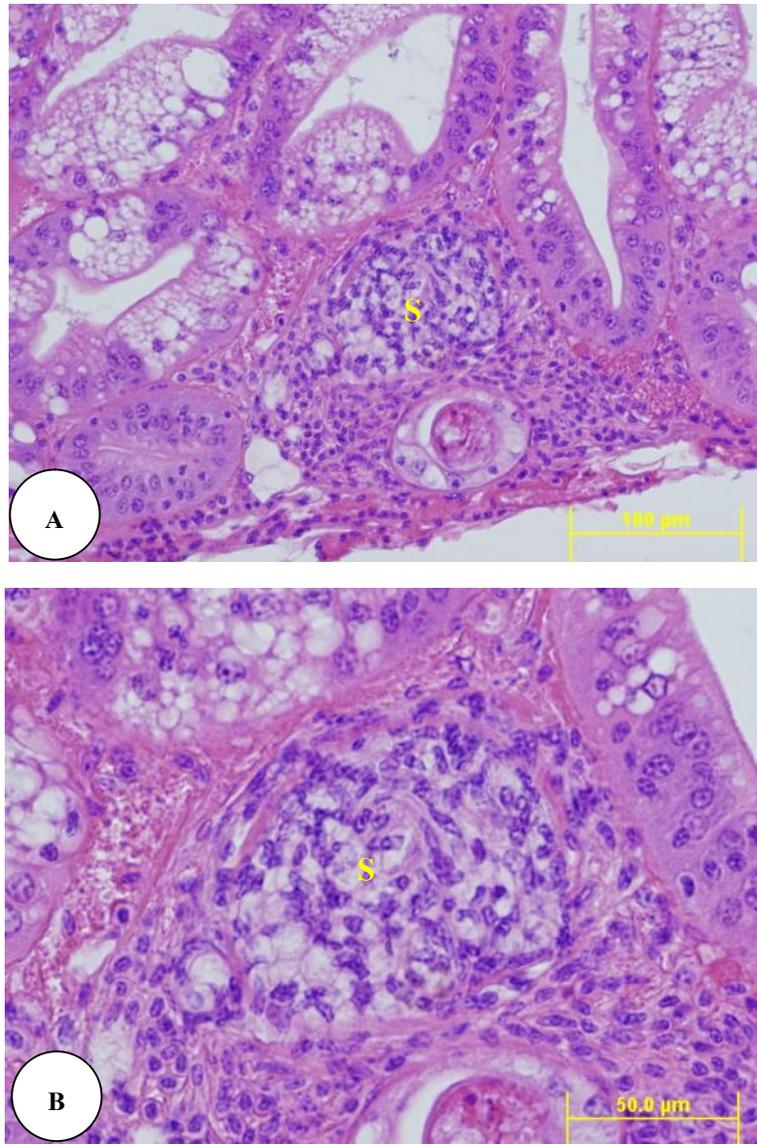
ภาพที่ 66 A,B ท่อค้ำและค้ำอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรง เกิดกระบวนการ melanization ในตัวอย่างกุ้งที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



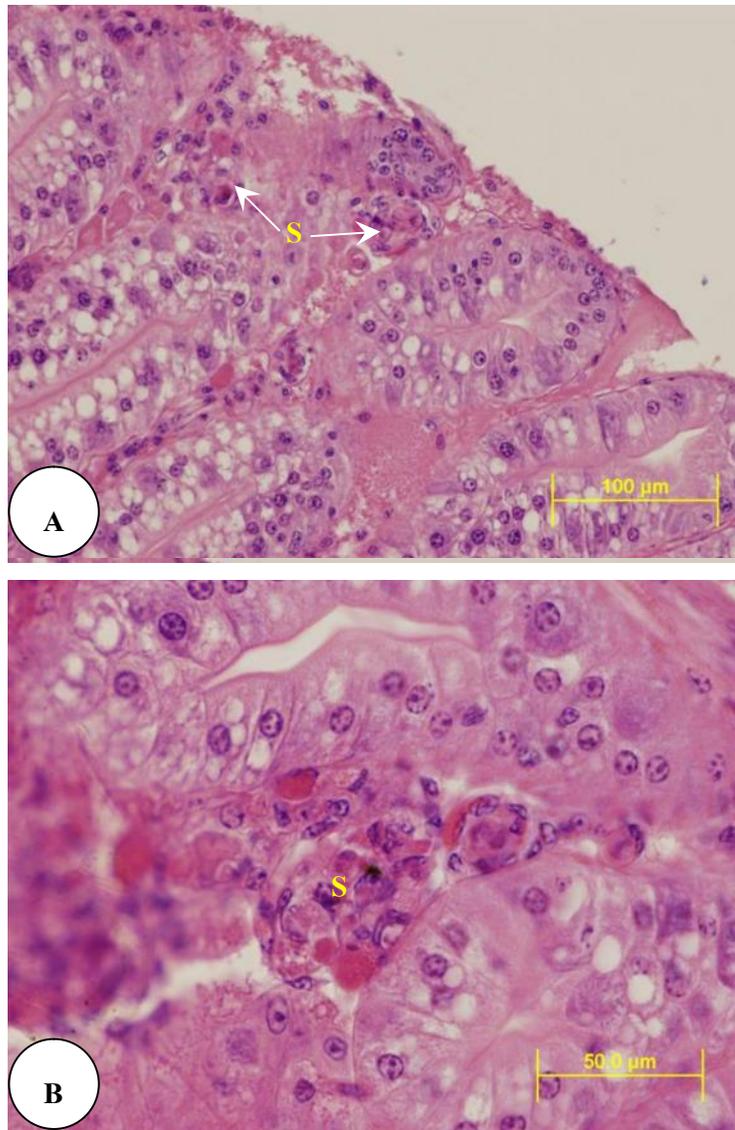
ภาพที่ 67 A,B การเกิด melanization ในเซลล์ตับและตับอ่อน ในตัวอย่างกึ่งที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



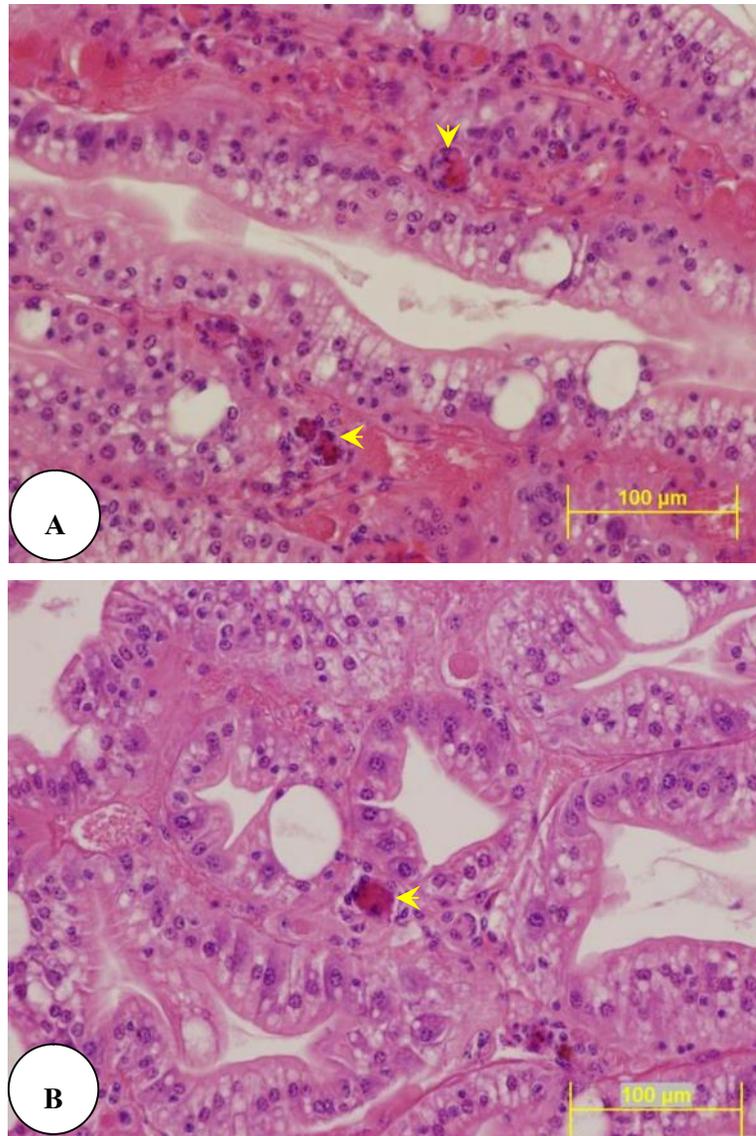
ภาพที่ 68A,B การเกิด melanization ในเซลล์ตับและตับอ่อน มีเม็ดเลือดห้อมล้อมเซลล์ที่ตาย (hemocyte infiltration) ในตัวอย่างกึ่งที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



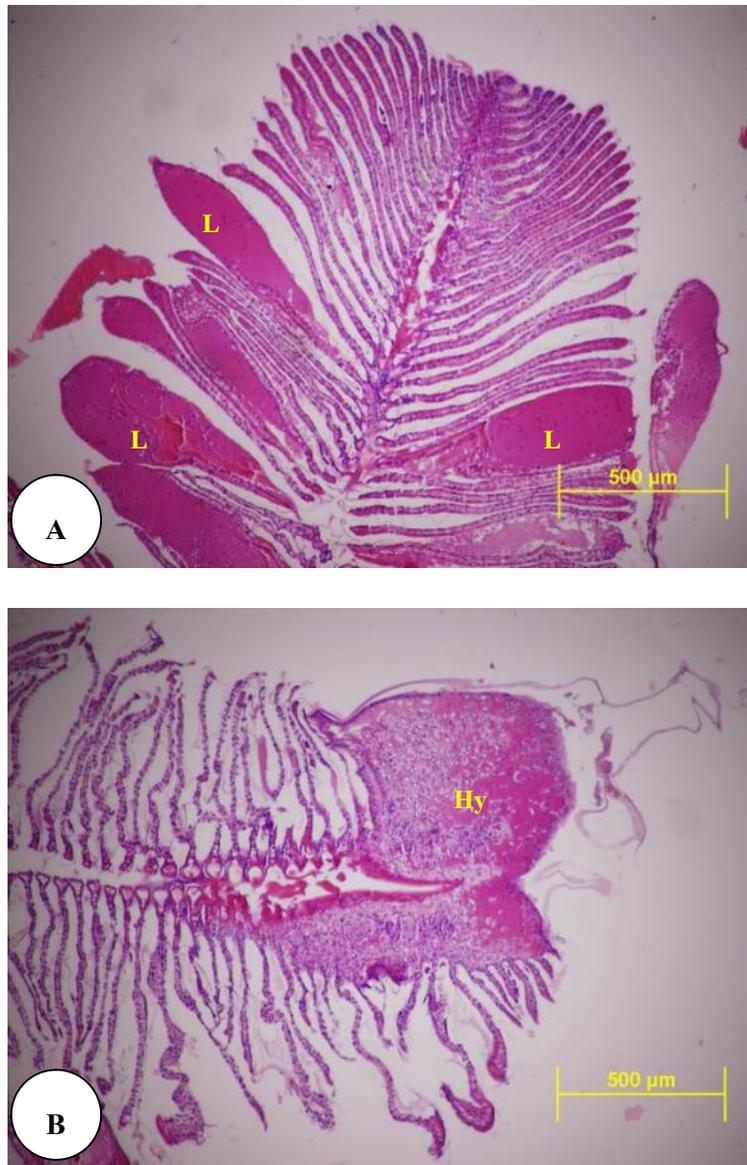
ภาพที่ 69 A,B ลักษณะของ spheroid (S) ในต้นและต้นอ่อนของกุ่มก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



