ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาว

Efficiency of Some Medicinal Plant Crude Extracts to Inhibit Pathogenic Bacteria in White Shrimp (*Penaeus vanamei*)

วีณา จิรัตฐิวรุตม์กุล ชัยสาร

ดอกรัก ชัยสาร

ณัฐพล เมฆแดง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ปี 2557

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และศูนย์วิจัยสุภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สำหรับการอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำหรับการศึกษา

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำหรับสถานที่ทำการศึกษา

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่สนับสนุนทุนวิจัย หมวดเงินรายได้ประจำปี 2555 และผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาแนะนำและแก้ไขรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่ นักศึกษา ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ทุกท่าน

คณะผู้วิจัย
มีนาคม 2558

หัวข้อวิจัย ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาว

ผู้ดำเนินการวิจัย วีณา จิรัตฐิวรุตม์กุล ชัยสาร
ดอกรัก ชัยสาร
ณัฐพล เมฆแดง

หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ พลู ฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด ด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสารเหนียว สีเขียวปนน้ำตาลเข้ม และจากการศึกษาประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี Agar diffusion ตรวจผลด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของสารสกัดสมุนไพรจากการทดลองพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ดีที่สุดคือสารสกัดหยาบจากพลู มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.33±0.22 เซนติเมตร รองลงมาคือ ฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.08±0.53, 1.74±0.04, 1.53±0.11 และ 1.22±0.09 เซนติเมตร ตามลำดับ จากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี Agar dilution พบว่าสารสกัดพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ดีกว่าฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง รางจืด ตามลำดับ โดยทั่วไปสารสกัดจากสมุนไพรมีสรรพคุณในการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์น้ำ สามารถให้สารสกัดโดยการผสมลงในอาหารสัตว์น้ำได้

Research Title Efficiency of Some Medicinal Plant Crude Extracts to Inhibit Pathogenic Bacteria in White Shrimp (*Penaeus vanamei*)
Researcher Weena Jirattiwarutkul Chaisarn
Dorkrak Chaisarn
Nuttaphol Mekdaeng
Organization Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhut University
Academic year 2557

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the antimicrobial efficiency of 5 herbal extracts which were *Piper betle*, *Andrographis paniculata*, *Cassia alata*, *Tiliacora triandra* and *Thumbergia laurifolia.* Crude extracts obtained by solvent extraction of herbal leaves with ethanol, and were sticky dark brown-green color. The efficiency of medicinal plant crude extracts for inhibition of *Vibrio harveyi* were determined by Agar diffusion method and examined the results by measuring the clear zone size by herbal extracts. The antimicrobial test results showed that the crude extract of *Piper betle* had highest antimicrobial activity to *Vibrio harveyi* (2.33±0.22 cm). The lowers were *Andrographis paniculata*, *Cassia alata*, *Tiliacora triandra* and *Thumbergia laurifolia* extract with clear zone of 2.08±0.53, 1.74±0.04, 1.53±0.11 and 1.22±0.09 cm., respectively. Insusceptibility test of *Vibrio harveyi*, to *Piper betle* crude extract by agar dilution method was used. Minimum inhibition concentration (MIC) results showed that *Piper betle* crude extract was higher effective in inhibiting and killing the *Vibrio harveyi* than *Andrographis paniculata*, *Cassia alata*, *Tiliacora triandra* and *Thumbergia laurifolia* respectively. These herbal products are able to provide aquatic animals disease prevention and treatment by feeding.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว	4
การดำรงชีวิตและระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว	5
โรคในกุ้งขาว	6
โรคเรืองแสง	8
ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งทะเล	10
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*	12
สมุนไพร	13
ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกับสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง	17
จุลินทรีย์ที่พบในสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงกุ้งทะเล	18
ประโยชน์ของสมุนไพรต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
สารออกฤทธิ์และวิธีการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในสัตว์น้ำ	20
การใช้สมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ	21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	27
วิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร	32
การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยวิธีการ Agar diffusion	34
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยวิธี Agar dilution	35
การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งขาว	37
การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกุ้งขาว ต่อองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน	39
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย	40
อภิปรายผลการวิจัย	40
ข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมตัวอย่างใบพืชสมุนไพรก่อนการสกัดสาร 49
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีสำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือดกุ้งขาว 56
ภาคผนวก ค การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จากกุ้งที่เป็นโรคเรืองแสง 60
ภาคผนวก ง ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 61

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ 22
2. ชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์น้ำ 23
3. ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด 34
4. เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (เซนติเมตร) ของสมุนไพร ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* 35
5. ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสมุนไพร ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* 36
6. ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารกุ้งขาว 38

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. แผนที่ประเทศแถบมหาสมุทรแปซิฟิก 3
2. สัญฐานวิทยาของกุ้งขาว 4
3. ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว 5
4. ระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว 6
5. กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 7
6. ลักษณะภายนอกของกุ้งที่เป็นซูโอแทมเนียมมีเมือกตามผิวตัวมาก 8
7. ลักษณะของกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงเมื่อดูในที่มืด 9
8. โรคแบคทีเรียเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* 9
9. ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* 12
10. ลักษณะใบย่านาง 13
11. ลักษณะใบพลู 14
12. ลักษณะใบฟ้าทะลายโจร 15
13. ลักษณะใบชุมเห็ดเทศ 16
14. ลักษณะใบรางจืด 17
15. ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกับสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง 18
16. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบพลู 32
17. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบรางจืด 33
18. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบย่านาง 33
19. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศ 33
20. ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบฟ้าทะลายโจร 34
21. วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด 35
22. วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากพลู 36
23. วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากรางจืด 36
24. วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากฟ้าทะลายโจร 37
25. วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากชุมเห็ดเทศ 37
26. การเตรียมอาหารกุ้งขาวโดยการผสมสารสกัดจากใบพลู กับอาหารกุ้งขาว 38
27. อาหารกุ้งขาวอบแห้งที่ผ่านการผสมสารสกัดจากใบพลู 38
28. กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลอง อายุ 8 สัปดาห์ 39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

29. ใบพลูสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลายแอลกอฮอล์ เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง 49
30. ใบชุมเห็ดเทศสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลาย แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง 49
31. ใบรางจืดสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลาย แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง 50
32. ใบฟ้าทะลายโจรสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลาย แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง 50
33. ใบย่านางสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลาย แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง 51
34. ใบพลูที่ผ่านการอบแห้ง 51
35. ใบชุมเห็ดเทศที่ผ่านการอบแห้ง 52
36. ใบรางจืดที่ผ่านการอบแห้ง 52
37. ใบฟ้าทะลายโจรที่ผ่านการอบแห้ง 52
38. ใบย่านางที่ผ่านการอบแห้ง 53
39. สมุนไพรอบแห้งที่ผ่านการบดละเอียดก่อนการแช่ ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 53
40. สมุนไพรที่แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น ร้อยละ 95 นาน 1 สัปดาห์ 54
41. ลักษณะสารสมุนไพรผ่านการกรองก่อนนำไประเหยด้วย เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) 55
42. โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บนอาหารแข็ง TSA หลังการคัดแยกแล้ว 60

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

การเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นและการตกค้างของอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีนเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคกุ้งโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและไวรัส โรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายให้กับการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยมากที่สุดคือโรคเรืองแสงเกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Vibrio harveyi* (สิริ ทุกข์วินาศ และชุติมา ขมวิลัย, 2545) การระบาดของโรคทำให้เกษตรกรต้องใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการยับยั้งเชื้อก่อโรคซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งที่ถูกและผิดกฎหมายเนื่องจากหน่วยงานที่รับผิดชอบไม่สามารถดูแลได้อย่างทั่วถึง ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียนั้นหากเกษตรกรใช้ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการจะทำให้เกิดโทษได้ Graslund, Holmstrom และ Wahlstrom (2003) ได้สำรวจการใช้สารเคมีในการเลี้ยงกุ้งของไทยทั้งการเลี้ยงในน้ำเค็มและน้ำกร่อยพบว่ายังมีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี นอกจากจะไม่ประสบความสำเร็จในการป้องกันและรักษาโรคกุ้งแล้วยังส่งผลให้แบคทีเรียมีการต้านทานยาปฏิชีวนะได้ (Moriarty, 1999) และเมื่อใช้ไปเป็นเวลานานจะทำให้มีการตกค้างของยาและสารเคมีในน้ำและดิน ทำให้เชื้อโรคในสิ่งแวดล้อมดื้อยาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนไม่สามารถควบคุมโรคกุ้งได้อีกต่อไป

การใช้สมุนไพรจึงเป็นที่สนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อให้สามารถนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไม่มีผลตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำซึ่งจะส่งผลต่อผู้บริโภค รวมทั้งการใช้สมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะช่วยให้สัตว์น้ำมีระบบภูมิคุ้มกันที่แข็งแรงสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ เช่น ไวรัส ซึ่งยังไม่มียาหรือสารเคมีที่สามารถรักษาโรคให้หายได้ (จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ และคณะ, 2553)

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรในพื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวและศึกษาองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวหลังได้รับสมุนไพร เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สมุนไพรเพื่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาว
2. ศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาว
3. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกุ้งขาวต่อองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ พลู ฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้งขาวโดยวิธี Agar diffusion

2. ศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดหยาบที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้งขาวโดยวิธี Agar dilution

3. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้งขาวดีที่สุด โดยการผสมสารสกัดหยาบลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว จากนั้นเก็บเลือดเพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการวิจัย

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย เริ่มตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2557

สถานที่ดำเนินการวิจัย อาคารศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สกัดได้ไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ใช้ผสมในอาหารสัตว์น้ำ หรือเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

2. เป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีรวมทั้งเป็นการป้องกันการตกค้างของยาปฏิชีวนะและสารเคมีจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