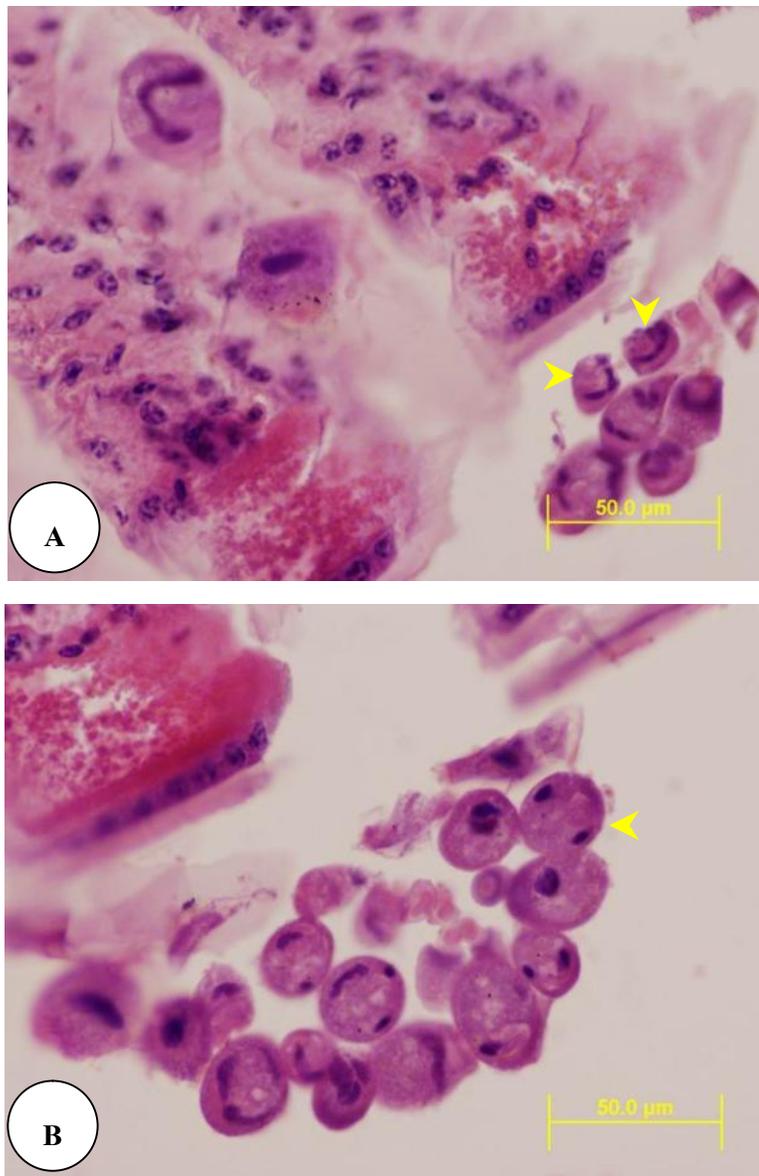
ภาพที่ 70 A,B ลักษณะของ spheroid (S) แทรกระหว่างตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



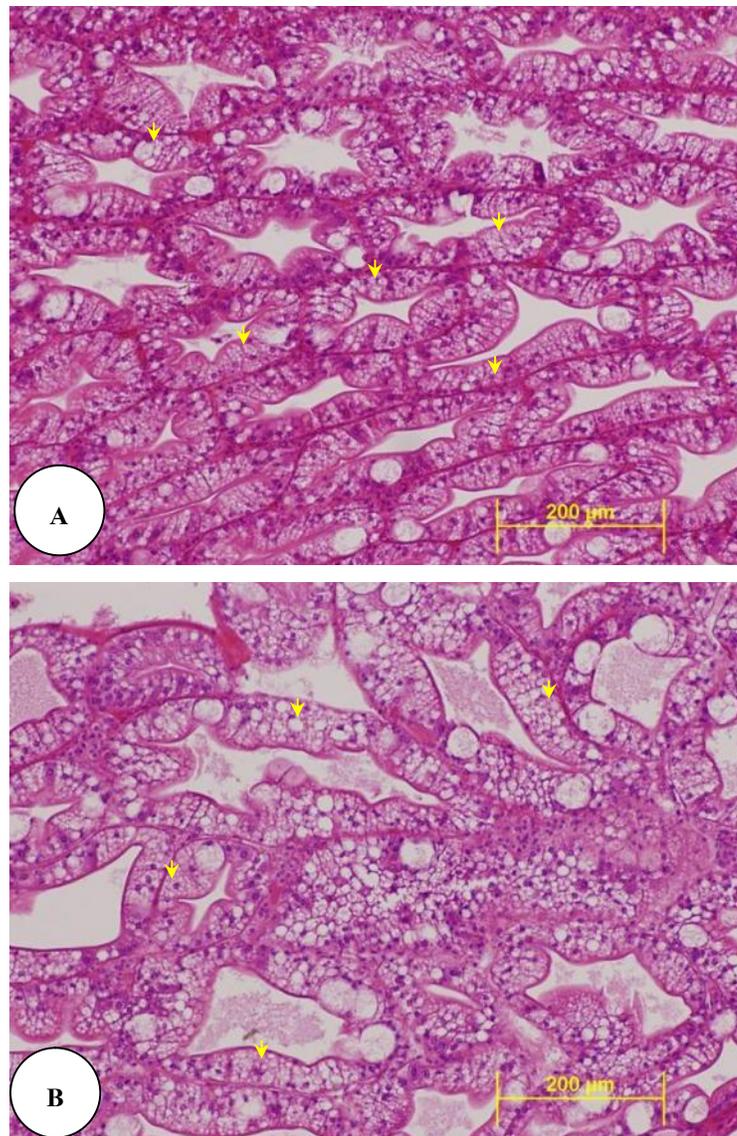
ภาพที่ 71 A,B การเกิด spheroid (สรชี้) แทรกระหว่างตับและตับอ่อนของก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



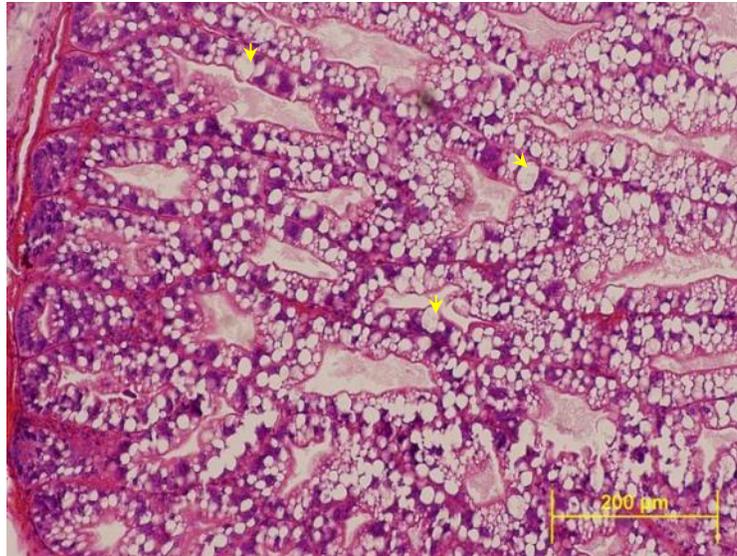
ภาพที่ 72 A,B พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของเต้านม (L) และเกิด hyperplasia (Hy) ของ epithelial cells ในตัวอย่างใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



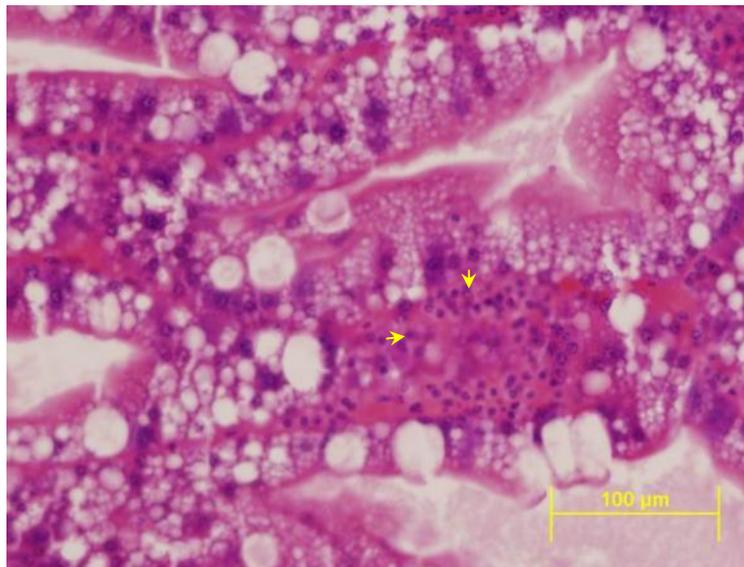
ภาพที่ 73 A,B บริเวณเหงือกกุ้งจะมีโปรโตซัว *Epistylis* sp. (สรชี) จำนวนมากตัวอย่างกุ้งที่ใช้
แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



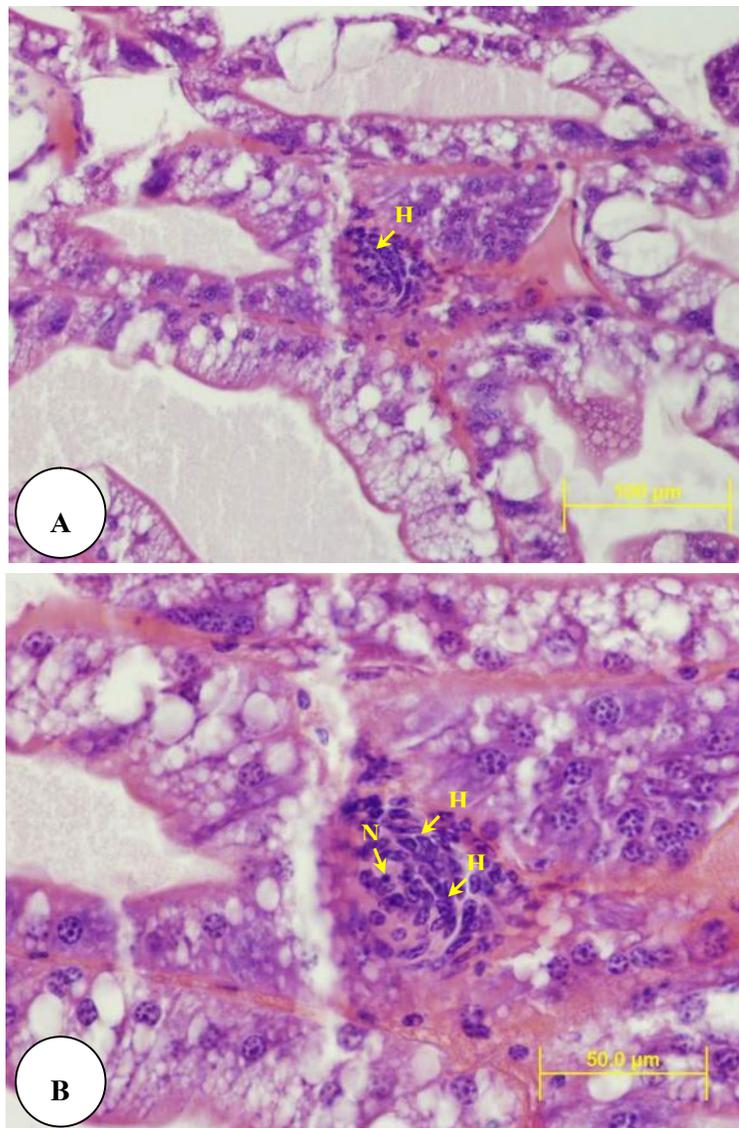
ภาพที่ 74 A,B ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV จากจังหวัด เพชรบุรีพบปริมาณ R-Cell จำนวนมาก (ศรีชัย) (H&E)



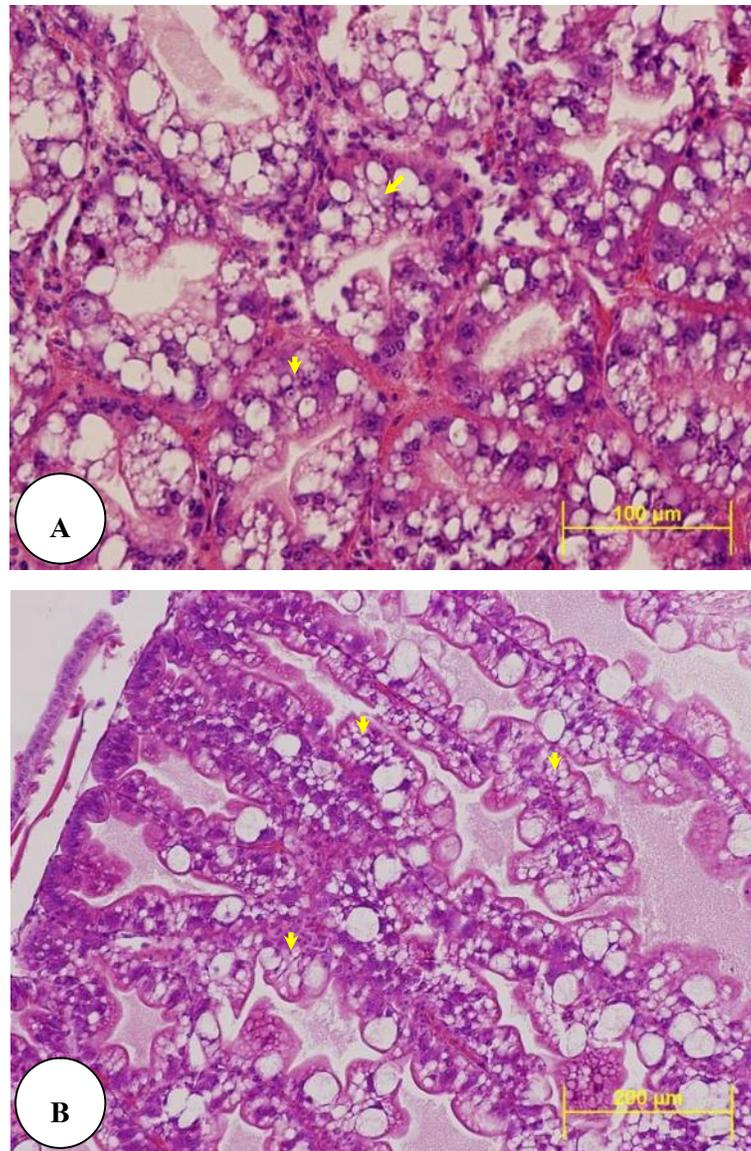
ภาพที่ 75 ตับและตับอ่อนของกึ่งก้ามกรามพบปริมาณ B-Cell จำนวนมาก (สรชี) จากตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