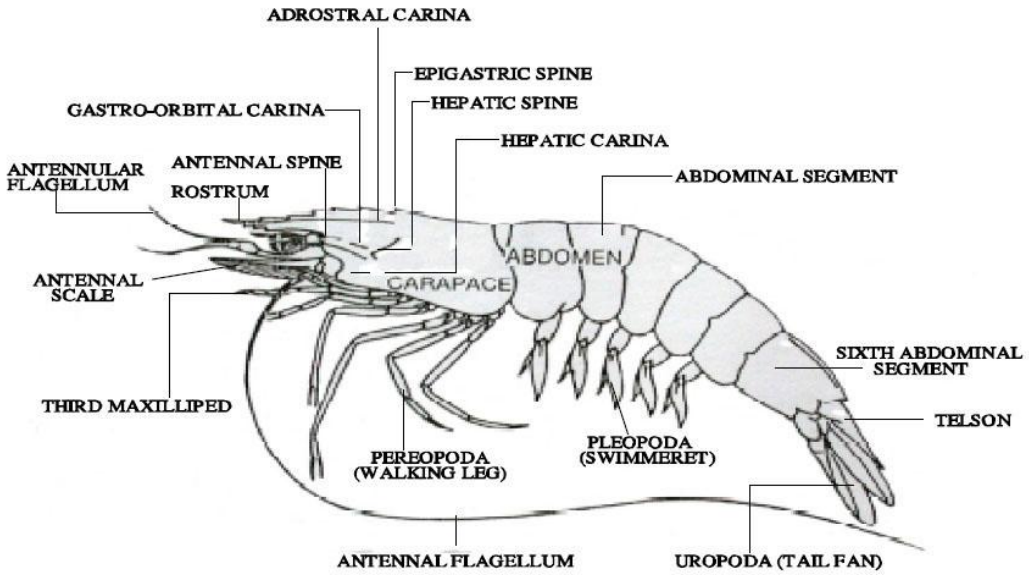
กุ้งขาวหรือกุ้งขาวแปซิฟิก (Pacific white shrimp) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus vannamei* ชื่อสามัญที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) รับรองและใช้เรียกกันทั่วโลกคือ White leg shrimp กุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงกันในปัจจุบันแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามสภาพภูมิศาสตร์ของโลกได้แก่ กุ้งขาวตะวันตก เช่น กุ้งขาวลิโทพีเนีย แวนนาไม กุ้งสีน้ำเงิน และกุ้งขาวตะวันออก เช่น กุ้งแชบ๊วย กุ้งขาวจีน กุ้งขาวอินเดีย กุ้งขาวจะพบบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกในประเทศเม็กซิโกตอนกลางและทางตอนใต้ของประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นกุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิคารากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ เปรู กุ้งสายพันธุ์นี้มีความแข็งแรงและทนทาน มีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้างขวางตามแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิกตั้งแต่ประเทศเม็กซิโกถึงเปรู (อาทินันท์ ประสมพงศ์, 2548)

ภาพที่ 1 แผนที่ประเทศแถบมหาสมุทรแปซิฟิก
ที่มา : www.israj.net

สำหรับในประเทศไทยมีการนำกุ้งขาวเข้ามาเลี้ยงเป็นครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2541 แต่ยังไม่เป็นที่นิยมมากนักเนื่องจากเกษตรกรยังนิยมเลี้ยงกุ้งกุลาดำกันอยู่ ต่อมาใน พ.ศ. 2545 กุ้งขาวเริ่มมีบทบาทมากขึ้นในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของไทยเนื่องจากกุ้งกุลาดำเริ่มประสบกับปัญหาโรคระบาด ทำให้กุ้งโตช้าและใช้เวลาเลี้ยงนาน กรมประมงจึงเริ่มอนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวจากต่างประเทศเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ต่อไป แต่จากการประเมินและวิเคราะห์ความเสี่ยง (Import risk analysis) พบว่าการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวอาจนำโรคทำให้สัตว์น้ำพื้นเมืองมีโอกาสที่จะติดโรคจากกุ้งขาวนำเข้าซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยได้ (นพดล ศุกระกาญจน์ และคณะ, 2547)

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว ลำตัวมี 8 ปล้องและมีสีขาว ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรียาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัว สันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาว หนวดสีแดง 2 เส้น ตาสีแดงเข้ม ส่วนลำตัวมี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ สีขาวส่วนปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบและ 1 กรีหาง (ดังภาพที่ 2-3) อวัยวะเพศเมียเป็นระบบเปิดไม่มีแผ่นปิดช่องเพศ (Seminal receptacle) หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ลอกคราบทุกๆ สัปดาห์ ไม่หมกตัว กุ้งขาวมีนิสัยก้าวร้าวและทำร้ายกุ้งตัวอื่น (กมลศิริ พันธนียะ, 2548)



ภาพที่ 2 สัญฐานวิทยาของกุ้งขาว
ที่มา : www.Shrimp-culture.blogspot.com

กุ้งขาวมีความสามารถในการปรับตัวได้ดีจึงอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างได้ เช่น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีระดับความเค็มตั้งแต่ 0-35 ส่วนในพัน (ppt) แต่ไม่ควรต่ำกว่า 3 ppt ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง กุ้งขาวมีการเจริญเติบโตรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำและมีการลอกคราบบ่อยจึงต้องการแมกนีเซียมและแคลเซียมในปริมาณที่ค่อนข้างสูง กุ้งขาวเคลื่อนที่เร็วและว่ายน้ำตลอดเวลาจึงต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตสูงกว่ากุ้งกุลาดำ (อาทินันท์ ประสมพงศ์, 2548) กุ้งขาวมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Order Decapoda
Family Penaeidae
Genus *Penaeus*
Species *Penaeus vannamei*

ภาพที่ 3 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว

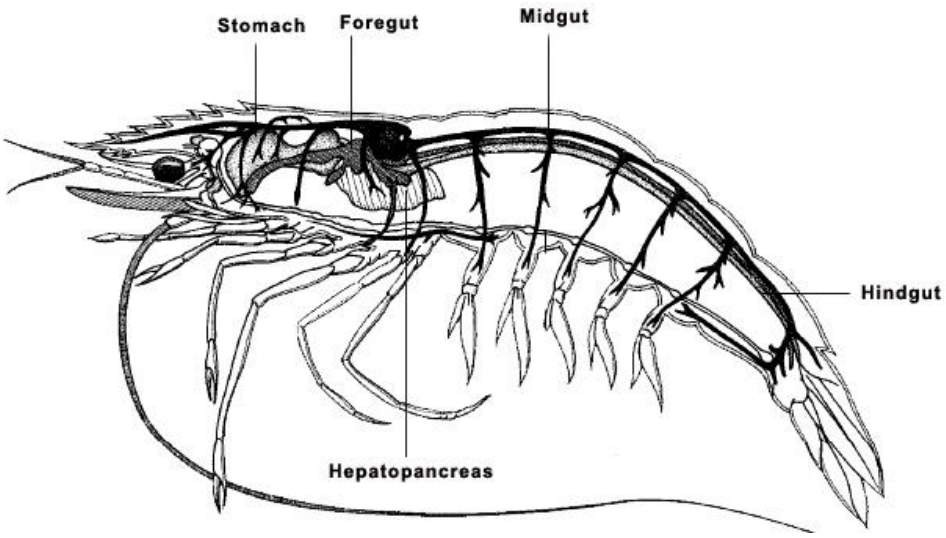
การดำรงชีวิตและระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว

กุ้งขาวหาอาหารได้โดยการรับรู้ด้วยการสัมผัสทางเคมี (Chemosensory) การทำงานของระบบนี้เริ่มจากเครื่องรับสารเคมี (Chemoreceptor) ที่อยู่บริเวณหนวดซึ่งไวต่อกลิ่นโปรตีนและกุ้งจะกระตุ้นเครื่องรับสารเคมีได้ดีกว่าสารอื่นๆ การที่กุ้งกระดิกหนวดแสดงว่ามีกลิ่นของอาหารมากระทบเครื่องรับสารเคมี จากนั้นกุ้งจึงใช้รยางค์จับอาหารเก็บไว้ก่อนจะนำเข้าปาก ซึ่งจะมีการคัดแยกอาหาร อาหารที่มีขนาดใหญ่จะถูกบดด้วยขากรรไกร (Mandibles) และจะถูกลำเลียงไปยังทางเดินอาหารส่วนหน้าเพื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยต่อไป ส่วนกากอาหารจะออกทางทวารหนัก กุ้งขาวจะใช้เวลาในการย่อยอาหารประมาณ 4-6 ชั่วโมง ระยะเวลาที่อาหารผ่านกระบวนการย่อยจนเป็นขี้กุ้งขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณและขนาดของอาหารที่กุ้งกินเข้าไป ทางเดินอาหารของกุ้งขาวแบ่งได้ 3 ส่วน ได้แก่ (ดังภาพที่ 4)

ทางเดินอาหารส่วนหน้า (Stomodeum หรือ Foregut) เริ่มตั้งแต่ปากถึงกระเพาะอาหาร ทำหน้าที่บดเคี้ยวและย่อยอาหาร ทางเดินอาหารส่วนหน้าเกิดจากชั้นเอคโตเดิร์มประกอบด้วยปากอยู่ระหว่างเขี้ยวทั้ง 2 (Mandible) และหลอดอาหารสั้นๆ มีผนังหนาผิวด้านในเป็นไคติน กระเพาะมีขนาดใหญ่ผนังบางแบ่งเป็น 2 ตอน คือ กระพุ้งใหญ่ตอนหน้าเรียกว่า คาร์ดิแอก แชมเบอร์ (Cardiac chamber) เป็นทางเดินอาหารตอนต้น กระเพาะส่วนนี้ทำหน้าที่ช่วยบดเคี้ยวอาหารคล้ายฟัน เรียกว่า แกสตริกมิลหรือไคตินัส (Gastric mill หรือ Chitinous teeth) และกระพุ้งเล็กเรียกว่า ไพโลริก แชมเบอร์ (Pyloric chamber)

ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Mesenteron หรือ Midgut) คือไพโลริก แชมเบอร์จะฝังอยู่ในส่วนตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) หรือที่เรียกว่ามันกุ้ง ทางเดินอาหารส่วนนี้ทำหน้าที่สร้างน้ำย่อยและเก็บอาหารโดยดูดซึมอาหารที่ผ่านการย่อยแล้ว

ทางเดินอาหารส่วนหลัง (Proctodeum หรือ Hindgut) เป็นส่วนต่อจากไพโลริก แชมเบอร์มีลักษณะเป็นท่อตรงขนาดเล็กบุด้วยเอคโตเดิร์ม ลำไส้ส่วนต้นของทางเดินอาหารส่วนหลังนี้จะฝังอยู่ในมันกุ้งแล้ววิ่งพาดอยู่เหนือกล้ามเนื้อเฟลเซอร์ (Felser) ทางด้านหลังมีเส้นเลือดดอร์ซัล แอบโดมินอล อาร์เทอรี่ (Dorsal abdominal artery) วิ่งขนานไปถึงหางปลายลำไส้เป็นบริเวณส่วนปลายท่อและเปิดที่ทวาร (Anus) ซึ่งอยู่กลางหางด้านท้อง (มณฑกานต์ ทองสม, 2547)



ภาพที่ 4 ระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (Van de Braak, 2002)

โรคในกุ้งขาว

การเกิดโรคในระยะแรกสังเกตได้จากลักษณะภายนอกคือกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงเปลือกจะใส ส่วนกุ้งที่เกิดอาการเครียดจะเริ่มเห็นจุดสีดำใต้เปลือกและเกิดแผลตามตัว แผลจะมีสีดำเพราะกุ้งสร้างสารสีเรียกว่า เมลานิน (Melanin) ขึ้นมาอย่างรวดเร็วและมีการแพร่กระจายติดโรคทั่วบ่อ สามารถจำแนกสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งขาวได้ดังนี้

โรคจากแบคทีเรีย (Bacterial diseases) เช่น โรคเรืองแสง (Vibriosis) เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. เช่น *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. aginolyticus* เป็นต้น บริเวณที่พบการติดเชื้อได้แก่ เหงือก กล้ามเนื้อ น้ำเลือด ตับและตับอ่อน กุ้งจะมีอาการตับฝ่อ ไม่กินอาหาร ลำไส้ว่างเปล่า บริเวณลำตัวและรยางค์มีแผล

โรคจากไวรัส (Viral diseases) เช่น โรค Taura syndrome virus (TSV) พบในกุ้งขาวระยะ Post larvae ที่ 14-40 มี 2 ระยะคือ ระยะรุนแรงและระยะเรื้อรังโดยในระยะรุนแรงกุ้งมีสีแดงซีดทั้งตัวและจะตายขณะลอกคราบ นอกจากนี้กุ้งจะมีเปลือกนิ่มและลำไส้ว่างเปล่า ระยะเรื้อรังจะพบกุ้งจำนวนเล็กน้อยถึงปานกลาง มีจุดสีดำตามลำตัวแสดงถึงการติดเชื้อที่เปลือก กุ้งเหล่านี้อาจจะมีเปลือกนิ่มหรือไม่นิ่มก็ได้ บางครั้งอาจพบการกระจายตัวของเม็ดสีแดงตามเปลือก โดยที่กุ้งยังคงมีพฤติกรรมและการกินอาหารตามปกติ สำหรับโรคตัวแดงดวงขาว White spot syndrome virus (WSSV) กุ้งจะมีอัตราการตายสูง มีจุดสีขาวบริเวณลำตัวและใต้เปลือก อวัยวะเป้าหมายได้แก่ ผิวใต้เปลือก ต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เหงือกและหัวใจ เป็นต้น

โรคจากปรสิต (Parasitic diseases) ปรสิตมีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลน้อย กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ ปรสิตที่ต้องอาศัยพาหะหรือเจ้าบ้านแบบถาวร Obligate parasite) และวิเคราะห์โรคได้ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เช่น Microsporidia ก่อโรคหลังขาวพบติดเชื้อได้ทั่วไปในกุ้งกลุ่ม Penaeid ระยะวัยรุ่นและโตเต็มวัยโดยจะเข้าทำลายกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำให้เนื้อเป็นสีขาวขุ่น

โรคจากรา (Fungal diseases) เช่น โรค Fusariosis หรือโรคเหงือกดำ (Black gill) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* spp. พบในกุ้งทะเลหลายชนิดที่เลี้ยงในระบบหนาแน่นที่มีระบบการเลี้ยงไม่ดี การติดเชื้อราชนิดนี้เกิดจากกุ้งมีบาดแผลซึ่งทำให้เชื้อราเข้าสู่ร่างกายจะพบจุดสีน้ำตาลบริเวณเปลือก เหงือกและรยางค์ มีอาการที่ไม่รุนแรงเนื่องจากไม่ได้ทำลายเนื้อเยื่อภายใน

ภาพที่ 5 กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
ที่มา : www.thailandshrimp.org/index.php

ภาพที่ 6 ลักษณะภายนอกของกุ้งที่เป็นซูโอแทมเนียมมีเมือกตามผิวตัวมาก
ที่มา : www.thailandshrimp.org/index.php

โรคเรืองแสง

โรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำเกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟกเจลลา ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอ็นไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) ซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที ที่อุณหภูมิน้ำสูงประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชน้ำที่เชื้อเจริญเติบโตดีคือ 7-9 ปัญหาการเกิดโรคเรืองแสงของกุ้งในบ่อเลี้ยงพบได้ตั้งแต่ปล่อยลูกกุ้งในบ่อ 2 สัปดาห์จนถึงกุ้งใหญ่ขึ้นกับการจัดการบ่อและสภาพของพื้นบ่อ แต่ที่พบมากกุ้งมีอายุประมาณ 30-60 วัน

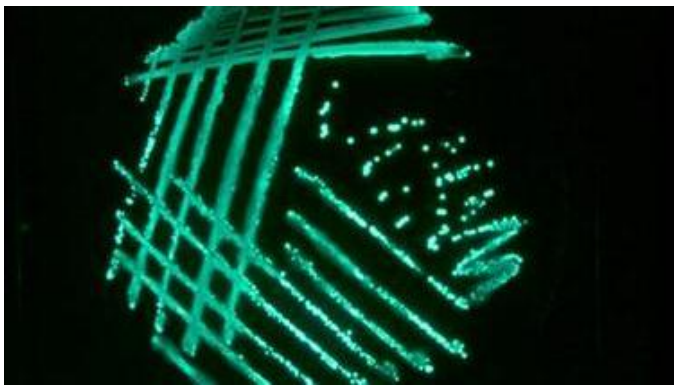
ลักษณะอาการ กุ้งป่วยจะขึ้นมาเกยตามขอบบ่อ หรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำซึ่งกุ้งป่วยเหล่านี้จะเห็นการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืนเมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบโดยนำส่วนของตับและตับอ่อนหรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จะได้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเป็นชนิดสีเขียว เมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วยพบว่าส่วนตับและตับอ่อนนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรงทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากพบว่าตับและตับอ่อนถูกทำลายแล้วพบว่าลำไส้เกิดเซลล์ตายและมีอาการอักเสบอย่างชัดเจนเช่นกัน

การป้องกัน ในช่วงที่มีการระบาดของโรคเรืองแสงเช่นในฤดูร้อน ผู้เลี้ยงกุ้งควรหาน้ำที่มีความเค็มต่ำ หรือน้ำจืดมาเติมในบ่อให้ปรับความเค็มน้ำในบ่อเหลือประมาณ 5-7 พีพีที ปัญหาของโรคเรืองแสงจะน้อยลงมาก ยังพบว่าหากปล่อยให้ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำอยู่ในระดับสูง 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลาติดต่อกันนาน 10 วันขึ้นไป กุ้งในบ่อจะเริ่มมีปัญหาเกิดขึ้นจึงควรนำน้ำไปตรวจหาปริมาณเชื้อในน้ำอยู่เสมอ เมื่อพบว่าในน้ำมีเชื้อมากก็ควรลดปริมาณเชื้อในบ่อและให้กุ้งกินยาป้องกันโรคเรืองแสงจะกลับขึ้นมาใหม่ การให้กุ้งกินยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการติดเชื้อในระยะที่มีการแพร่ระบาดของโรคจะต้องขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค สำหรับบ่อที่ให้กุ้งกินแบคทีเรียที่เป็นชนิดโปรไบโอติกถ้าจะใช้ยาต้องงดการให้กินโปรไบโอติก ห้ามให้กินพร้อมกันนอกจากนี้แบคทีเรียเรืองแสง

กลุ่มนี้ต้องการคาร์บอน และไนโตรเจน เพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นหากต้องการลดปริมาณแบคทีเรียเรืองแสงในบ่อ นอกจากการลดความเค็มแล้ว วิธีที่ง่ายและได้ผลที่สุดคือการลดปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในน้ำลง หมายถึงการควบคุมปริมาณอาหารให้อยู่ในระดับที่กุ้งกินได้หมดพอดี

การป้องกันโรคเรืองแสงได้ และเป็นสิ่งที่ควรทำ หากเกษตรกรต้องการจะป้องกันโรคเรืองแสงในบ่อกุ้งของตนเอง สามารถทำได้โดยยอมเสียกุ้งวันละหนึ่งหรือสองตัวในยอ ทำให้กุ้งนั้นตายแล้วนำมาใส่ภาชนะเปิดที่สามารถสัมผัสกับอากาศเช่นจานหรือถ้วย ทิ้งไว้ในที่ร่มอุณหภูมิปกติประมาณ 5-6 ชั่วโมง แล้วนำกุ้งตัวอย่างนั้นเข้าไปในห้องที่มีแสงน้อยหรือมืด หากกุ้งที่เก็บมาเกิดการเรืองแสงก็แสดงว่ากุ้งในบ่อเราเริ่มจะติดเชื้อเรืองแสง ให้รีบแก้ปัญหาทันทีก่อนที่กุ้งในบ่อส่วนใหญ่จะเป็นโรคเรืองแสงทั้งหมด ควรเก็บกุ้งตั้งแต่ช่วงบ่าย เพราะเชื้อเรืองแสงจะใช้เวลานานในการเรืองแสง และเพื่อให้ทันการเกษตรกรควรเก็บกุ้งตัวอย่างในเวลากลางวันเช่นตอนเช็คยอ อาหารช่วงบ่ายเพื่อที่ว่าเมื่อตอน 5-6 ชั่วโมง ผ่านไปแล้วนำกุ้งไปส่องในห้องมืดหากกุ้งเรืองแสงจะได้ทันให้ยากุ้งในมื้อกลางคืนได้ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดสงขลา, 2557)

ภาพที่ 7 ลักษณะของกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงเมื่อดูในที่มืด
ที่มา : www.thailandshrimp.org/index.php



ภาพที่ 8 โรคแบคทีเรียเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio*
ที่มา : www.thailandshrimp.org/index.php

ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งทะเล

ในการเลี้ยงกุ้งขาวระบบหนาแน่น (Intensive system) น้ำเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุด ซึ่งจะมีผลต่อการฟักไข่ อัตราการรอด การเจริญเติบโต ความต้านทานโรคและระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงจะมีผลต่อกลไกการตอบสนองภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำทั้งหมด โดยเฉพาะระบบหมุนเวียนเลือด (Le Moullac and Haffner, 2000) ดังนั้นกรมประมง (2555) จึงกำหนดค่าคุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งทะเลไว้ดังนี้

ความเค็ม (Salinity) น้ำทะเลทั่วไปจะมีความเค็มประมาณ 30-35 ppt ส่วนในบริเวณปากแม่น้ำหรือน้ำกร่อยมีค่าความเค็มอยู่ระหว่าง 2-30 ppt ในการเลี้ยงกุ้งทะเลควรมีความเค็มอยู่ระหว่าง 25-35 ppt สำหรับกุ้งขาวสามารถเลี้ยงในช่วงความเค็ม 2-35 ppt ได้แต่ระดับที่เหมาะสมคือ 20-25 ppt จากการศึกษาของ Bray, Lawrence และ Leung-Trujillo (1990) พบว่าความเค็มของน้ำมีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึมของกุ้งขาว (*P. vannamei*) เพียงเล็กน้อย จากการศึกษาจำนวนเม็ดเลือดรวมมีค่าไม่แตกต่างกันในแต่ละระดับความเค็มตั้งแต่ 13-34 ppt เช่นเดียวกับการศึกษาของ Vargas-Albores และคณะ (1998) ในกุ้งขาเหลือง (*P. californiensis*) เต็มวัยที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 28, 32, 36, 40 และ 44 ppt ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยศึกษาปริมาณโปรตีนในพลาสมาและระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (ProPO) พบว่าระดับของความเค็มไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณโปรตีนในพลาสมาแต่สำหรับระบบ ProPO จะเพิ่มขึ้นตามระดับความเค็มที่สูงขึ้น