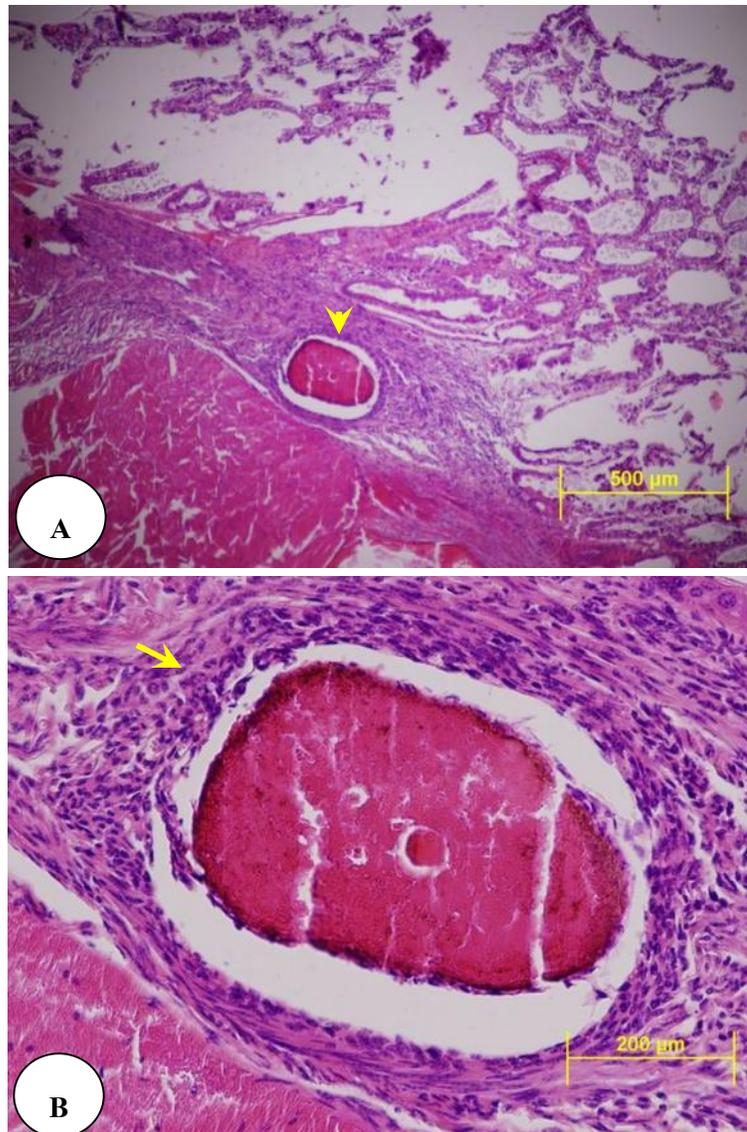
ภาพที่ 76 เซลล์เม็ดเลือด (สรชี) จำนวนมากแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่างท่อตับและตับอ่อน จากตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



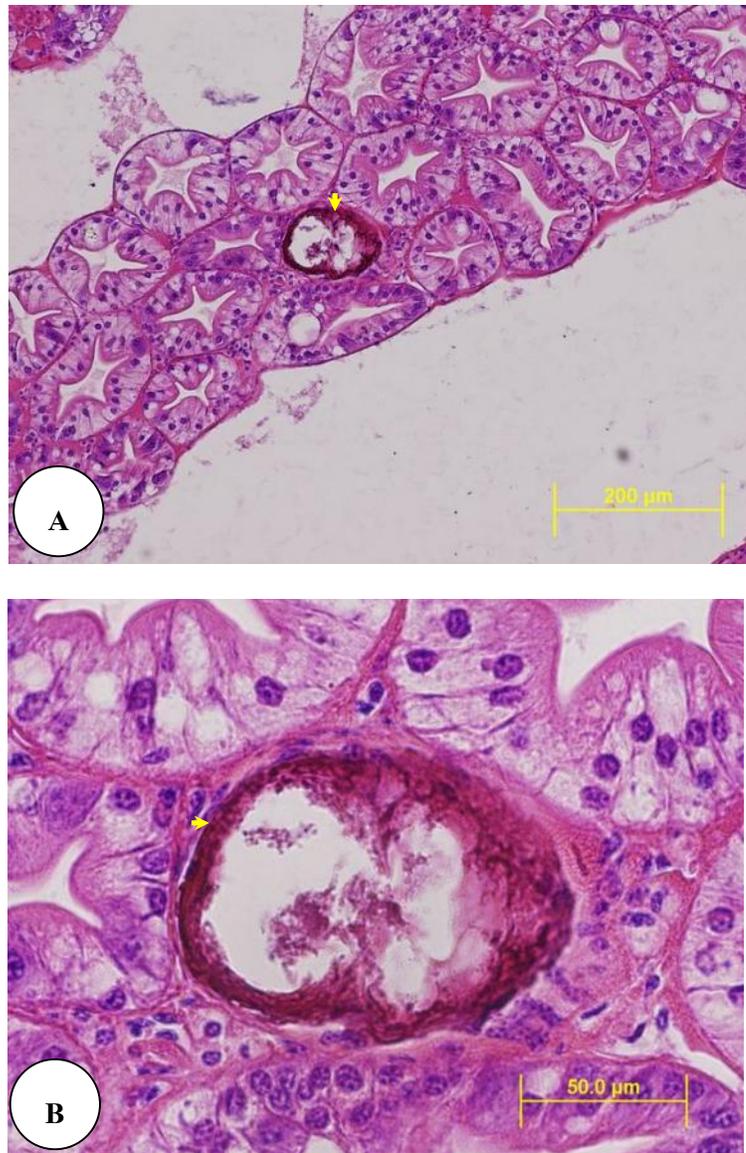
ภาพที่ 77 A,B เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes; H) ห่อมล้อมเซลล์ที่ตาย (necrotic cell; N) ระหว่างท่อ
 ตับและตับอ่อนจากตัวอย่างกิ้งก่ามกราคมที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV
 (H&E)



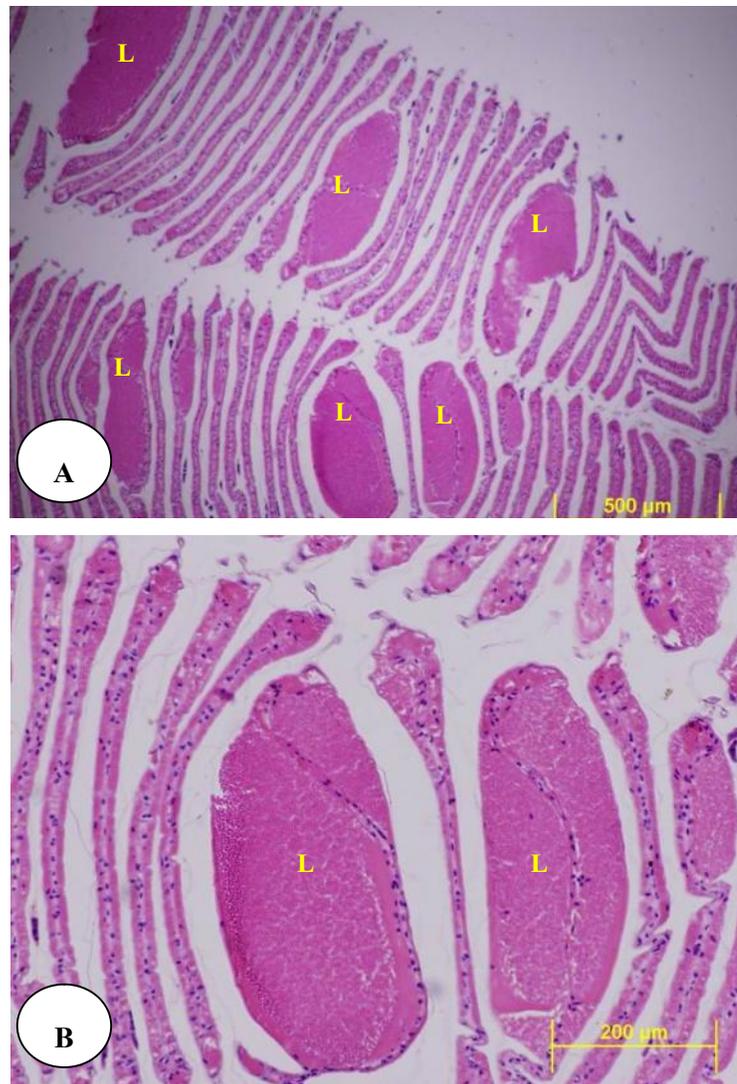
ภาพที่ 78 A,B ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกรามขนาดใหญ่พบ ปริมาณ R-Cell จำนวนมาก (สรชี้)
ในกิ้งก่ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV จากจังหวัดจันทบุรี (H&E)



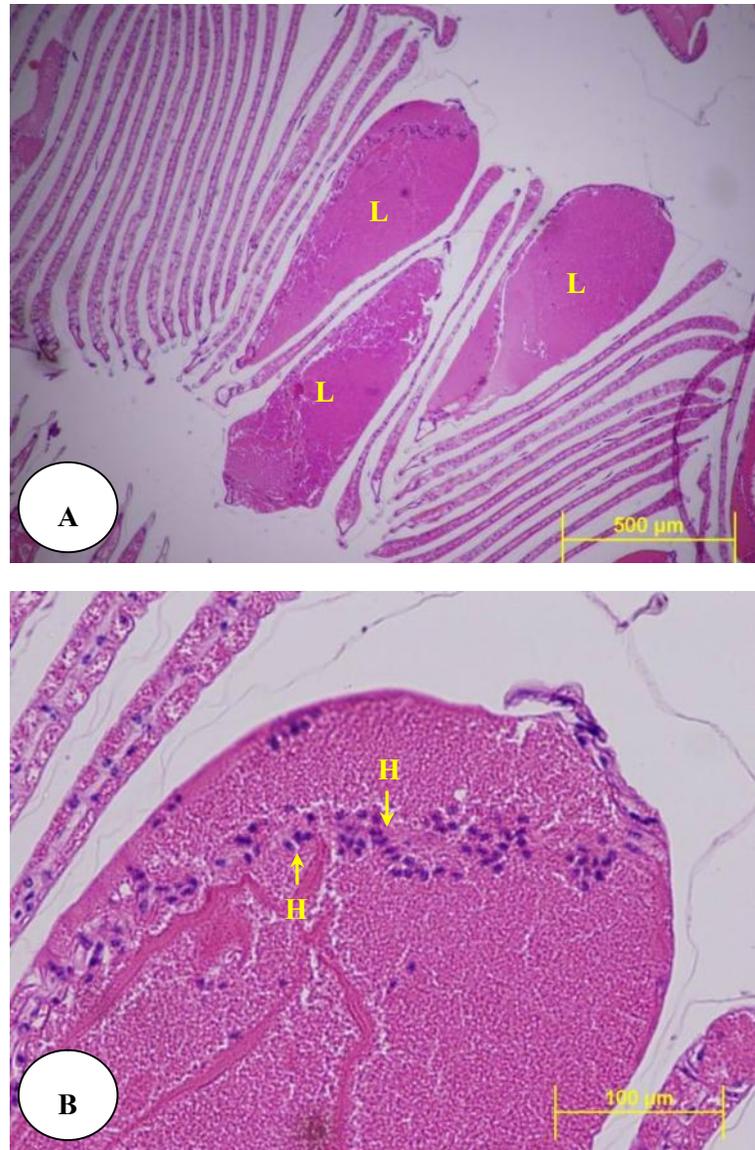
ภาพที่ 79 A,B การเกิด nodule formation มีเซลล์เม็ดเลือดห้อมล้อมเซลล์ตับและตับอ่อนที่ตายในกิ่ง
ก้ามกรามขนาดเล็กที่ไข่แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