อุณหภูมิ (Temperature) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำเป็นปัญหาที่สำคัญมากเนื่องจากมีผลในทางตรงคืออุณหภูมิของน้ำที่เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกายเพิ่มขึ้น 10 เท่า ทำให้สัตว์น้ำมีความต้องการอาหารและออกซิเจนเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การฟักไข่และอัตราการรอดของสัตว์น้ำ (Chen *et al*., 1995) ส่วนผลทางอ้อมคือมีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลในเขตร้อนคือ 28-33 องศาเซลเซียส ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำอย่างรวดเร็วกุ้งจะเกิดอาการกล้ามเนื้อเกร็งมีลักษณะคล้ายเป็นตะคริวได้ Steenbergen, Steenbergen และ Schapiro (1978) รายงานว่าความสามารถในการจับสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดจะสูงขึ้นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป และในกุ้งขาเหลือง (*P. californiensis*) อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 18-32 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อค่าพารามิเตอร์เลือดของกุ้งคือจำนวนเม็ดเลือดรวม ค่ากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและปริมาณโปรตีนในพลาสมาจะเพิ่มขึ้น

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved oxygen, DO) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีผลต่อการดำรงชีวิตของกุ้งทะเล กุ้งจะใช้ออกซิเจนในกระบวนการต่างๆ ในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโต ถ้าปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำมีค่าต่ำกว่า 5 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร กุ้งจะมีการเจริญเติบโตช้าแต่กุ้งจะเจริญเติบโตดีถ้ามีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำสูงกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในรอบวันพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมีแนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่เวลา 8.00-15.00 น. และมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่เวลา 18.00-6.00 น. ในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 30 ppt และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณออกซิเจนละลายอิ่มตัวในน้ำประมาณ 6.39 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อลิตร ถ้าอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นหรือค่าความเค็มเพิ่มขึ้นปริมาณ

ออกซิเจนละลายน้ำจะมีค่าลดลง หากปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงแล้วจะมีผลให้ค่าพารามิเตอร์เลือดของกุ้งต่ำลงซึ่งจะทำให้โอกาสการติดเชื้อเพิ่มขึ้นได้ (Le Moullac *et al*., 1998) สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำได้แก่ แสงแดด การไหลเวียนของน้ำ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ พืชน้ำ ความโปร่งแสง ความลึกของบ่อ ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ สิ่งขับถ่ายของกุ้งรวมทั้งอาหารที่เหลือจากการกินของกุ้ง

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) กุ้งทะเลจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำอยู่ระหว่าง 6-9 แต่จะเจริญเติบโตช้าถ้าน้ำมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4-6 และ 9-11 และกุ้งจะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ถ้า pH มีค่าต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 11 ค่า pH ของน้ำจะเพิ่มขึ้นในเวลากลางวัน เนื่องจากการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำและแพลงก์ตอนพืชจะทำให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในน้ำลดลงส่งผลให้ค่าความเป็นด่างสูงขึ้นและในช่วงเวลากลางคืนค่า pH ของน้ำจะลดลงเนื่องจากกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำจะคายคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาทำให้น้ำมีความเป็นกรดสูงขึ้น

ความเป็นด่าง (Alkalinity) ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของด่างที่ละลายน้ำได้แก่ อิออนของไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/l-$CaCO_3$) ค่าความเป็นด่างที่เหมาะสำหรับการดำรงชีวิตของกุ้งทะเลควรมีค่าในช่วง 70-120 มิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต ค่าความเป็นด่างนี้มีคุณสมบัติในการควบคุมค่า pH ของน้ำให้คงที่โดยยอมให้มีการเปลี่ยนแปลงได้ไม่เกิน 0.5 ในรอบวัน การปรับค่าความเป็นด่างมักใช้ปูนคาร์บอเนต ($CaCO_3$) หรือโดโลไมต์ (Dolomite) Ca ($MgCO_3$)$_2$

แอมโมเนีย (Ammonia) เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในน้ำและกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ในน้ำ แอมโมเนียที่พบในน้ำมี 2 รูปคือไม่แตกตัวและแตกตัวเป็นอิออน ได้แก่ อันอิอนแอมโมเนีย (Un-ionized ammonia; NH_3^-) และแอมโมเนียมอิออน (Ammonium ion; NH_4^+) การเกิดแอมโมเนียทั้ง 2 รูปแบบขึ้นอยู่กับความสมดุลของอุณหภูมิกับ pH โดย pH จะเป็นปัจจัยสำคัญกว่าอุณหภูมิ ถ้าค่า pH ของน้ำสูงขึ้นจะทำให้ NH_3^- มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ในบ่อเลี้ยงโดยทั่วไปปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia) ไม่ควรเกิน 1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ความเป็นพิษของแอมโมเนียที่มีต่อสัตว์น้ำส่วนใหญ่เกิดจากสัตว์น้ำไม่สามารถขับแอมโมเนียที่สะสมภายในร่างกายออกสู่ภายนอกได้และแอมโมเนียทำลายจะเหงือกสัตว์น้ำส่งผลให้ประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนออกซิเจนเข้าสู่ภายในร่างกายลดลง

ไนไตรท์ (Nitrite) เกิดจากกระบวนการ Nitrification เป็นสารที่มีพิษต่อสัตว์น้ำ ในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล ระดับของไนไตรท์ไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร Tseng และ Chen (2004) ศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวที่เลี้ยงในสภาวะที่มีไนไตรท์สูงตั้งแต่ 0, 0.98, 4.94, 9.87 และ 19.99 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากผ่านไป 96 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดรวมและค่ากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะลดลงและค่ากิจกรรมการหายใจของเม็ดเลือดจะเพิ่มขึ้น (Respiratory burst) ทำให้การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง

ไนเตรท (Nitrate) ในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำไนเตรทอาจเพิ่มเป็น 2.26-4.52 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในบ่อเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา และอาจสูงถึง 500 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในบ่อเลี้ยงระบบหมุนเวียนแบบปิด ระดับของไนเตรทไม่ควรเกิน 20 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อลิตร (Tsai

and Chen, 2002) โดยทั่วไปแล้วไนเตรทจะไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำโดยตรงเหมือนกับแอมโมเนียและไนไตรท์ แต่หากพบไนเตรทในปริมาณที่สูงจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยจะทำให้กุ้งโตช้า (Muir, Sutton and Owens, 1991)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi เป็นแบคทีเรียอยู่ในจีนัส *Vibrio* จัดเป็นแบคทีเรียเรืองแสง (Luminous bacteria) ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น (Short rod) ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง (Vibriosis) เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอร์เรส (Luciferase) มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในบ่อเลี้ยงที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 ppt แบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) มีการแพร่ระบาดในทุกช่วงอายุทั้งในกุ้งวัยอ่อนและกุ้งตัวเต็มวัยรวมไปถึงพ่อแม่พันธุ์ (สิริ ทุกข์วินาศ และชุติมา ขมวิลัย, 2545) โดยปกติแล้วแบคทีเรีย *V. harveyi* จะพบในเหงือกและทางเดินอาหารของกุ้งแต่จะก่อให้เกิดโรคได้เมื่อมีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม กุ้งเครียด อ่อนแอเป็นสาเหตุให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนและเข้าทำลายกุ้งได้ อาการของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในระยะแรกจะพบแบคทีเรียที่บริเวณเปลือกแล้วจะเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลหรือทางเดินอาหารของกุ้ง บริเวณที่พบการติดเชื้อได้แก่ เหงือก กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ ต่อมน้ำเหลือง ตับและตับอ่อน เป็นต้น ทำให้กุ้งกินอาหารน้อยลง ตับและตับอ่อนลีบฝ่อ (Atrophy) เกิดลักษณะเนื้อตาย (Necrosis) ว่ายน้ำเกยขอบบ่อและเรืองแสงในที่มืด (สุภฎา คีรีรัฐนิคม และคณะ, 2543)

สภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่าความเค็มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-80 ppt ดังนั้นในช่วงฤดูฝนจึงมีโอกาสพบแบคทีเรียโรคเรืองแสงได้น้อยกว่าฤดูร้อน สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่แบคทีเรียในน้ำจะเจริญได้ดีในประเทศแถบร้อนจะอยู่ในช่วง 25-31 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่านี้การเจริญเติบโตจะลดลง (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2541)

ภาพที่ 9 ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

สมุนไพร

ย่านาง

ย่านางมีถิ่นกำเนิดในตอนกลางของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีประมาณ 70 ตระกูล ส่วนใหญ่เป็นไม้เลื้อยในป่าเขตร้อนและในป่าไม้ผลัดใบในทวีปเอเชียและอเมริกาเหนือ ย่านางเป็นพืชที่ขึ้นได้ในดินทุกชนิดและปลูกได้ทุกฤดูกาล พบขึ้นตามป่าผลัดใบ ป่าดงดิบ และป่าโปร่ง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทุกภาคของประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels ชื่อท้องถิ่นได้แก่ เถาวัลย์เขียว เถาหญ้านาง หญ้าภคินี (ภาคกลาง) จ้อยนาง ผักจอยนาง จอยนาง (เชียงใหม่) ย่านนาง ยานนาง ขันยอ ยาดนาง วันยอ (ภาคใต้) ย่านาง (ภาคอีสาน) (กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติธนะ, 2553) ย่านาง มีรสจืด เถาและใบย่านาง นิยมใช้เป็นเครื่องปรุง จะใช้เถา ใบอ่อน ใบแก่ ตำคั้นเอาน้ำสีเขียวแล้วไปต้มกับหน่อไม้จะช่วยลดกรดออกซาลิค นำมาปรุงเป็นแกงหน่อไม้หรือซุบหน่อไม้ทำให้หน่อไม้จืดไม่ขม (รัชนี คุณานุวัตน์, 2551)

สารออกฤทธิ์พบในรากย่านาง ส่วนใหญ่เป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่ม Isoquinoline ในใบประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ สารโพลีฟีนอล แคลเซียมออกซาเลท และอัลคาลอยด์กลุ่ม Isoquinoline ย่านางมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Plantae
Division Magnoliophyta
Class Magnoliopsida
Order Ranunculales
Family Menispermaceae
Genus *Tiliacora*
Species *Tiliacora triandra*

ภาพที่ 10 ลักษณะใบย่านาง

พลู

พลูมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ขึ้นได้ตามอากาศร้อนชื้น ต่อมาได้มีการแพร่ไปยังหลายๆ ประเทศทั้งเอเชียและแอฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper betle* L. มีหลายชนิด เช่น พลูจีน พลูเหลือง พลูเขียว พลูทองหลาง เป็นต้น เนื่องจากพลูเป็นไม้เลื้อย เวลาปลุกพลูต้องหาไม้ค้างหรือต้นไม้ให้พืชชนิดนี้เกาะ ส่วนมากมักปลูกให้ขึ้นไปกับต้นทองหลาง ใบพลูเมื่อผสมกับปูนแดงและหมากใช้เป็นของเคี้ยวสำหรับผู้ที่กินหมาก พลูมีปลูกมากในภาคกลางและภาคอีสาน ลักษณะใบพลูจะเกาะหรือเกี่ยวพันกับไม้หรือหลักด้วยรากที่อยู่ตามข้อ ใบพลูอาศัยดินที่อุดมสมบูรณ์ ระบายน้ำได้ดี มีความชื้นและอากาศไม่ร้อนจัด ปลูกได้ทุกประเทศ ในใบพลูมีน้ำมันหอมระเหย สีน้ำตาลปนเหลือง และมีกลิ่นฉุน เรียกว่าน้ำมันพลู ซึ่งมีรายงานถึงสารประกอบหลักในน้ำมันพลูเป็นสารประกอบฟีนอล

สารที่พบในน้ำมันพลู ได้แก่ ไอโซยูกลีนอล (Isoeugenol), คาวิคัล (Chavicol), ยูกลีนอล (Eugenol), คาวิบิทัล (Chavibitol) เป็นต้น สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคทำให้ปลายประสาทชา (วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก, 2555) มีรายงานการวิจัย มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแคมไพโรแบคเตอร์ (*Campylobacter*) มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรอื่น ซึ่งเชื้อดังกล่าวเป็นอนุพันธ์เดียวกับแบคทีเรียเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโรไล (*Helicobacter pylori*) (อิทธิกร ชลจรารักษ์, 2553) พลูมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Plantae
Division Tracheobionya
Class Magnoliophyta
Order Magnolipsida
Family Magnoliidae
Genus *Piper*
Species *Piper betle*

ภาพที่ 11 ลักษณะใบพลู

ฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจรมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees และชื่อสามัญว่า Kariyat หรือ The Creat นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นๆ ตามท้องถิ่น ได้แก่ หญ้ากันงู (สงขลา) น้ำลายพังพอน ฟ้าละลายโจร (กรุงเทพฯ) ฟ้าสาง (พนัสนิคม) เขยตายยายคลุม สามสิบดี (ร้อยเอ็ด) เมฆทะลาย (ยะลา) ฟ้าสะท้าน (พัทลุง) โดยใช้เฉพาะใบหรือทั้งต้นบนดิน เป็นยาแก้เจ็บคอ แก้ท้องเสีย แก้ไข้ หรือเป็นยาขม เจริญอาหาร สารออกฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค โดยการเพิ่มประสิทธิภาพของเม็ดเลือดขาวในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ยับยั้งเชื้อไวรัส และทำลายเซลล์มะเร็ง (เต็มดวง สมศิริ, 2555)

ฟ้าทะลายโจรจะพบสาระสำคัญ ได้แก่พวก ไดเทอร์ปีนแลคโตน (Diterpene Lactones) หลายชนิด ได้แก่ แอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide), นีโอแอนโดกราโฟไลด์ (Neoandrographolide), ดีออกซีแอนโดกราโฟไลด์ (Deoxyandrographolide), 14-ดีออกซี-11,12-ไดดีไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ (14-Deoxy-11,12-didehydrographolide) โดยสารดังกล่าวจะมีฤทธิ์ทางเภสัชแตกต่างกันออกไป ฟ้าทะลายโจรมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Plantae
Division Tracheobionya
Class Magnoliophyta
Order Magnolipsida
Family *Asteridae*
Genus *Andrographis*
Species *Andrographis paniculata*

ภาพที่ 12 ลักษณะใบฟ้าทะลายโจร

ชุมเห็ดเทศ

ชุมเห็ดเทศเป็นไม้พุ่มสูง 1-3 เมตร แตกกิ่งออกด้านข้างในแนวขนานกับพื้นใบเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ดอกเป็นช่อที่ซอกใบตอนปลายกิ่ง กลีบดอกสีเหลืองทอง ใบประดับสีน้ำตาลแกมเหลือง หุ้มดอกย่อยเห็นชัดเจน ผลเป็นฝักมี 4 กลีบ เมล็ดแบน รูปสามเหลี่ยม มีสารประกอบ Anthraquione-glycoside หลายชนิด ได้แก่ Emodin aloe-emodin และ Rhein ใช้เป็นยาระบายกระตุ้นลำไส้ใหญ่ ชุดเห็ดเทศมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Senna alata* (L.) และมีชื่ออื่นๆ เช่น หมากกะลิงเทศ ขี้เหล็กสาร หมากกลิ่งเทศ (ภาคเหนือ) ชุมเห็ดใหญ่ ชุมเห็ด (ภาคกลาง) ส้มเห็ด (เชียงราย) ตะสีพอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)

ในใบชุมเห็ดเทศมีสารแอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (Anthraquinine glycosides) ของเรอีน (Rhein), แอรี-อิโมดิน (Aloe-emodin) และไฟไซโอน (Physcione) และมีเอกลิโคนอิสระ (Free aglycone) ได้แก่ เรอีน (Rhrin), อีโมดิน (Emodin), แอลี-อิโมดิน (Aloe-emodin), คริสโซเฟนัล (Chrysophanol) และไอโซคริสโซเฟนัล (Isochrysophanol) นอกจากนี้ยังมีสารคีมเฟอรัล (Kaempferol), ไซโทสเทรอล (Sitosterol) และเซนโนไซด์ (Sennosides) ชนิด A, B, C และ D ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก, 2555) ชุมเห็ดเทศมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Plantae
Division Magnoliophyta
Class Magnoliopsida
Order Fabales
Family Fabaceae
Genus *Senna*
Species *Senna alata*

ภาพที่ 13 ลักษณะใบชุมเห็ดเทศ

รางจืด

รางจืดเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง หัวและต้นคล้ายขมิ้น เนื้อในหัวมีสีนวล ต้นและใบสีเขียว เมื่อต้นแก่ออกดอกแล้วต้นจะโทรมไปคราวหนึ่ง พอถึงฤดูฝนจะเจริญงอกงามขึ้นมาอีกที หัวอยู่ใต้ดินนั้นเพียงแต่หยุดพักตัวชั่วคราว ดอกสีขาว ริมขอบดอกสีชมพู ดอกคล้ายดอกกระเจียว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Thunbergia laurifolia* Lindl. มีชื่ออื่นๆ ได้แก่ กำลังช้างเผือก เครือเขาเขียว ขอบชะนางยาเขียว (ภาคกลาง) คาย รางเย็น (ยะลา) จอลอดิเออ ซั้งกะ ปั้งกะล่ะ พอหน่อเตอ (แม่ฮ่องสอน) ดุเหว่า (ปัตตานี) ทิดพุด (นครศรีธรรมราช) น้ำนอง (สระบุรี) ย่ำแย้ แอดแอ (เพชรบูรณ์) รางจืดมีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Plantae

Order Lamiales

Family Acanthaceae

Genus *Thunbergia*

Species *Thunbergia laurifolia*

ภาพที่ 14 ลักษณะใบรางจืด

ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกับสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง

ระบบนิเวศในบ่อเลี้ยงนั้นมีความซับซ้อนเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยหลัก 3 ประการ คือ ตัวกุ้ง (Host) เชื้อก่อโรค (Pathogen) และสภาพแวดล้อมในบ่อ (Environment) สาเหตุของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ที่ส่งผลกระทบถึงกันของปัจจัยทั้ง 3 ประการ (Van de Braak, 2002) เนื่องจากกุ้งขาวมีระบบทางเดินอาหารที่เปิดให้น้ำเข้าออกได้ทำให้กุ้งสัมผัสกับจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งเชื้อก่อโรคอยู่ตลอดเวลา หากมีการจัดการคุณภาพน้ำและดินไม่ดี ปริมาณออกซิเจนในน้ำไม่เหมาะสม หรือให้อาหารมากเกินไปกุ้งจะเครียดไม่กินอาหารทำให้ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอและไม่ทนต่อเชื้อโรค เชื้อโรคซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้กุ้งอ่อนแอแล้วเป็นโรคได้ และเมื่อมีอาหารสะสมในบ่อมากขึ้นสภาพแวดล้อมในบ่อก็จะเสื่อมโทรมลงเรื่อยๆ ในที่สุดก็มีการแพร่ระบาดของโรคไปทั้งบ่อ (ดังภาพที่ 15)

เกษตรกรควรจัดการสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงให้มีความเหมาะสม มีสมดุลของจุลินทรีย์ภายในบ่อ มีคุณภาพน้ำดี และอาจมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเช่น บีตากลูแคน (กิจการ ศุภมาตย์ จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง, 2543ก) หรือวัคซีนในการเพิ่มความต้านทาน ส่วนการกำจัดเชื้อก่อโรคจากที่เคยใช้สารเคมีซึ่งกระทบต่อกุ้งโดยตรงอาจเปลี่ยนมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติแทน และในสภาพแวดล้อมจะต้องมีการควบคุมคุณภาพน้ำภายในบ่อเลี้ยงให้เหมาะสม หากเกษตรกรควบคุมปัจจัยทั้ง 3 ได้แล้ว การเกิดโรคในกุ้งจะลดลงส่งผลให้กุ้งมีสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันดี โตเร็ว ทำให้ได้ผลผลิตสูงอีกด้วย

ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้ง เชื้อก่อโรค และสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยง

จุลินทรีย์ที่พบในสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงกุ้งทะเล

จุลินทรีย์ในบ่อกุ้งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ซึ่งอาจจะไม่ได้ก่อให้เกิดโรคโดยตรงแต่จะที่ไปขัดขวางกิจกรรมต่างๆ ทำให้กุ้งเกิดความเครียดทำให้ติดโรคได้ง่าย สำหรับจุลินทรีย์ก่อโรคแบ่งย่อยได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย รา ไวรัสและโปรโตซัว แบคทีเรียที่พบมากที่สุด ได้แก่ จีนัส *Vibrio* เช่น *V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. ordall, V. vulnificus, V. anguillarum, V. alginolyticus, V. pelagius, V. damsela, V. mimicus, V. splendidus, V. tubiashii, V. fluvialis, V. carchariae*, *V. orientalis,* และ *V. cholerae* เป็นต้น (Gomez-Gil *et al*., 1998; Abraham and Palaniappan, 2004) กลุ่มรา เช่น *Sirolpidium* sp., *Langenidium* sp. และ *Fusarium* sp. จะเกาะอยู่ตามเหงือกกุ้งระยะ larvae, Post larvae และ Juvenile เป็นต้น กลุ่มโปรโตซัว เช่น *Acineta*, *Epistylis* และ *Zoothamnium* เป็นต้น กลุ่มที่