ภาพที่ 80 A,B การเกิด melanization ในเซลล์ตับและตับอ่อนในกิ้งก่าแกรมที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



ภาพที่ 81 A,B พยาธิสภาพของหน่ออกพบมีของเหลวอยู่ภายใน (L) ในกึ่งกำกรมที่ใช้แม่พันธุ์
ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)



ภาพที่ 82 A,B พยาธิสภาพของเหงือกมีเซลล์เม็ดเลือด (H) บริเวณที่มีของเหลวภายใน (L) ของกิ้งก่ามกราคมที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อ BLV และ HPLV (H&E)

4.2 การศึกษาปริมาณผลผลิต อัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ต่างกัน

สำหรับผลการเลี้ยงกุ้ง ทั้ง 4 บ่อ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 180 วัน พบว่า บ่อทดลองที่ปล่อย ลูกกุ้งที่ใช้แม่พันธุ์กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดจากจังหวัดเพชรบุรี ให้ผลผลิตเฉลี่ย 198.25 ± 1.22 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งที่ปล่อยเชื้อไวรัสจากจังหวัดจันทบุรีซึ่งมีผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 202.55 ± 0.78 กิโลกรัมต่อไร่ แต่อัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งจากกลุ่มใช้แม่พันธุ์ติดเชื้อไวรัส สูงกว่ากุ้งที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อคือมีค่าเท่ากับ 68.43 ± 0.76 และ 63.49 ± 0.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 12 ผลผลิตการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในการศึกษาครั้งนี้จากทั้ง 2 กลุ่มการทดลองให้ผลผลิตต่ำกว่าที่มีการศึกษาโดย นวลจิรา (2548) ซึ่งเลี้ยงแบบพัฒนาและมีการย้ายบ่อ คือให้ผลผลิต 305 กิโลกรัมต่อไร่

เมื่อพิจารณาถึงค่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ากุ้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อจับกุ้งน้อยกว่ากุ้งในกลุ่มที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส โดยที่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักกุ้งที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสมีค่าเท่ากับ 54.96 กรัมในขณะที่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อเท่ากับ 60.78 กรัม เนื่องจากสัดส่วนของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสในกุ้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ในแต่ละช่วงอายุนั้นไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่น่าจะส่งผลทำให้เกิดปัญหาการโตช้าในกุ้งก้ามกรามและการที่กุ้งจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อมีขนาดเฉลี่ยสูงกว่ากุ้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส น่าจะมาจากกุ้งในกลุ่มที่ใช้แม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อมีอัตราการรอดตายต่ำกว่าทำให้ได้น้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากุ้งจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส

ตารางที่ 12 แสดงน้ำหนักเฉลี่ย อัตราการรอดตาย อัตราการแลกเนื้อ อัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตของกึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสจาก จังหวัดเพชรบุรี (P3 และ P4) และแม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรี (C3 และ C4)

บ่อทดลอง	วัน	ขนาด	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	ผลผลิต		จำนวนกึ่ง		อัตราการรอด
				กก./ไร่	เปอร์เซ็นต์	ตัว	เปอร์เซ็นต์	
P3	180	เล็ก	41.18	55.27	28.00	1,342	39.54	
		ใหญ่	69.25	142.11	72.00	2,052	60.46	
		รวม		197.38	100.00	3,394	100.00	
P4	180	เล็ก	40.48	54.88	27.56	1,356	39.32	
		ใหญ่	68.93	144.23	72.44	2,092	60.68	
		รวม		199.11	100.00	3,448	100.00	
เฉลี่ย				198.25±1.22^a				68.43±0.76^a
C1	180	เล็ก	48.50	58.90	29.00	1,214	38.10	
		ใหญ่	73.10	144.20	71.00	1,973	61.90	
		รวม		203.10	100.00	3,187	100.00	
C2	180	เล็ก	47.50	57.47	28.45	1,210	38.26	
		ใหญ่	74.03	144.53	71.55	1,952	61.74	
		รวม		202.00	100.00	3,162	100.00	
เฉลี่ย				202.55±0.78^a				63.49±0.35^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



A



B

ภาพที่ 83 A,B การจับกุ้งก้ามกราม



ภาพที่ 84 A,B กุ้งก้ามกรามเพศผู้ (A) กุ้งก้ามกรามเพศเมีย (B)

4.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ผลการศึกษาคณภาพน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ทำการทดลองตลอดช่วงระยะเวลาการเลี้ยงในทุกบ่อแสดงในตารางที่ 13-14 โดยค่าคุณภาพน้ำส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามสอดคล้องตามรายงานของชโล และ พรเลิศ (2547) อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในการศึกษาครั้งนี้อาจอยู่ในระดับที่สูงกว่าปริมาณออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบพัฒนาในครั้งนี้มีการใช้เครื่องให้อากาศแบบใบพัดตีน้ำแขวนยาว 1 เครื่อง ในบ่อทำให้ค่าออกซิเจนในบ่อเลี้ยงมีค่าสูงกว่าค่าออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบดั้งเดิมทั่วไปซึ่งไม่มีการใช้เครื่องให้อากาศ เลข Boyd (1990) พบว่ากุ้งน้ำจืดในสกุล *Macrobrachium* ใช้ออกซิเจนในอัตรา 200-400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อชั่วโมง New (2000) แนะนำว่าอย่างน้อยควรควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อสัตว์น้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-9.0 สัตว์น้ำกร่อยทนต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชได้ค่อนข้างดีกว่าสัตว์น้ำจืด และสัตว์ทะเล (Boyd and Tucker, 1998) อุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดยปกติแล้วกุ้งก้ามกรามมีการปรับตัวได้ดี สามารถอาศัยอยู่ได้ในอุณหภูมิระดับกว้างตั้งแต่ 15-35 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 31 องศาเซลเซียส Shang and Fujimura (1977) และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามคือ 23.8-31.7 องศาเซลเซียส สำหรับความเป็นด่างของน้ำซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญคือเป็นตัวช่วยควบคุมไม่ให้แหล่งน้ำมีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชรวดเร็วเกินไป และจากการศึกษาครั้งนี้ค่าความเป็นด่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือมีค่าอยู่ระหว่าง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากถ้าค่าความเป็นด่างต่ำ กุ้งจะมีปัญหาในการลอกคราบและมีอัตราการรอดตายต่ำ (ชโล และ พรเลิศ, 2547) ความกระด้างของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ทำการศึกษาพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 698-994 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีรายงานว่าระดับความกระด้างที่มีค่าสูงถึง 940-1,060 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม ถ้าค่าปริมาณความเป็นด่างไม่สูงมาก คือมีค่า 58-89 มิลลิกรัมต่อลิตร (Bartlett and Enkerlin, 1983) ค่าแอมโมเนียรวมในทุกบ่ออยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้งคือมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชโล และ พรเลิศ, 2547) และความเข้มข้นของไนไตรท์ อยู่ในช่วง 0-0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เกินระดับที่เป็นพิษต่อกุ้งก้ามกรามที่มีรายงานว่า ความเข้มข้นของไนไตรท์ 1.8-6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีความเป็นพิษต่อกุ้งก้ามกรามคือทำให้การเจริญเติบโตลดลง และความเป็นพิษของแอมโมเนียมีความสัมพันธ์กับไนไตรท์ที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยเมื่อความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำเพิ่มขึ้นจะทำให้ความเป็นพิษของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นด้วย Boyd (1990)

ตารางที่ 13 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ที่ติดเชื้อจากจังหวัดเพชรบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

คุณสมบัติของน้ำ		บ่อP	บ่อP1	บ่อP2	บ่อP3	บ่อP4
		อายุ1-60 วัน	อายุ 61-120 วัน	อายุ 61-120 วัน	อายุ 121-180 วัน	อายุ 121-180 วัน
ออกซิเจนละลายในน้ำ (มก/ล)	เช้า	4.0-5.2	4.1-5.3	4.0-5.2	4.0-5.0	4.1-5.1
	บ่าย	7.1-10.7	7.2-10.8	7.1-9.8	7.2-9.3	7.1-9.1
พีเอช	เช้า	7.2-8.0	7.5-8.2	7.5-7.7	7.6-8.0	7.4-8.1
	บ่าย	7.8-8.2	7.4-8.5	8.0-8.4	8.0-8.6	7.9-8.4
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เช้า	28.5-32.8	28.0-31.8	29.7-31.9	29.4-32.2	29.5-31.8
	บ่าย	31.1-34.2	31.5-33.9	31.5-34.4	31.9-34.9	31.8-34.5
ความเป็นด่าง (มก/ล)		89.5-102.0	90.1-101.2	90.2-109.7	88.3-105.5	89.3-104.6
ความกระด้าง (มก/ล)		710-984	715-932	730-957	701-956	698-945
แอมโมเนียรวม (มก/ล)		0-0.58	0-0.75	0-0.77	0-0.9	0-0.9
ไนไตรท์ (มก/ล)		0-0.07	0-0.09	0-0.08	0-0.10	0-0.10

ตารางที่ 14 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ใช้แม่พันธุ์ปลอดเชื้อจากจังหวัดจันทบุรีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

คุณสมบัติของน้ำ		บ่อC	บ่อC1	บ่อC2	บ่อC3	บ่อC4
		อายุ1-60 วัน	อายุ 61-120 วัน	อายุ 61-120 วัน	อายุ 121-180 วัน	อายุ 121-180 วัน
ออกซิเจนละลายในน้ำ (มก/ล)	เช้า	4.0-5.1	4.1-5.2	4.1-5.2	4.0-5.1	4.1-5.2
	บ่าย	7.2-10.5	7.1-10.7	7.1-7.3	7.2-9.4	7.1-9.2
พีเอช	เช้า	7.0-8.1	7.4-8.3	7.5-7.8	7.7-8.1	7.3-8.2
	บ่าย	7.7-8.1	7.2-8.4	8.0-8.3	8.0-8.4	7.8-8.5
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เช้า	28.4-31.9	28.1-31.7	28.7-32.9	29.5-31.9	29.4-31.6
	บ่าย	31.2-35.2	31.8-34.0	30.8-34.1	31.7-34.8	31.2-35.5
ความเป็นด่าง (มก/ล)		90.5-101.0	91.2-110.2	90.2-110.7	89.2-104.5	89.1-102.6
ความกระด้าง (มก/ล)		740-994	714-940	720-960	711-961	715-965
แอมโมเนียรวม (มก/ล)		0-0.60	0-0.79	0-0.81	0-0.89	0-0.90
ไนไตรท์ (มก/ล)		0-0.06	0-0.08	0-0.09	0-0.10	0-0.10

สรุป

1. จากการศึกษาครั้งนี้พบไวรัสชนิดใหม่จำนวน 2 ชนิดในตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมที่พบในประเทศไทย ไวรัสชนิดแรกเรียกว่า baculo-like virus (BLV) มีลักษณะคล้ายกับไวรัสในกลุ่ม baculovirus โดยพบ inclusion bodies ขนาดใหญ่ ลักษณะเต็มเซลล์ติดสีแดงของ eosin แต่ไม่พบการเกิด occlusion bodies (OB) ผลการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM) พบอนุภาคของไวรัสมีลักษณะเป็นแท่ง (rod-shaped) มีผนังหุ้ม (enveloped) ขนาด 250-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70-75 นาโนเมตร สำหรับไวรัสชนิดที่สอง เรียกว่า hepatopancreatic parvo-like virus (HPLV) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับไวรัสในกลุ่ม hepatopancreatic parvo virus (HPV) โดยพบลักษณะ inclusion bodies ใน R-cell และ E-cell ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนติดสีแดงของ eosin การศึกษาทางพยาธิสภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) พบอนุภาคของไวรัสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-24 นาโนเมตร ไม่มีผนังหุ้ม (non-enveloped) การศึกษาความแตกต่างของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้กับไวรัสในกลุ่ม baculovirus และ hepatopancreatic parvovirus ซึ่งเคยมีรายงานพบในประเทศไทยโดยใช้วิธี PCR พบว่าไวรัส BLV และ HPLV มีความแตกต่างกับไวรัสที่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทย

2. จากการสำรวจการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในลูกกิ้งก่าและแม่พันธุ์กิ้งก่ามกราคมจากโรงเพาะฟักจำนวน 5 แห่ง ในพื้นที่ จังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และจันทบุรี พบการติดเชื้อไวรัส BLV ร่วมกับ HPLV ในตัวอย่างลูกกิ้งก่ามกราคมและแม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี ในขณะที่ตัวอย่างลูกกิ้งก่าและแม่พันธุ์กิ้งก่ามกราคมจากจังหวัดราชบุรีพบการติดเชื้อ HPLV เพียงชนิดเดียว สำหรับตัวอย่างลูกกิ้งก่าไม่พบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด

3. การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอดตายของลูกกิ้งก่ามกราคมจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV (อัตราการติดเชื้อ BLV 40 เปอร์เซ็นต์, HPLV 20 เปอร์เซ็นต์ และ BLV ร่วมกับ HPLV 10 เปอร์เซ็นต์) และแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัส หลังจากอนุบาลในโรงเพาะฟักนาน 25 วัน พบว่าลูกกิ้งก่ามกราคมจากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 63.0 ± 1.0 เปอร์เซ็นต์ และให้ลูกกิ้งก่าที่พบการติดเชื้อ BLV 20 เปอร์เซ็นต์ HPLV 50 เปอร์เซ็นต์ และติดเชื้อ BLV ร่วมกับ HPLV 10 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับอัตราการรอดตายของลูกกิ้งก่าจากแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัสซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 72.0 ± 2.0 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษาเปรียบเทียบ ปริมาณผลผลิตและอัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ BLV และ HPLV กับกลุ่มที่ปลอดเชื้อไวรัสพบว่า กุ้งในกลุ่มที่ปลอดเชื้อไวรัสมีปริมาณผลผลิตเท่ากับ 202.55 ± 0.78 กิโลกรัมต่อไร่ และมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 63.49 ± 0.35 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่มที่พบการติดเชื้อไวรัส BLV และ HPLV ซึ่งมีปริมาณผลผลิตเท่ากับ 198.25 ± 1.22 และมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 68.43 ± 0.76 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณการติดเชื้อ BLV และ HPLV ในตับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของกุ้งและปริมาณการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยง ซึ่งในช่วงท้ายของการเลี้ยงที่ 150 และ 180 วัน พบการติดเชื้อ HPLV เพียงชนิดเดียวเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพันธุกรรมของไวรัส BLV และ HPLV เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพต่อไป สำหรับการตรวจสอบ การติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้โดยวิธีการย้อมสีด้วยมาลาโคท์กรีนนั้นเป็นวิธีที่ทำได้อย่างรวดเร็วแต่ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการแยกความแตกต่างของ inclusion bodies ของไวรัสกับเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนของกิ้งได้

2. เนื่องจากในการศึกษานี้ศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกิ้งก้ำมGRAMของเอกชนซึ่งเลี้ยงเพื่อการพาณิชย์โดยเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาที่มีการย้ายบ่อ และคัด เฉพาะกิ้งที่แข็งแรงมีการเจริญเติบโตที่ดีไปเลี้ยงต่อ ส่วนกิ้งที่อ่อนแอและโตช้าจะถูกขายไปในแต่ละช่วงของการเลี้ยงส่งผลต่อการ วิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่าไวรัสทั้งสองชนิดไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและ อัตราการรอดตายของกิ้งก้ำมGRAMที่เลี้ยง ทั้งนี้ถ้าการศึกษาในบ่อเลี้ยงกิ้งก้ำมGRAMแบบดั้งเดิมไม่มีการย้ายบ่อ น่าจะให้ผลการวิจัยที่แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษญา พราหมณ์ชูเอม. 2535. อิทธิพลของแสง และอุณหภูมิต่อการกินอาหารและการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรมประมง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด . 2546. ระเบียบและการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามตามมาตรฐาน จี เอ พี พ.ศ. 2546. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- จารุวรรณ วิระวงษ์นุสร. 2525. พืชเลี้ยงปลานของแอมโมเนียที่มีต่อกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนระยะต่างๆกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จوزهดี พงศ์มณีรัตน์. 2542. โภชนาการอาหารกุ้งก้ามกราม หลักการผลิตและเลือกใช้อาหารสัตว์น้ำที่ดี. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมประมง.
- จิราพร เกษรจันทร์ สิทธิ บุญยรัตผลิน และ อุษณีย์ เจษฎาไกรสร. 2530. โรคดาวเรืองในลูกกุ้งก้ามกราม. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 67/ 2530. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- จักรพงษ์ นิละมนต์ 2549. ผลของไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) ในแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อคุณภาพลูกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลี้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000 สู่วัยยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- _____ และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ.2547. บริษัทเมจิก ฟาร์มลิเคชั่น จำกัด.

- ธรรมรักษ์ ละอองนวล. 2541. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะเกษตรและ
อุตสาหกรรม, สถาบันราชภัฏอุบลราชธานี.
- นวลจิรา พานทอง. 2548. การเปรียบเทียบการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบดั้งเดิมและแบบพัฒนา.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิติ ชูเชิด ชลอ ลี้มสุวรรณ ศุภมาศ ศรีวงศ์ทุก นิธิศ ภัทรกุลชัย T.W. Flegel และ K.
Yoganandhan. 2548. โรคไวรัสที่ทำให้ความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามใน
ประเทศไทย. เอกสารเผยแพร่สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง
- บรรจง เทียนส่งรัมย์. 2521. หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2523. ปัญหาการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วารสารการประมง 33(5): 563-569.
- พยุง ภัทรกุลชัย. 2546. นโยบายพัฒนาการเลี้ยงกุ้งคุณภาพเพื่อการบริโภคและการส่งออกในพื้นที่
น้ำจืด. น. 53-62 ใน สุรศักดิ์ ดิลกเกียรติ. กุ้งไทย ก้าวใหม่สู่หนึ่งในผู้นำกุ้งโลกอย่างยั่งยืน.
โรงพิมพ์ ก. พล, กรุงเทพฯ.
- ฝน ต้นสกุล. 2550. การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ
Atyidae โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และวิธีพีซีอาร์. วิทยานิพนธ์, มหาวิทยาลัยศรี
นครินทรวิโรฒ.
- ยนต์ มุสิก. 2529. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรวิทย์ ชีวาพร. 2531. คุณภาพน้ำ-ดินในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, น. 171-182. ใน การเพาะเลี้ยงกุ้ง
กุลาดำ. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

- วิรัช จิวแหยม. 2540. คุณภาพน้ำสำหรับเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการวิเคราะห์. ภาควิชาประมง
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ศุภกร พัฒนวิวัฒน์. 2549. การศึกษาสาเหตุการเจริญเติบโตช้าในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*).
วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภมาส ศรีวงศ์ฟู. 2549. ผลกระทบของการติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii*
Nodavirus และ *Extra Small Virus* ต่อการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium*
rosenbergii (de Man): อัตราการรอดตาย และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ
เนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สนธิพันธ์ ผาสุขดี. 2546. การพัฒนาการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทย. นานาสัตว์น้ำ ปีที่ 7 ฉบับที่
4.
- สมพงษ์ สุวรรณทศ. 2546. กลวิธีการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. เอกสาร
แนะนำ กรมประมง.
- สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 2548. การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. แหล่งที่มา:
<http://www.fisheries.go.th/if-suratthani/1goonggamgram.htm>, 26 กรกฎาคม 2551.
- โสภณ อารีรัตน์ และ สมเกียรติ์ กาญจนาคาร. 2531. ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคในกุ้ง
ก้ามกรามกับคุณสมบัติของน้ำในบ่ออนุบาล. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 77/2531. สถาบัน
ประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 12 น.
- วรินชา วศิณะเมฆินทร์. 2548. การศึกษาการติดเชื้อ *Monodon Baculovirus Hepatopancreatic*
Parovirus และพยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*).
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนุตรา อัครจามร. 2534. การศึกษาทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*).
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุมาภรณ์ จรดล. 2548. ผลของการติดเชื้อ **Monodon Baculovirus (MBV)** และเชื้อ **Hepatopancreatic Parvovirus (HPV)** ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adhikari, S., V. S. Chaurasia, A. A. Naqvi and B. R. Pillai. 2007. Survival and Growth of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) juvenile in relation to calcium hardness and bicarbonate alkalinity. **Turk. J. Fish. and Aquat. Sci.** 7: 23-26.

Alderman, D.J. 1988. Fisheries chemotherapy: a review, pp. 1 -62. In J.F. Muir and R.J. Roberts, eds. **Recent Advances in Aquaculture**, Vol. 3. University Press, Cambridge.

Anderson, I.G., A.T. Law, M. Shariff and G. Nash. 1990. A parvo -like virus in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, **J. Invertebr. Pathol.** 55: 447-449.

_____ M.N. Shamsudin and G. Nash. 1989. A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. **Aquaculture** 81: 213-223.

_____ M. Shariff, G. Nash and M.B. Nash. 1978. Mortalities of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus, and rickettsial and bacterial infectious, from Malaysian brackishwater ponds. **Asian Fish. Sci.** 1: 47-64.

APHA., AWWA. and WPCP. 1995. **Standard Method for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. United Book Press, Maryland.

Aquacop. 1977. Observations on diseases of crustacean cultures in Polynesia, pp. 685 -703. In J.W. Avault, ed. **Proceedings of the 8th Annual Meeting of the World Mariculture Society, 9-13 January 1977, San José, Costa Rica**. Louisiana State University, Baton Rouge.

- Aquaculture. 1999. **Water Quality in Freshwater Aquaculture Ponds**. Primary Industries and Resources SA.
- Arcier, J.M., F. Herman, D.V. Lightner, R.M. Redman, J. Mari and J.R. Bonami. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 38: 177-181.
- Armstrong, D.A., D.V. Buchanan and R. S. Caldwell. 1976. A mycosis caused by *Lagenidium* sp. in laboratory reared larvae of the Dungeness crab, *Cancer magister*, and possible chemical treatments. **J. Invertebr. Pathol.** 28: 329-336.
- Bartlett, P. and E. Enkerlin. 1983. Growth of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* in asbestos asphalt ponds in hard water and on a low protein diet. **Aquaculture** 30: 353-356.
- Belcher, C.R. and P.R. Young. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. **J. Virol. Meth.** 74: 21-29.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Bonami, J.R., M. Brehelin, J. Mari, B. Trumper, D.V. Lightner. 1990. Purification and characterization of IHNV of penaeid shrimps. **J. Gen. Virol.** 71: 2657-2664.
- Bonami, J.R., Z Shi, D. Qian and J. Sri Widada. 2005. White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. **J. Fish Dis.** 28: 23-31.
- Boyd, C.E. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming**. Fisheries and Allied Aquaculture Department Series No.2, Alabama Agricultural Experiment Station University, Alabama.