ก่อให้เกิดโรคมากที่สุดคือ กลุ่มไวรัส เช่น โรคหัวเหลือง (Yellow head virus; YHV) โรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) โรคไวรัสเอ็มบีวี (Monodon baculo virus; MBV) โรคไวรัสเอชพีวี (Hepatopancreatic parvo virus; HPV) (Gabriel and Felipe, 2000)

สำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Coryneforms*, *Achromobacter, Acinetobacter, Escherichia, Flavobacterium, Micrococcus, Moraxella, Nitrobacter, Nitrosomonas, Plesiomonas, Pseudomonas, Salmonella* เป็นต้น (Chythanya, Karunasagar and Karunasagar, 2002; Oxley *et al*., 2002; Shakila *et al*., 2006)

ประโยชน์ของสมุนไพรต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จากหลายๆ ประเทศได้นำพืชสมุนไพรทั้งแบบสดและอบแห้ง หรือผ่านสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ มาทดลองเพื่อใช้ลดความเครียด ต้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ จึงมีการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำ มีรายงานว่าการใช้สมุนไพรในการควบคุมโรคในปลาและกุ้งประสบความสำเร็จอย่างดีในประเทศเม็กซิโก อินเดีย ญี่ปุ่น และไทย (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

สมุนไพรที่ใช้ลดความเครียดในสัตว์น้ำ

มีรายงานการใช้สมุนไพรที่ใช้ลดความเครียดในสัตว์น้ำยังมีน้อย เพราะส่วนใหญ่มุ่งไปที่การป้องกันรักษาโรคมากกว่า แต่มีรายงานว่าศึกษาใช้โกศก้านพร้าว (*Pictohiza kurroa*) ซึ่งมีฤทธิ์ในการลดความเครียดในกุ้ง และกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากตั้วอึ๋ง (*Rheum officinale*) ร้อยละ 0.1-0.2 ช่วยป้องกันความเครียดเครียดจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นได้ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

สมุนไพรที่ใช้รักษาโรคสัตว์น้ำ

มีรายงานการใช้สารสกัดจากพืชในการรักษาโรคระบาดในปลา เช่น ไวรัสที่เกิดโรคหูดปลา หรือโรคติดเชื้อปรสิตอื่นๆ เช่น เห็บระฆัง โรคที่เกิดจากปลิงใส โรคเห็บปลา เป็นต้น สำหรับในกุ้งยังไม่มียารักษาโรคติดเชื้อไวรัส จึงมีการใช้สารจากธรรมชาติเป็นกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการผสมลงในอาหาร เช่น การใช้สารสกัดจากพญายอในการช่วยป้องกันโรคหัวเหลือง อาหารผสมโกศก้านพร้าว สารสกัดหญ้าแพรก สารสกัดมะตูม สารสกัดบอระเพ็ด สารสกัดตำแย สารสกัดโสมอินเดีย สารสกัดขิง และสารสกัดจากหญ้าใต้ใบ ซึ่งมีฤทธิ์ลดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556) นอกจากนี้มีรายงานการใช้กระเทียมสดเพื่อรักษาโรคพยาธิกรีการีน และใช้กล้วยน้ำหว้าดิบ เปลือกมังคุด สับปะรด เพื่อรักษาโรคขี้ขาว เป็นต้น (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

สมุนไพรที่ช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน

สัตว์น้ำที่มีความแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันโรคสูงจะช่วยลดความเสี่ยงของการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคระบาดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา ได้แก่สารสกัดจากกะเพรา พันงู มะแว้ง สะเดา กระเทียม แพงพวย โรสแมรี และกะเม็ง สารสกัดจากโสมอินเดียหรือแอชวาแกนดา และจันทน์เทศ ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาเก๋า การเสริมสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรในอาหารเม็ด สำเร็จรูปเลี้ยงปลากะพงขาวสามารถเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดแดง การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและความต้านทานโรคจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ได้ สาหร่าย

สไปรูลิน่ามีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาทอง ปลานิล ปลากดอเมริกัน และปลาแซลมอน ขมิ้นชันและกระเทียมมีส่วนช่วยกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดในการจับกินสิ่งแปลกปลอมในปลายี่สกเทศ มีการใช้มะขามป้อม หญ้าแพรก และใบเสนียด ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันโรคและลดการติดเชื้อจุลินทรีย์ในปลาทอง สารสกัดจากน้ำและเอธานอลของสะเดา กะเพรา และขมิ้นชันช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในปลาทอง ขิงช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกินเชื้อโรคในเซลล์ปลาเรนโบว์เทร้าต์ มีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการผสมอาหารและการฉีดเข้าสู่ตัวปลาเพื่อช่วยกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เช่น การจับกินสิ่งแปลกปลอมหรือฟาโกไซโทซิส ไลโซไซม์คอมพลีเมนต์ เอนไซม์แอนติโปรเทียส (Antiprotease) เอนไซม์ไมอีโลเปอร์ออกซิเดส (Myeloperoxidase) อนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive oxygen species) อนุพันธ์ไนโตรเจนที่ว่องไว (Reactive nitrogen species) ปฏิกิริยาซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Respiratoryburstactivity) สารไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase) เอนไซม์กลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) และมีการศึกษาพบว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้ยังมีส่วนช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะด้วยโดยวัดจากแอนติบอดีไตเตอร์สารทำลายแบคทีเรีย ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของซีรั่ม (Hemagglutination) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคต่างๆ ของสัตว์น้ำ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายและสารพิษจะเป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นจึงต้องเสริมวิตามินหรือแร่ธาตุต่างๆ เพื่อต้านอนุมูลอิสระสมุนไพรบางชนิดเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารสกัดสมุนไพรจีนฮ้อชิ่งโอว ปลายี่สกเทศที่ได้รับอาหารผสมหญ้าพันงูขาวจะมีการสร้างอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxideanion production) และสารต้านทานแบคทีเรียในน้ำเลือดเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์จากพืชยังช่วยบรรเทาความเครียด ช่วยให้เจริญอาหาร เร่งการเจริญเติบโต เร่งการเจริญพันธุ์ การใช้โด่ไม่รู้ล้มและฮ้อสะพายควายผสมอาหารในอัตราส่วน 40 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของปลานิลได้

สารออกฤทธิ์และวิธีการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในสัตว์น้ำ

พืชสมุนไพรมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ไกลเซอไรซิน (Glycyrrhizin) สารลิควิริติน (Liquiritin) และกลาบริดิน (Glabridin, GLAB) รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน น้ำมันหอมระเหย ซาโปนิน และสารอะซาไดแรคติน ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูไก่และเซลล์ของคน สารสำคัญที่สกัดจากพืชจะกระตุ้นการทำงานภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและอาจจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ ไกลเซอไรซินมีฤทธิ์ป้องกันการอักเสบและสารต้านทานมะเร็ง ปลาหางเหลือง ที่ได้รับอาหารผสมไกลเซอไรซิน 50mg/kg จะมีการทำงานของคอมพลีเมนต์ที่ดีขึ้นและช่วยต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* นอกจากนี้ ไกลเซอไรซิน ช่วยในการเพิ่มเม็ดเลือดขาวในปลาเรนโบว์เทร้าต์ สารกลุ่มอะซาไดแรคติน ที่สกัดจากสะเดา มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำปลานิลที่ได้รับสารอะซาไดแรคตินจากเม็ดสะเดา มีภูมิคุ้มกันโรคที่ดีขึ้น ปลาหางเหลืองที่ได้รับอาหารผสมซาโปนินจากต้นสบู่จะมีภูมิคุ้มกันโรคที่ดีขึ้น (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

มีการทดลองใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น การฉีด การแช่ การให้กิน ทั้งแบบผ่านอาหารมีชีวิตและผสมลงในอาหาร การใช้สมุนไพรผสมอาหารเป็นวิธีที่ใช้ได้จริงเชิงปฏิบัติ เนื่องจากไม่ทำให้ปลาเครียดและสามารถให้กับปลาทุกขนาดใช้กับสัตว์น้ำจำนวนมากๆ ในเวลาสั้น การให้สารจากพืชสมุนไพรโดยการฉีดจะให้ผลที่ดีกว่าการให้โดยวิธีผสมอาหาร เนื่องจากสัตว์น้ำจะได้รับสารสำคัญและสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่า เช่น ปลานิลที่ได้รับสารสกัดบอระเพ็ด 6 – 60 มิลลิกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จะมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะสูงขึ้นและมีภูมิต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* แต่การฉีดนั้นจะต้องใช้แรงงานจำนวนมาก มักทำให้ปลาเครียดและไม่เหมาะสมสำหรับปลาที่มีขนาดเล็กกว่า 15 กรัม ส่วนการจุ่ม หรือแช่อาจจะเหมาะสมสำหรับปลาขนาดเล็ก เช่น ปลาทองแช่ในน้ำสะเดา กระเทียม กะเพรา และขมิ้นช่วยป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้ ในขณะที่ปลาไนที่จุ่มในสารสกัดสะเดาจะมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ปลายี่สกเทศที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากดอกแพงพวยจะมีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น ปลาหางเหลืองที่ได้กินอาหารผสมสารสกัดจาก *Quillaja saponin* มีภูมิคุ้มกันโรคที่สูงขึ้นเช่นกัน โรสแมรีสามารถใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* ในปลานิลได้ ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสกัดจากต้นกุยช่าย 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะมีการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F.columnarae* ต่ำกว่าปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมน้ำมันสกัดดังกล่าว ปลาเทร้าต์ที่ได้รับอาหารผสมขิง ผสมตำแย และกาฝาก จะมีความสามารถในการทำลายสิ่งแปลกปลอมดีขึ้น รวมทั้งเพิ่มการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้กุ้งแชบ๊วยที่ได้กินอาหารผสมสารสกัดจากสาหร่ายทะเลจะมีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *V.parahaemolyticus* กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมน้ำมันกระเทียมร้อยละ 5 จะมีภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นและมีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V.alginolyticus* อาร์ทีเมียผสมสารสกัดจากมะแว้ง โสม และฟ้าทะลายโจร ช่วยลดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* อย่างไรก็ตามการให้อาหารผสมพืชสมุนไพรเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการผสมอาหาร สารสำคัญอาจถูกทำลายโดยกรดและน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

การใช้สมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ

จากปัญหายาและสารเคมีตกค้างในสัตว์น้ำเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้นักวิจัยและเกษตรกรหันมาใช้พืชสมุนไพรเพื่อเป็นทางเลือกในการป้องกันโรคสัตว์น้ำ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556) การศึกษาการใช้สมุนไพรเพื่อเป็นแนวทางในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรส่วนใหญ่มีสรรพคุณทางยาและเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดการตกค้างซึ่งมีการรายงานถึงการนำสมุนไพรมาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้มีการรายงานว่ามีพืชสมุนไพรบางชนิด เช่น พญายอ สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส Yellow Head Baculovirus (YHB) ที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ หรือหญ้าใต้ใบสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำได้เช่นกัน ดังตารางที่ 2 อีกทั้งสมุนไพรยังมีความปลอดภัยสูงในกุ้งกุลาดำ (สถาพร ดิเรกบุษราคม และคณะ, 2540) นอกจากการใช้สมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียและไวรัสก่อโรคในกุ้งได้แล้ว ยังมีรายงานการใช้สมุนไพรในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ชลิดา ชมานนท์ และคณะ (2542) ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำพบว่า สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้งได้