- Boyd, C.E. 1990. **Water Quality in Ponds for Aquaculture** . Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Auburn, Alabama.
- _____ 1992. Shrimp pond bottom, soil and sediment management, pp 166-181. **In Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming**. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana, USA.
- _____ and C.S. Tucker. 1998. **Pond Aquaculture Water Quality Management** . Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.
- _____ and S. Zimmermann. 2000. Grow-out systems – water quality and soil management, pp. 221-238. **In M.B. New & W.C. Valenti, eds. Freshwater Prawn Culture: the Farming of *Macrobrachium rosenbergii***,. Oxford, England, Blackwell Science.
- Brock, J.A., L.K. Ankagawa and R.J. Shimojo. 1986. Infection of a cultured freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Man (Crustacea: Decapoda), by *Mycobacterium* spp., Runyon Group II. **J. Fish Dis.** 9: 319-324.
- _____ 1993. A synopsis of pathology, diseases, and production problems of cultured *Macrobrachium*, with an emphasis on experiences in Hawaiian prawn farming, pp. 361-391. **In J.P. McVey, ed. CRC Handbook of Mariculture, 2nd edn, Vol. 1: Crustacean Aquaculture** . CRC Press, Boca Raton.
- Bird C. 1993. **Hatchery culture of *Macrobrachium rosenbergii* (cherabin)**. แหล่งที่มา: <http://www.fish.wa.gov.au/docs/aq/aq017/index.php?0404> , 10 เมษายน 2552.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** . 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

- Bueno, S.L. de S. and J.C. Gastelú. 1998. Doenças em camarões de água doce, pp. 309 -39. *In* W.C. Valenti, ed. **Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia para a Produção de Camarões**. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo and Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Brasília.
- Burns, C.D., M.E. Berrigan and G.E. Henderson. 1979. *Fusarium sp.* infection in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Aquaculture** 16: 193-198.
- Camacho, L. and M. Chinchilla. 1989. Ciliados epibiontes em *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) cultivados em Limón, Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.** 37: 105-106.
- Chan, J.C. 1979. Abrasion and bacterial infection as the probable cause of exoskeletal lesions in the Hawaiian freshwater shrimp, *Atya bisulcata*, p. 108. *In* D.H. Lewis and J.K. Leong, comps. **Proceedings of the 2nd Biennial Crustacean Health Workshop, 20-22 April 1977, Galveston, Texas**. Texas A and M University Sea Grant Publication TAMU-SG-79-114. Texas A and M University, College Station, TX.
- Chang, P.S., H.C. Chen and Y.C. Wang. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. **Aquaculture** 164: 233-242.
- Chen, S.N. 1995. Current status of shrimp aquaculture in Taiwan, pp. 29 -34. *In* C.L. Browdy and J.S. Hopkins, eds. **Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Paper presented at Aquaculture'95, 1-4 February 1995, San Diego**. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Chen, S.N. and G.H. Kuo. 1989. Infection of cultured cells from the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodon - type baculovirus (MBV). **Aquaculture** 12: 73-76.

- Cheng, W. and J.-Chu Chen. 1998. Enterococcus-like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity. **Dis. Aquat. Org.** 34:103-108
- Chen S.C., T.H. Chen, P.C. Wang, Y.C. Chen, J.P. Huang, Y.D. Lin H.C. Chaung and L.L. Liaw 2003. *Metschnikowia bicuspidata* and *Enterococcus faecium* co-infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 55: 161–167.
- Chia, Y.H., P.C. Chuang, L.C. Chen, C. TU, M.S. Chien, K.C. Huang, H.F. Kao, K.C. Tung, S.S. Tsai. 2006. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 258: 73-79.
- Chien, C.Y. 1976. Preliminary survey on the saprolegniaceous fungi parasites of fresh water shrimps (crustaceans) in Taiwan. **Proceedings of the National Science Council** 9: 39-47.
- Colomi, A. 1985. A study of the bacterial flora of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia salina* nauplii. **Aquaculture** 49: 1-10.
- Colt, J. and D. Armstrong. 1979. **Nitrogen Toxicity of Fish, Crustaceans and Molluscs**. Dept. Civil Eng., Univ. California, Davis.
- _____. R. Ludwig, G. Tchobanoglous, and J. Cech. 1981. The effects of nitrite on The short-term growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture** 24: 111-122.
- Daniels, W.H., L.R. D'Abramo and L.D. Parseval. 1992. Design and management of a closed, recirculating "clearwater" hatchery system for freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879. **J. Shellfish Res.** 11: 65-73.

- Da Silva, A.N., J.N. Canuto e Silva, D. Cohen and G. Issar. 1989. A new rickettsial disease in *Macrobrachium rosenbergii* larvae: gross signs, cause, diagnosis and treatment, p p. 317-337. In M.M.R. Martins, E.S. Correia and J.M. Cavalheiro, eds. **Anais do III Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão, 15 -20 outubro 1989, João Pessoa, Vol. 2: Camarão de Água Doce e Outros** . MCR Aquaculture, João Pessoa.
- Delves-Broughton, J. and C.W. Poupard. 1976. Disease problems of prawns in recirculation systems in the UK. **Aquaculture** 7: 201-217.
- El-Gamal, A.A., D.J. Alderman, C.J. Rodgers, J.L. Polglase and D. Macintosh. 1986. A scanning electron microscope study of oxolinic acid treatment of burn spot lesions of *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 52: 157-171.
- FAO. 2002. **Farming Freshwater Prawns. A Manual for the Culture of the Giant River Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)**. FAO Fisheries technical paper 428.
- Fegan, D.F., T.W. Flegel, S. Sriurairatanaand and M. Waiyakrukruha. 1991. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in southern Thailand. **Aquaculture** 96 : 205 - 217.
- Flegel, T.W. 2003. Shrimp Viral Disease I. In **International Training Course Biology and Pathology of Black Tiger Shrimp**. SCBT 608 Current Topic in Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University.
- _____ 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture** 258: 1-33.
- _____ V. Thamavit, T. Pasharawipas and V. Alday -Sanz. 1999. Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 174 : 197 - 206.

- Flegel, T.W., L. Niesen, V. Thamavit, S. Kongtim and T. Pasharavwipas. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. **Aquaculture** 240: 55-68.
- Fromm, P.O. and J.K. Gillette. 1968. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.** 26: 887-896.
- Fujimura, T. 1966. Notes on the development of a practical mass culturing technique of the giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Proceeding of the Indo-Pacific Fisheries Council** 12 : 2-17.
- Gomes, N.A., P.A. Coelho and H.P. Upadhyay. 1988. Presença de fungos em cultivos de larvas de camarão (*Macrobrachium rosenbergii* De Man), pp. 285-289. **In Anais do V Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 26 -31 Julho 1987, Fortaleza, .** Associação dos Engenheiros de Pesca do Estado do Ceará, Fortaleza.
- Halling-Sørensen, B. and S.E. Jørgensen. 1993. **The Removal of Nitrogen Compounds from Wastewater.** Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Hien, T.T.T., T.H. Minh, N.T. Phuong and M.N. Wilder. 1998. Current status of freshwater prawn culture in the Mekong river delta of Vietnam. **JIRCAS Journal** 6: 89-100.
- Hipólito, M., L. Baldassi, D.C. Pires and J.V. Lombardi. 1996. Prevalência bacteriana em necrose de camarão de aqua doce (*Macrobrachium rosenbergii*, Decapoda, Palaemonidae). **Bol. Inst. Pesca.** 23: 13-20.
- Hsu, J.P. and C.I. Liu. 1994. Studies on yeast infection in cultured giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Fish Dis. Res.** 15: 55-68.

- Huger, A.M. and Krieg A. 1991. Baculoviridae, nonoccluded baculoviruses, pp. 287–319. *In* J.R. Adams and J.R. Bonami (ed.). **Atlas of Invertebrate Viruses**. CRC Press, Boca Raton.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee, K. Söderhall. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology** 211: 213–236.
- Johnson, P.T. 1983. Diseases caused by viruses, rickettsiae, bacteria and fungi, pp. 1-78. *In* A.J. Provenzona, Jr. (ed.). **The Biology of Crustacea**. Vol.6. Academic Press, New York.
- _____ and D.V. Lightner. 1988. Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infection species. **Dis. Aquat. Org.** 5: 123-141.
- Kiran, R.B.P., K.V. Rajendran, S.J. Jung and M.J. Oh. 2002. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). **J. Fish Dis.** 25: 201–207.
- Kuris, A.M., Z. Ráanan, A. Sagi and D. Cohen. 1987. Morphometric differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Crustac. Biolo.** 7: 219-237.
- Lacroix, D., J. Glude, J.E. Thomas and H. Le Menn. 1994. From research to commercialization: Lessons from four different strategies in the development of freshwater prawn culture (*Macrobrachium rosenbergii*) in America since 1977. **World Aquaculture** 25: 5-17.
- Lalitha, K.V. and P.K. Surendran. 2004. Bacterial microflora associated with farmed freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and the aquaculture environment. **Aquac. Res.** 35: 629-635.

- Lawson, T.B. 1995. **Fundamentals of Aquaculture Engineering** . Chapman and Hall, New York.
- Le Bitoux, J.F. 1988. Bacterial necrosis of *Macrobrachium* larvae, pp. 64-69. *In* C. Sindermann and D. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier, Amsterdam.
- Lee, D.O'C. and J.F. Wickins. 1992. **Crustacean Farming**. Blackwell Science, Oxford. 392 p.
- Liao, P.B. and R.D. Mayo. 1972. Salmonid hatchery water re-use system. **Aquaculture** 1: 317-335.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp, 2 edn. CRC Press, CRC Press .
- _____ 1988 a. Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) disease of penaeid shrimp, pp. 30 -32. *In* C. Sindermann and D. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture** . Elsevier, Amsterdam.
- _____ 1988 b. Larval mycosis of penaeid shrimp, pp. 58 -63. *In* C. Sindermann and D. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier, Amsterdam.
- _____ 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Panaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- _____ and R. Redman. 1977. Histochemical demonstration of melanin in cellular inflammatory process of penaeid shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** 30: 298-302.
- _____ and R.M. Redman. 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp . **J. Invertebr. Pathol** . 45: 47-53.

- Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture** 164: 201- 220.
- _____ R.M. Redman and T.A. Bell. 1983. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture** 32: 209-233.
- _____ R.M. Redman, K.W. Hasson and C.R. Pantoja. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. **Dis. Aquat. Org.** 21: 53-59.
- _____ T.A. Bell and R.M. Redman. 1990. A review of the known hosts, geographical range and current diagnostic procedures for the virus diseases of cultured penaeid shrimp . **Actes de Colloque** 9: 113-126
- Lin, C.K. and C. Lee. 1992. Integration of crustacean aquaculture with coastal rice farming in Vietnam. **Naga, The ICLARM Quarterly** 15: 24-26.
- Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Su, Y.L. Chiu, C.F. Chang, F.K. Liu, M.S. Su, C.H. Wang and G.H. Kou. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captive shrimp, crabs and other arthropods. **Dis. Aquat. Org.** 27: 215-225.
- Mallasen, M., and W. C. Valenti. 2005. Larval development of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* at different ammonia concentrations and pH values. **J. World Aquac. Soc.** 36: 32-41.
- Manush, S.M., A.K. Pal, N. Chatterjee, T. Das and S.C. Mukherjee . 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Macrobrachium rosenbergii* acclimated to three temperatures. **J. Therm. Biol.** 29: 15–19.

Moraes-Riodades, P.M.C. 1999. **Cultivo de camarões do gênero *Macrobrachium* (bate, 1868)**

no Estado do Pará (Crustacea, Palaemonidae). Monografia de Especialização, Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém.

_____ and W.C. Valenti. 1999. Carcinicultura de água doce como promoya de desenvolvimento sustentável na Amazônia, p. 160. *In* **Resumos do X Encontro de Biólogos do CRB-1, 28 March-1 April 1999, São Carlos**. Conselho Regional de Biologia-1 (CRB), São Paulo.

Nakamura, R. 1975. A preliminary report on the locomotor activity of *Macrobrachium rosenbergii* and its possible application to prawn culture. **Proc. World Maric. Soc.** pp. 37-41.

Nash, G. 1989. Trematode metacercarial infection of cultured giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Invertebr. Pathol.** 53: 124-127.

_____A. Poermono and M.B. Nash. 1988. Baculovirus infection in brackish water pond cultured *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia. **Aquaculture.** 75: 1-27.

_____S. Chinabut and C. Limsuwan. 1987. Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, cultured in Thailand. **J. Fish Dis.** 10: 109-120.

_____B. Withyachumnarnkul, A. Boonnat and T. Laoprasert. 2003. Histopathology of some recent disease problems, including possible new viruses, in cultured *Macrobrachium rosenbergii* de Man. **The AAHRI Newsletter.** 12: 3-5.

Naqvi, A. A., S. Adhikari, B. R. Pillai, and N. Sarangi. 2007. Effect of ammonia-N on growth and feeding of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* (De-Man). **Aquaculture Research.** 38: 847-851.

- New, M. B. 1988a. **Freshwater Prawns : Status of Global Aquaculture, 1987** . Network of Aquaculture Centres in Asia, Bangkok, Thailand.
- _____ 1998b. The farm of *Macrobrachium rosenbergii* with special reference to South East Asia in aquaculture research and sustainable development in inland and coastal regions in South-East Asia, pp. 127-144. *In* M. Beveridge, R. Fuchs, J. Furberg, N.Kantsky, A. Reilly and P. Sorgeloos, eds. **International Foundation for Science** . Stockholm.
- _____ 1990. Freshwater prawn culture: a review. **Aquaculture** 88:99-143.
- _____ 1995. Status of freshwater prawn farming: a review. **Aquaculture Research** . 26: 1-54.
- _____ 2000. Commercial freshwater prawn farming around the world pp. 290-325. *In* M.B. New and W.C. Valenti, eds. **Freshwater Prawn Culture: the Farming of *Macrobrachium rosenbergii***. Oxford, England, Blackwell Science.
- _____ and S. Singholka. 1985. Freshwater prawn farming: a manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. **FAO Fisheries Technical Paper** No. 225. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Niu, C., D. Lee, S. Goshima, and S. Nakao. 2003. Effects of temperature on food consumption, growth and oxygen consumption of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man 1879) postlarvae. **Aquac. Res.** 34: 501-506.
- Nunan, L.M., B.T. Poulos and D.V. Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture** 160: 19-30.
- Peebles, J.B. 1979. The roles of prior residence and relative size in competition for shelter by the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, **Fish Bulletin**. 76: 173-180.