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ

สมุนไพร	ชนิดสัตว์น้ำ	เชื้อก่อโรค	อ้างอิง
กระเจี๊ยบแดง คูณ	ปลานิล	*Aeromonas hydrophila* *Streptococcus agalactiae*	ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ (2548)
ทับทิม ชมพู่, มะคำไก่	ปลาดุก	*Aeromonas sobria*	ปวีณา วัดบัว และคณะ (2549)
ใบหูกวาง	ปลากัด	*Aeromonas hydrophila* *Pseudomonas* sp. *Edwardsiella tarda* *Plesiomonas shigelloides* *Enterobacter* sp. *Streptococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp.	วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อารีย์ชน (2549)
ลูกใต้ใบ	กุ้งกุลาดำ	*Vibrio parahaemolyticus*	ภัสสร สาทะสุข และคณะ (2540)
ใบท้องพันชั่ง	ปลา	*Saproligea parasitica*	ปรียา อุดมกุศลศรี และคณะ (2550)
ใบฝรั่ง	กุ้งกุลาดำ	แบคทีเรียที่แยกจากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค	เยาวนิตย์ คนยดล และคณะ (2541)
ขมิ้นชัน	กุ้งกุลาดำ	*Vibrio harveyi* *Vibrio* spp.	กิตติมา วานิชกุล และคณะ (2550)
เปลือกมังคุด	ปลา	*Staphylococcus aureus*	อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ และคณะ (2550)
กระเทียม	ปลาดุกผสม	*Aeromonas hydrophilla*	ร่วมฤดี พานจันทร์ และคณะ (2553)
เปลือกทับทิม ใบหูกวาง กระเทียมสด ใบชาเขียว ใบชะพลู	กุ้งก้ามกราม	*Aeromonas hydrophilla* *Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio harveyi*	Tummarongkongsatid A. and Rojtinnakorn J. (2007)
กระเพรา ใบฝรั่ง	ปลานิล	*Aeromonas hydrophilla* *Psidium guajava*	ชนกันต์ จิตมนัส (2556)

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์น้ำ

สมุนไพร	ชนิดสัตว์น้ำ	เชื้อก่อโรค	อ้างอิง
พญายอ	กุ้ง	Yellowhead virus (YHV)	ชนกันต์ จิตมนัส (2556)
โกศก้านพร้าว หญ้าแพรก มะตูม บอระเพ็ด ตำแย ขิง โสมอินเดีย หญ้าใต้ใบ	กุ้ง	White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือ White Spot Virus (WSV)	

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชัยพร สร้อยคำ และประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช (2552) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (*Campylobacter* spp.) ที่แยกได้จากไก่ในหลอดทดลองโดยนำพืช 60 ชนิด มาเตรียมสารสกัดหยาบด้วยวิธีการหมักใน Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 สารสกัดที่ผ่านการกรองนำไปทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ นำสารสกัดหยาบมาทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร Semisolid brucella agar พบว่ามีสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 6 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นามาทดสอบได้ทั้ง 10 ไอโซเลท ได้แก่ สารสกัดจากผลสมอไทย ผลมะขามป้อม ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสารภี ผลยอ และใบพลู สารสกัดจากผลสมอไทยให้ค่าเฉลี่ยของบริเวณใสกว้างที่สุด 22.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ (2550) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ข่า กระชาย กระวาน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเล โดยใช้วิธี Agar disc diffution assay พบว่า สารกัดจากสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ได้ดี และอีก 2 ชนิดไม่มีผลต่อการยับยั้ง มาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งโรคในสัตว์น้ำ

ศศิธร วุฒิวณิช (2547) การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Erwinia Carotovora* subs *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและผัก นำสารสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 14 ชนิด สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคด้วยวิธี Paper disc diffusion บนอาหาร Bouble layer NGA พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ได้แก่ สารสกัดจากผลสมอพิเภก (*Qurecus infectorial*), เปลือกผลทับทิม (*Panica granatum*), ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*), ผลสมอไทย (*Terminalia chebula*) และผลเบญกานี *(Quercus infectoria*) พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมและผลเบญกานี ก่อให้เกิดบริเวณการยับยั้งเห็นได้ชัดเจนที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm

รัชนี เต๋เอียดหยอ (2549) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดพืชสมุนไพรที่ใช้ 12 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิดได้แก่ *Listeria monocytogenes, Samonella typhi, Staphylococcus aures* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยใช้วิธี Disc diffution พบว่า สารสกัดพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดพืชสมุนไพร ซึ่งศึกษาอิทธิพลของปริมาณของแบคทีเรีย พีเอช และอุณหภูมิ พบว่า ปริมาณของแบคทีเรียมีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพร โดยสกัดด้วยสารเอทานอลของเบญกานี ผลกล้วยน้ำว้าและสีเสียดเทศสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 4 ชนิด ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/ml ได้หมดภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนผลของพีเอชและอุณหภูมิพบว่า สาสกัดสมุนไพรที่คัดเลือกมีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ที่ทดสอบเพียงเล็กน้อย

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ และคณะ (2547) สารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเป็นสารเหนียว สีเขียวปนน้ำตาล มีกลิ่นเฉพาะของพืช ในการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Stapphylococcus aureus* และ *S. epidermidis* และเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Trichopyton* และ *T. rubrum* ในการต้านสารสกัดพลูและน้ำมันพลู โดยวัดค่า ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) ด้วยวิธี Broth dilution method พบว่าสารสกัดพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ดีกว่าน้ำมันพลู และเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* มีความไวต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดทั้ง 2 มากกว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ (2550) จากการนำใบพลูแห้งบด 2 กลุ่ม คือ ใบพลูอายุการเก็บเกี่ยว 30 วัน และใบพลูอายุการเก็บเกี่ยว 50 วัน มาสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ เอทานอล ร้อยละ 0.1, กรดอะซิติกในเอทานอล ร้อยละ 1.0, กรดอะซิติกในเอทานอล พบว่าตัวทำละลายเอทานอลได้สารสกัดหยาบจากใบพลูแก่มากที่สุดคือร้อยละ 12.69 เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากทุเรียนกวน 3 ชนิด คือ *Aspergillus niger*, *Eurotium amstelodami* และ *Eurotium chevalieri* พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสามชนิดได้ เมื่อศึกษาความแตกต่างในการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบพลูทั้งสองกลุ่ม พบว่าการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา *E. amstelodami* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 100,000 ppm และ *E. chevalieri* ที่ความเข้มข้น 200,000 ppm มีความแตกต่างกันในด้านสถิต

ร่วมฤดี พานจันทร์ และคณะ (2553) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophilla* ในปลาดุกลูกผสม สารสกัดกระเทียมไทย และกระเทียมจีนจากตัวทำละลาย 2 ชนิด (เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และอะซิโตน) โดยวิธี Disk diffstion method พบว่า สารสกัดจากกระเทียมไทยที่ใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลายมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดีกว่าสารสกัดอื่น

ฐานิดา ศรีหาวงศ์ และคณะ (2550) การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่นในเนื้อไก่ โดยใช้ไก่อายุ 1 วัน จำนวน 200 ตัวแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยวิธีการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (FRAP assay) พบว่าเพรดนิโซโลนสามารถชักนำให้เกิดความเครียด ขณะที่การเสริมสมุนไพรมีประโยชน์ในการควบคุมความเครียด นอกจากนี้ยัง

ช่วยเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ ดังนั้นสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรมีบทบาทในการควบคุมสมดุลรีดอกซ์ของไก่เนื้อในสภาวะเครียดได้

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และคณะ (2549) ศึกษาศักยภาพของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 และเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด โดยวิธี Paper disc diffusion บนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) พบว่าสารสกัดจากใบหูกวางที่สกัดโดยใช้น้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าการใช้เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางที่สกัดด้วยน้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดใบหูกวาง เนื่องจากสามารถยับยั้งและกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดีและมีค่าความเป็นพิษต่อลูกปลากัดต่ำ

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ (2546) ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำและด้วยแอลกอฮอล์รวมทั้งสารสกัดใบคูนด้วยแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อทั้งสองได้ดี โดยกระเจี๊ยบแดงเนื่องจากเป็นพืชอาหาร ส่วนสารสกัดจากกล้วยพบว่ากล้วยมีฤทธิ์ต้านเชื้อทั้งสองน้อยมาก

ปวีณา วัดบัว และคณะ (2550) ผลของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก (*Areomonas sobria*) ที่สกัดด้วยน้ำและเอทนอลเข้มข้นรอยละ 70 จากพืชสมุนไพร 41 ชนิด พบว่าสกัดด้วยน้ำจากทับทิม ชมพู่ และมะคำไก่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้สูงที่สุดตามลำดับ

พรชัย โรจน์สิทธิ์ และคณะ (2548) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งทะเลป่วย ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีสาระสำคัญ Curcuminoid เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอด้วยวิธี Agar dilution method พบว่าสารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ

วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์สว่าง (2555) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด คือ สบู่ดำ ชุมเห็ดเทศ ฝรั่ง และพลู ที่ระดับความเข้มข้น 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *S.aureus* และ *E.coli* ทำการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion ตรวจผลด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของสารสกัดสมุนไพร ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดจากพลู ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์วงใสกว้างที่สุด 2.10 เซนติเมตร (ที่ระดับความเข้มข้น 1:1) รองลงมาคือ สารสกัดจากฝรั่ง ชุมเห็ดเทศ และสบู่ดำ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกว้างที่สุด 1.96, 1.46 และ 1.40 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* ได้ดีที่สุดคือสารสกัดจากฝรั่ง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกว้างที่สุด 2.16 เซนติเมตร (ที่ระดับความเข้มข้น 1:1) รองลงมาคือ สารสกัดจากพลู ชุมเห็ดเทศ และสบู่ดำ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกว้างที่สุด 1.50, 1.43 และ 1.40 เซนติเมตร ตามลำดับ

ปิยวดี เจริญวัฒนา (2550) ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดพลูในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยทำการด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ อาซิโตน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอาซิเตท และเอทานอล แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* A 748 โดยการทดสอบด้วยวิธีการ paper disc diffusion พบว่าสารสกัดพลูที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 500,000 พีพีเอ็ม ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา มีค่าของบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 19.5, 21.0, 22.5 และ 12.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา และคณะ (2552) ศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดด้วยเอทานอลของผักพื้นบ้านจำนวน 4 ชนิด คือ ย่านาง ติ้ว เม็กแพว และสาบเสือ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารต่อจุลชีพทดสอบ 8 ชนิด ด้วยวิธีการ Agar diffusion พบว่า สารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S.aureus*