- Peng, S.E., C.F. Lo, C.H. Ho, C.F. Chang and G.H. Kou. 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. **Aquaculture** 164: 253-262.
- Pillai, D., C.M. Nair, K.R. Salin, A. Marques, J.S. Widada and J.R. Bonami. 2005. Gross signs and histopathology of brachiostegal blister disease (balloon disease) : an idiopathic disease of farmed *Macrobrachium rosenbergii* (De man). **J. Fish Dis.** 28: 473-478.
- _____ and S. Singholka. 1985. Freshwater prawn farming: a manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. **FAO Fisheries Technical Paper** No. 225. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- _____ J.R. Bonami, and J.S. Widada . 2006. Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and Extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De man), by loop-mediated isothermal amplification. **J. Fish Dis.** 29: 275-283.
- Phromjai, J., V. Boonsaeng, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 2002. Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. **Dis. Aquat. Org.** 51: 227-232.
- Qian, D., Z. Shi, S. Zhang, Z. Cao, W. Liu, L. Li, Y.xie, I. Cambournac and J.R. Bonami. 2003. Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 521-527.
- Rajendran, K.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago and R.M. Krol. 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawn, crabs and lobsters from India. **J. Fish Dis.** 22: 183-191.

- Ramalingam, K. and Ramarani S. 2007. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*--histopathological and electron microscopic study. **J. Environ. Biol.** 28(3): 627-35.
- Romestand, B. and J.R. Bonami. 2003. A sandwich enzyme -linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 71-75.
- Roubal, F.R., J.L. Paynter and R.J.G. Lester. 1989. Electron microscopic observation of hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) in the penaeid prawn, *Penaeus merguensis* De Man, from Australia. **J. Fish Dis.** 12: 199-201.
- Sagi, A., Z. Ra'anan, D. Cohen and Y. Wax. 1986. Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex populations: yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages. **Aquaculture** 51: 265-275.
- Sahul Hameed, A.S., K. Yokanandhan, J. Sri Widada and J.R. Bonami. 2004. Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus like-particles (XSV) associated with white tail disease (WTD) of *Macrobrachium rosenbergii* in India by. **Aquaculture** 238: 127-133.
- _____ M.X. Charles and M. Anilkumas. 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. **Aquaculture** 183: 207-213.
- Salin, K.R. and Nair C.M. 2003. Emerging diseases of giant freshwater prawn in India: a potential threat to sustainability. p. 57. **In Book of Abstracts, Freshwater Prawns 2003, International Symposium on Freshwater Prawn** , 20-30 August; 2003, Kochi, India, Kerala Agriculture University, Thrissur, India.

- Sandifer, P.A., J.A. Hopkins and T.I.J. Smith. 1975. Observation on salinity tolerance and osmoregulation in laboratory reared of *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae (Crustacea : Caridea). **Aquaculture** 6: 103-114.
- Sano, T. and H. Fukuda. 1987. Principal microbial diseases of mariculture in Japan. **Aquaculture** 67: 59-69.
- Schreck, C.B., and P.B. Moyle. 1990. **Methods for Fish Biology**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Schroeder, G.L. 1983. Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by delta-C analysis. **Aquaculture** 35:29-42.
- Sebastian, C.D. (Ed.), 1996. **A Manual on Seed Production and Farming of Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii***. The Marine Products Export Development Authority, Ministry of Commerce, Govt. of India, Cochin.
- Sebastian, C.D., G. Mathew and K.C. George. 1992. Intensive farming of freshwater prawn in Kerala-a preliminary study. pp. 206-209. In E.G. Silas, ed. **Freshwater Prawns. Proceedings of the National Symposium on Freshwater Prawns (*Macrobrachium* spp.)**, 12-14 December 1990, Kochi. Kerala Agricultural University, Thrissur.
- Shang, U.C. and T. Fujimura. 1977. The production economics of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) farming in Hawaii. **Aquaculture** 11: 99-110.
- Shike, H., A. Dhar, J. Burns, C. Shimizu, F. Jousset, K. Klimpe and M. Bergoin. 2000. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses. **Virology** 276: 167-177.

Sindermann, C.L. and D.V. Lightner (eds). 1988. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier Science, New York.

Smith, T.I.J., P.A. Sandifer and J.J. Manzi. 1979. Epibionts of pond-reared adult Malaysian prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), in South Carolina. **Aquaculture** 16: 299-308.

Sri Widada, J., S. Durand, I. Cambournac, D. Qian, Z. Shi, E. Dejonghe, V. Richard and J.R. Bonami. 2003. Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. **J. Fish Dis.** 26: 583-590.

_____. V. Richard, I. Cambournac, Z. Shi, D. Qian and J.R. Bonami. 2004. Dot-blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 58: 83-87.

Sudhakaran, R., S. Syed Musthaq, P. Haribabu, S.C. Mukheerjee, C. Gopal, A.S. Sahul Hameed. 2006a. Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *P. japonicus* and *P. monodon*). **Aquaculture** 257: 136-141.

_____. K. Yoganandhan, V.P. Ahmed, A.S. Sahul Hameed. 2006b. Artemia as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. **Dis. Aquat. Org.** 70 (1-2): 161-166.

Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnankul and T.W. Flegel. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. **Dis. Aquat. Org.** 38: 1-10

- Sung, H.H., H.J. Chang, C.H. Her, J.C. Chang and Y.L. Song. 1998. Phenoloxidase activity of haemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Invertebr. Pathol.** 71: 26-33.
- _____ S.F. Hwang and F.M. Tasi. 2000. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. **J. Invertebr. Pathol.** 76: 278–284.
- Tonguthai, K. 1992. Diseases of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand, pp. 89-95. In I.M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur, eds. **Diseases in Asian Aquaculture**. Asian Fisheries Society, Manila.
- _____ 1997. Diseases of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **AAHRI Newsletter** 4: 1-4. Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Bangkok.
- Train, R.E. 1979. **Quality Criteria for Water**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Truscott, R. and K.N. White. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. **Funct. Ecol.** 4: 455–461.
- Tung, C.W., C.S. Wang. And S.N. Chen. 1999. Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium rosenbergii* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), culture in Taiwan. **J. Fish Dis.** 22: 319-323.
- Valenti, W.C. 1996. **Criação de Camarões em Águas Interiores. Boletim Técnico do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP) 2**. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária (FUNEP), São Paulo.

- Valenti, W.C. 1998. Sistemas de produção na fase de crescimento final, pp. 165 -177. *In* W.C. Valenti, ed. **Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia para a Produção de Camnarões**. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo and Naturais Renováveis (IBAMA). Brasília.
- Vijayen, K.K., V. Stalin Raj, S.V. Alavandi, V. Thal lai Sekhar and T.C. Santiago. 2005. Incidence of white muscle disease, a viral like disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De man) from south-east coast of India. **Aquac. Res.** 36: 311-316.
- Vogt, G. 1992. Transformation of anterior midgut and hepatopancreas cells by monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae. **Aquaculture** 107: 239 - 248.
- Wang, G. and S. Qianhong. 1999. Culture of freshwater prawns in China. **Aquaculture Asia IV** : 14-17.
- Wang, P.C., Y.D. Lin, L.L. Liaw , R.S. Chern and S.C. Chen . 2008. *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* also causes white muscle disease in farmed giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 79(1): 9-17.
- Wang, Y.C., C.F. Lo, P.S. Chang and G.H. Kou. 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. **Aquaculture** 164: 221-231.
- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamorn, V. Boonsang, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1995. A non - occluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 21: 77-96.

Yoganandhan, K., J. Sri Widada, J.R. Bonami and A.S. Sahul Hameed. 2005. Simultaneous detection of *Macrobrachim rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. **J. Fish Dis.** 28: 65-69.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

น้ำหนักและความยาวของแม่พันธุ์กึ่งกำกรามจากจังหวัดเพชรบุรี และจากจังหวัดจันทบุรี

ตารางผนวกที่ ก1 แสดงน้ำหนักและความยาวของแม่พันธุ์กึ่งกำกรมจากจากจังหวัดเพชรบุรี

แม่พันธุ์จากจังหวัด เพชรบุรี	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)
1	18	11.3
2	19	12.5
3	25	13.3
4	31	14.0
5	19	12.3
6	23	12.5
7	18.5	12.0
8	24	12.8
9	19.5	13.0
10	25	13.4
11	24.5	13.0
12	22	12.0
13	19.5	12.8
14	18	11.2
15	30	13.6
16	19.5	12.7
17	20	13.4
18	19	12.6
19	18	11.3
20	21	11.8

ตารางผนวกที่ ก2 แสดงน้ำหนักและความยาวของแม่พันธุ์กึ่งกำกรามจากจากจังหวัดจันทบุรี

แม่พันธุ์จากจังหวัด จันทบุรี	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)
1	30	13.9
2	32	14.0
3	26	14.5
4	32	14.0
5	32	14.0
6	27	14.8
7	32	14.1
8	29	13.4
9	30	13.8
10	26	14.4
11	31	13.9
12	30	14.0
13	29	13.0
14	28	13.5
15	27	14.7
16	32	14.2
17	32	14.1
18	26	14.2
19	30	13.7
20	32	14.2

ภาคผนวก ข

อัตราการรอดตายของกึ่งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรีและแม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรี

ตารางผนวกที่ ข1 อัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามจากชุดที่ 1 แม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรี

บ่อที่	อัตราปล่อย (ตัว/ลูกบาศก์เมตร)	ความหนาแน่น (ตัว/ถัง)	อัตราการรอด (%)	จำนวนกุ้งที่รอด (ตัว/ถัง)
1	100,000	250,000	63	157,500
2	100,000	250,000	64	160,000
3	100,000	250,000	62	155,000

ตารางผนวกที่ ข2 อัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามจากชุดที่ 2 แม่พันธุ์จากจังหวัดจันทบุรี

บ่อที่	อัตราปล่อย (ตัว/ลูกบาศก์เมตร)	ความหนาแน่น (ตัว/ถัง)	อัตราการรอด (%)	จำนวนกุ้งที่รอด (ตัว/ถัง)
1	100,000	250,000	72	180,000
2	100,000	250,000	70	175,000
3	100,000	250,000	74	185,000

ภาคผนวก ก

คุณสมบัติของน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จากจังหวัดเพชรบุรีและแม่พันธุ์จาก
จังหวัดจันทบุรี

ตารางผนวกที่ ๑1 คุณสมบัติของน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์จากจังหวัดที่ติดเชื้อ BLV และ HPLV

วันที่	บ่อ	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ออกซิเจนละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การนำไฟฟ้า ($\mu\text{mhos/cm}$)	ความเค็ม (พีพีที)	ความกระด้าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ความเป็น ต่างรวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ไนโตรที่ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
1	1	8.20	29	7.2	21.25	12.8	2,464.02	122.34	0	0
	2	8.13	29.5	6.9	20.45	13.9	2,879.51	134.15	0	0
	3	8.15	29	7	22.12	13.4	2,881.20	136.18	0	0.0012
3	1	8.11	30	7.5	22.29	13.5	289.53	148.8	0	0.0125
	2	8.21	31	8.0	24.35	15.1	2,860.12	136.12	0	0.0013
	3	8.16	32	7.4	24.66	15.0	2,990.60	139.73	0	0.0012
7	1	8.12	30.5	7.52	24.48	15.2	2,860.20	113.33	0.0105	0.0124
	2	8.22	30	6.95	23.28	13.9	2,881.20	132.53	0.0098	0.0123
	3	8.18	29.5	6.49	20.74	12.5	2,420.33	110.39	0.0099	0.01
11	1	8	30	8.03	21.15	12.8	2,560.33	132.93	0.0094	0
	2	7.94	30.5	7.79	20.59	13.6	3,061.47	132.16	0.0096	0
	3	7.88	31	6.89	22.27	13.2	2,872.13	139.53	0.0094	0.001
15	1	8	28.5	7.2	22.37	13.5	2,773.27	126.19	0.0559	0.0099
	2	8.15	29	6.2	24.45	15.2	2,870.20	135.73	0.0569	0.001
	3	8	29	7.02	24.95	15.2	2,926.00	132.54	0.048	0.001

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

วันที่	บ่อ	พีเอช	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ออกซิเจนละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การนำไฟฟ้า ($\mu\text{mhos/cm}$)	ความเค็ม (พีพีที)	ความกระด้าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ความเป็นต่าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ไนโตรที่ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
20	1	7.98	29.5	7.24	24.34	14.8	2,831.20	126.61	0.0765	0.001
	2	7.5	29	7.01	22.75	13.7	2,572.13	128.62	0.0765	0.0114
	3	7.68	30	6.58	20.52	12.2	2,285.13	132.27	0.0731	0.009
25	1	7.59	30	8.62	21.33	12.8	2,662.21	115.73	0.0593	0
	2	7.84	31.5	8.64	20.63	13.7	2,680.30	112.86	0.0318	0
	3	7.81	30	8.02	22.34	13.5	2,648.40	132.04	0.0456	0.001

ตารางผนวกที่ ค2 คุณสมบัติของน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามจากแม่พันธุ์ปลอดเชื้อ

วันที่	บ่อ	พีเอช	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ออกซิเจนละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การนำไฟฟ้า ($\mu\text{mhos/cm}$)	ความเค็ม (พีพีที)	ความกระด้าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ความเป็นด่าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ไนโตรที่ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
1	1	8.3	30	8.0	21.5	12.6	2,659.05	132.47	0	0
	2	8.2	29.5	8.6	21.5	13.5	2,820.00	128.12	0	0
	3	8	29	8.1	22.0	13.5	2,418.32	151.27	0	0.0167
3	1	8.13	31.5	8.01	21.75	13.0	2,774.00	134.53	0	0.0084
	2	8.1	31	6.5	24.5	15.1	2,889.40	130.6	0	0.004
	3	8.2	32	8.05	24.14	15.6	2,879.53	130.2	0	0.005
7	1	8.15	30.5	7.04	24.2	14.8	2,870.53	125.06	0.0100	0.0171
	2	8.22	30	7.6	19.46	11.3	2,418.53	129.07	0.0096	0.0113
	3	8.24	30	6.4	17.8	10.4	2,159.87	122.13	0.0099	0.0093
11	1	8.11	31	7.12	21.2	12.5	2,740.00	124	0.0093	0
	2	8.1	31	7.0	20.5	13.3	2,876.12	124.08	0.0095	0
	3	7.9	30.5	7.8	21.59	13.4	2,490.27	140.07	0.0094	0.0118
15	1	8	28.5	8.1	22.4	13.7	2,978.13	145.67	0.0259	0.0102
	2	8.15	30	7.5	23.24	15.1	3,002.01	130.4	0.0348	0.004
	3	8.14	29.5	6.8	24.98	15.3	3,042.60	131.6	0.0489	0.005

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

วันที่	บ่อ	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ออกซิเจนละลายใน น้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	การนำไฟฟ้า ($\mu\text{mhos/cm}$)	ความเค็ม (พีพีที)	ความกระด้าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ความเป็นต่าง รวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ไนโตรที่ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
20	1	7.88	29	7.3	25.4	15.3	3,030.40	137	0.0665	0.0182
	2	7.97	29	6.8	19.4	11.3	2,490.27	138.87	0.0787	0.0114
	3	7.95	29.5	6.75	17.5	10.9	2,171.47	137	0.0691	0.0087
25	1	7.89	30	6.45	21.15	12.7	2,680.32	135	0.0593	0
	2	8	31	7.12	20.65	13.9	2,780.15	136.33	0.0418	0
	3	8.12	30	7.44	22.45	13.4	2,482.27	137.87	0.0456	0.0063

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ
และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

1. วิธีการ fixed ตัวอย่าง

นำตัวอย่างกึ่งกัมกรามที่ป่วย fixed ในน้ำยา Davidson's fixative โดยให้น้ำยามีปริมาตรประมาณ 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการ fixed จะขึ้นอยู่กับขนาดของกึ่ง ดังนี้คือ

1.1 กึ่งระยะ โปสลาเร็ว แชล่งไปในน้ำยา fixed ทั้งตัว

1.2 กึ่งขนาดน้อยกว่า 2 กรัม จะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อนด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.45x31 M/M และฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณท้องด้วย แล้วจึงแช่ลงในน้ำยา fixed ทั้งตัว

1.3 กึ่งขนาด 2-12 กรัม จะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อน และฉีดเข้ากล้ามเนื้อท้อง บริเวณปล้องที่ 1 และปล้องที่ 5 ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.65x33 M/M และในกึ่งที่มีขนาดใหญ่เกินกว่า 12 กรัม ควรตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ตัดบริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับส่วนท้อง และส่วนท้อง ระหว่างปล้องที่ 3 กับ 4 ก่อนแช่ลงในน้ำยา fixed

ปริมาตรน้ำยาที่ฉีดเข้าตัวอย่างประมาณ 0.1-10 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับขนาดของกึ่ง จากนั้นนำตัวอย่างกึ่งดังกล่าวมาแช่ในน้ำยา Davidson's fixative ประมาณ 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเก็บไว้ในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเตรียมตัวอย่างขั้นต่อไป

2. การเตรียมสารเคมีเพื่อการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.1 Davidson's fixative (Bell and Lightner, 1988)

95% ethyl alcohol	330.0	ml
100% formalin (formaldehyde 37 -39%)	220.0	ml
50% HCl (V/V)	115.0	ml
น้ำกลั่น	335.0	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.2 Hematoxylin และ Eosin (H&E)

2.2.1 การเตรียม Mayer's hemaoxylin

hemaoxylin crystals	1.0	g
sodium iodate	0.8	g
potassium or ammonium alum	200.0	g
citric acid	1.0	g
chloral hydrate	200.0	g
น้ำกลั่น	2,000.0	ml

ละลาย alum ในน้ำกลั่น แล้วเติม hemaoxylin ลงไป คนให้ละลาย จึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ได้สีแดงอมม่วง (red-dish violet) ควรทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

2.2.2 การเตรียม Eosin

eosin Y, CI 45380	0.9	g
35% ethyl alcohol	300.0	ml
glacial acetic acid	1.5	ml

ผสมเข้าด้วยกัน แล้วเติม glacial acetic acid 2-3 หยดก่อนใช้

3. วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

3.1 การเตรียมชิ้นเนื้อในกึ่งขนาดเล็กจะใช้กึ่งทั้งตัว ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ส่วนในกึ่งขนาดใหญ่จะตัดเฉพาะส่วนที่ต้องศึกษา ได้แก่ อวัยวะในระบบห่อหุ้มร่างกาย ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

3.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) ดังนี้คือ

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	50% propanol	30-60
2	70%propanol	30-60
3	95% propanol I	30-60
4	95% propanol II	30-60
5	95% propanol III	30-60
6	100% propanol I	30-60
7	100% propanol II	30-60
8	100% propanol III	30-60
9	Histosolve I (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Shandon)	60
10	histosolve II	90
11	paraplast I	90
12	paraplast II	120

3.3 จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างวางในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน โดยเครื่อง parafin embedding (Shandon Histocentre Z)

3.4 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้ มาตัดแต่งหน้าให้เรียบ

3.5 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome รุ่น Leica RM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน ใช้ปากคีบปลายแบนคีบเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หลอดหยด 1.5% ethanol ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ตัดแล้ว หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วซ้อนด้วยแผ่นสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน

3.6 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำมาย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธี Bell and Lightner (1988) ตามขั้นตอนดังนี้คือ

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	xylene	5
2	xylene	4
3	100 % alcohol	1
4	100 % alcohol	1
5	95 % alcohol	1
6	95 % alcohol	1
7	ล้างน้ำ	2
8	Haematoxylin	2
9	ล้างน้ำ	2
10	Blueing Solution (Dilute)	จุ่ม 10-20 ครั้ง
11	ล้างน้ำ	1
12	95 % alcohol	จุ่ม 10-20 ครั้ง
13	Eosin	1
14	95 % alcohol	0.15
15	95 % alcohol	0.15
16	100 % alcohol	1
17	100 % alcohol	1
18	xylene	1
19	xylene	2
20	xylene	2

3.7 ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้ น้ำยา permount

3.8 นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (light microscope) พร้อมถ่ายภาพบันทึกไว้

หมายเหตุ: นิวเคลียส-ติดสีน้ำเงิน

ไซโตพลาสซึม-ติดสีชมพูถึงแดง

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

1. Fixation

- 1.1 นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์ มิลลิเมตร
- 1.2 นำตัวอย่างทั้งหมดมา pre-fix ด้วย 3% glutaraldehyde ใน buffer 0.1 M potassium phosphate pH 7.2 fix นาน 4 ชั่วโมง หรืออาจเก็บไว้ข้ามคืนที่ 20 องศาเซลเซียสในตู้เย็น
- 1.3 ล้างออกด้วย 0.1 M potassium phosphate pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10-30 นาที
- 1.4 post-fix ด้วย 1% osmium tetroxide ในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง
- 1.5 ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 10-30 นาที

2. Dehydration

- 2.1 นำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการ dehydration โดยผ่าน graded series of ethanol ซึ่งจะแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วย ethanol เข้มข้น 50%, 70%, 80%, 95% และ 99.9% โดยในแต่ละความเข้มข้นใช้เวลานาน 10-15 นาที และตามด้วย propylene oxide 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที-1 ชั่วโมง
- 2.2 ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 แต่เปลี่ยนอัตราส่วน organic solvent: resin = 1:2 นาน 30 นาที-1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนก็ได้
- 2.3 fresh pure resin ที่มี accelerator นาน 1-2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ทำ 2-3 ครั้ง

3. Embedding

นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปผ่านกระบวนการ embedding ใน plastic block โดยวางตัวอย่างลงในแบบพิมพ์ชนิด capsule หรือ embedding mold เติม fresh pure resin (Epon 812; Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA) ที่มี accelerator ให้ล้นเล็กน้อย

4. Polymerization

ขั้นตอนนี้อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของ resin เช่น epon และ araldite อบที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอบต่อที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงก็ได้ ส่วน spur นั้นอบที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง

5. Cutting

นำ plastic block ที่เตรียมได้มาตัด semithin และ ultrathin sections ซึ่งจะตัดโดยเครื่อง ultramicrotome โดยใช้ใบมีดที่เป็นแก้วและเพชร (glass and diamondknife)

6. Staining

6.1 semithin sections ย้อมสีด้วย toluidine blue และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (light microscope) เพื่อหาตำแหน่งเนื้อเยื่อบริเวณที่ต้องการนำไปตัดเป็น ultrathin sections ต่อไป

6.2 ultrathin sections ย้อมสีด้วย uranyl acetate และ lead citrate ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

6.2.1 uranyl acetate เข้มข้น 2% จนถึงอิมมัวในน้ำกลั่นหรือใน 50% ethanol วิธีคือการคือหยดสีลงบน parafilm 1 หรือ wax paper ทำให้คงตัวเป็นหยดไม่กระจายตัวออกไป คว่ำกริดด้านที่มี section ลงบนหยดสีดังกล่าว นาน 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ข้อควรระวังคือ แสงทำให้ uranyl acetate ตกตะกอนได้ ดังนั้นจึงควรใช้ภาชนะปิดกันแสง ขวดที่เก็บสารควรหุ้มไม่ให้แสงเข้า ำไปทำปฏิกิริยาได้ เมื่อย้อมครบตามเวลา ล้างออกด้วยน้ำกลั่นไม่ให้สีหลงเหลืออยู่ เพื่อป้องกันการเกิดตะกอน ซับพอหมาดแล้วย้อมต่อด้วย lead citrate

6.2.2 lead citrate ย้อมนาน 5-15 นาที วิธีการย้อมเช่นเดียวกับ uranyl acetate แต่ต้องทำใน
ภาชนะที่ปิดสนิท และมีสารดูด CO₂ เช่น เกล็ด NaOH บรรจุด้วย เนื่องจาก lead citrate จะทำ
ปฏิกิริยากับ CO₂ เกิดตะกอน lead carbonate ขึ้น เมื่อย้อมครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว จุ่มล้างด้วยน้ำ
กลั่นหลาย ๆ ครั้ง ซับให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน
(transmission electron microscope) (JEOL, JEM1210; Tokyo, Japan)