ชนกันต์ จิตมนัส (2556) ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ โดยใช้สมุนไพรจำนวน 50 ชนิด ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ไกลเซอไรซิน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน แอนทราควิโนน น้ำมันหอมระเหย ซาโปนิน และสารอาซะไดแรคติน ซึ่งสารเหล่านี้มีสรรพคุณในการลดความเครียด เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ และสามารถให้ได้โดยการผสมอาหาร แช่และฉีด แต่ก็ไม่ควรให้สารมาเกิดไปเพราะจะทำให้ส่งผลเสียต่อสัตว์น้ำได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

การศึกษาทางด้านจุลชีววิทยา

1. ถุงพลาสติก
2. บีกเกอร์
3. ปากคีบ
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. จานเพาะเลี้ยง
6. ขวดรูปชมพู่
7. ก้านไม้พันสำลี
8. ห่วงเขี่ยเชื้อ
9. หลอดเพาะเชื้อพร้อมตะแกรง
10. ปิเปตต์
11. ขวดฝาเกลียว
12. ทิป ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
13. Mueller-Hinton agar (MHA)
14. Tryptic soy broth (TSB)
15. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)
16. Nutrient broth (NB)
17. Agar
18. ตู้ถ่ายเชื้อ (Larminar air flow; TELSTAR AV-100)
19. เครื่องชั่ง (Balance; METTLER TOLEDO PG 2002-S)
20. เครื่องผสม (Vortex mixer; KIKA Works MS1)
21. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave; TOMY SS-325)

เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคในกุ้งขาว

Vibrio harveyi

การติดตั้งระบบการเลี้ยงกุ้ง

1. เครื่องเติมอากาศ (Air pump)
2. หัวทราย (Air diffuser)
3. ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุน้ำ 250 และ 500 ลิตร
4. อาหารสำเร็จรูปชนิดจมน้ำ (บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ 9704S)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) (Sartorius, PP50, Germany)
2. เครื่องวัดคุณภาพน้ำแบบหลายพารามิเตอร์ (YSI-650MDS, Germany)
3. เครื่องวัดความเค็ม (Portable refactometer, China)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสมุนไพร

เตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร 5 ชนิด เอาเฉพาะส่วนที่เป็นใบที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร พลู ย่านาง รางจืด ชุมเห็ดเทศ มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วแช่ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงละเอียด เพื่อเตรียมการสกัดสารต่อไป ดังภาคผนวก ก ตามวิธีการของ วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก (2555)

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำส่วนที่เป็นใบสมุนไพรที่บดเป็นผงละเอียดแล้วจำนวน 100 กรัม มาทำการสกัดโดยใช้การแช่ในเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ในขวดสีชาเขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแยกตะกอนออก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งโดยการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ได้สารสกัดในรูปสารสกัดหยาบ (Crudc extract) แห้ง ชั่งน้ำหนักแล้วนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไป ดัดแปลงสัดส่วนตามวิธีการของ วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก (2555)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Vibrio harveyi* คัดแยกได้ตามภาคผนวก ค โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลือก 2-3 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับเชื้อแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^5 CFU/ml ในสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี Agar diffusion

ทำให้สารสกัดหยาบปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นผสมอาหาร TSA ที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส กับแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร เทในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้จนอาหารแข็ง ใช้สารสกัดสมุนไพรเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางบนจานอาหารวุ้น โดยให้มีระยะห่างระหว่างหลุม ไม่น้อยกว่า 22 มิลลิเมตร และห่างจากขอบของจานอาหารวุ้นไม่น้อยกว่า 14 มิลลิเมตร และปิดฝาจานอาหารวุ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 18 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส โดย Negative control ใช้เอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 Positive control ใช้ยาปฏิชีวนะ ตามวิธีการของร่วมฤดี พานจันทร์ และคณะ (2553)

การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี Agar dilution

ละลายสารสกัดในตัวทำละลายให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (Serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ในอาหาร TSA หลอมเหลว ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง หยดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารประมาณ 5 หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC ดัดแปลงจากวิธีการของอุดมลักษณ์ สุขอัตตะ (2550)

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกุ้งขาวต่อองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

หลังจากกุ้งขาวได้รับอาหารผสมสมุนไพร วันละ 4 มื้อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วใช้เข็มฉีดยาขนาด 23 Gauge เจาะเลือดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งขาวเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ดังนี้ การวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count; THC) การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเลือด (Blood glucose) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity) ตามวิธีการของกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543ข)

จำนวนเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count; THC)

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 23 Gauge เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ใน Microtube ใช้ Micropipette ดูดเลือดกุ้งมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Trypan blue 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด Microtube นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดโดยหยดลงในร่อง Haemacytometer แล้วทำการนับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้คำนวณเป็นเซลล์/มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้}}{0.1\ (\text{มม.})^3}$$

$$= \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \times 10^4 \text{ เซลล์/มิลลิลิตร}$$

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเลือด (Blood glucose)

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 23 Gauge เจาะเลือดที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Microtube จากนั้นเติมสารละลาย Trichloracetic acid เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด Microtube แล้วเติมเลือดกุ้งที่เจาะมาได้ลงไปผสมให้เข้ากันได้

ตะกอนสีขาว ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนใสมา 500 ไมโครลิตร ผสมกับ Color reagent 4.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 13 X 125 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยเติมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร ในหลอด Microtube ที่มีสารละลาย Trichloroacetic acid 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้สารละลายที่ได้ 500 ไมโครลิตร เติมลงไปในหลอดที่มี Color reagent 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เช่นกัน สำหรับสารละลาย Blank ใช้สารละลาย Trichloracetic acid เข้มข้นร้อยละ 3 จำนวน 500 ไมโครลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง ปริมาณน้ำตาลในเลือดคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาล} = \frac{\text{OD ตัวอย่าง X ความเข้มข้นของกลูโคส (100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)}}{\text{OD ของกลูโคส 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร}}$$

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity)

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 23 Gauge ดูดสารละลาย L-cysteine 200 ไมโครลิตร แช่เย็นไว้เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว เจาะเลือดกุ้งบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microtube ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย K-199 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์เม็ดเลือด ผสมเบาๆ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้ง ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม CAC buffer 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงที่ Amplitude 30 kHz เป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดตกตะกอน ดูดส่วนใส (Haemocyte lysate) ออกมาเติมสารละลาย Trypsin 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 13 X 125 มิลลิเมตร จากนั้นเติมส่วนใสที่ได้ลงไป 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 2 นาที จึงเติมสารละลาย CAC buffer 1.8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงทุก 2 นาที จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดลง สำหรับ Blank ใช้สารละลาย CAC buffer 200 ไมโครลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคำนวณจากสูตร

$$\text{คำนวณค่า Unit} = \frac{\Delta\text{OD สูงสุด}}{2 \quad \text{(Unit / นาที)}}$$

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส} = \frac{\text{ค่า Unit (Unit / นาที)}}{\text{ปริมาณโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือด (mg protein)}}$$

$$= \text{Unit / นาที / mg protein}$$

การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในกุ้งขาวที่อาหารผสมสมุนไพร (Challenge test)

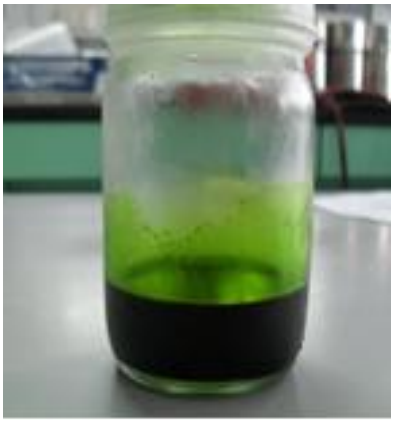
เมื่อกุ้งได้รับอาหารที่ผสมสมุนไพรนาน 4 สัปดาห์แล้ว ฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ประมาณ 10^7 CFU/ml เข้าบริเวณส่วนกล้ามเนื้อ บันทึกอัตราการรอดภายใน 1 สัปดาห์

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

นำใบสดของพืชสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร พลู ย่านาง รางจืด และชุมเห็ดเทศ ที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วมาฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 นาที และทำความสะอาดซ้ำอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดก่อนนำไปสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 1 สัปดาห์

จากนั้นกรองแยกตะกอนออกจะได้สารละลายสีเขียวเข้ม ไปทำแห้งโดยการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) มีลักษณะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดจากใบพลูจะมีลักษณะหนืด เหนียว มีสีเขียวบนน้ำตาล มีกลิ่นหอมของพลู ดังภาพที่ 16 สารสกัดจากใบรางจืด มีลักษณะหนืด เหนียว มีสีเขียวเข้ม ไม่มีกลิ่น ดังภาพที่ 17 สารสกัดจากใบย่านาง มีลักษณะหนืด เหนียว มีสีเขียวอมน้ำตาลอ่อน ไม่มีกลิ่นเช่นกัน ดังภาพที่ 18 สารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ มีลักษณะหนืด เหนียว มีสีเขียวอมน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเหม็นเขียว ดังภาพที่ 19 และสกัดจากใบฟ้าทะลายโจร มีลักษณะเป็นผงแห้ง มีสีเขียว มีกลิ่นเหม็นเขียว ดังภาพที่ 20 จากนั้นชั่งน้ำหนักสารที่สกัดได้ แล้วนำตัวอย่างที่สกัดหยาบเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 3



ภาพที่ 16 ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบพลู

ภาพที่ 17 ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบรางจืด

ภาพที่ 18 ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบย่านาง

ภาพที่ 19 ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศ

ภาพที่ 20 ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบฟ้าทะลายโจร

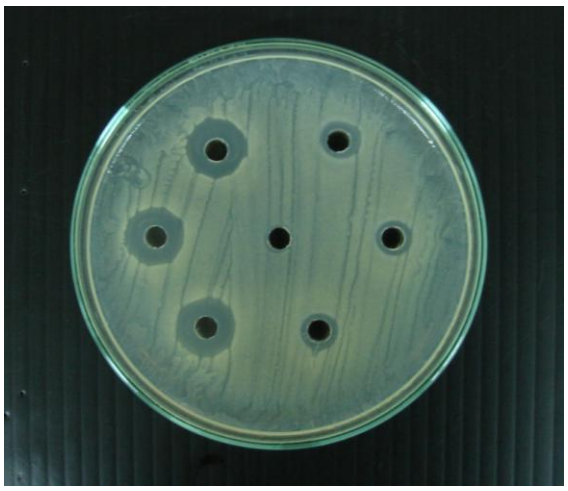
จากการสกัดสารจากใบพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร พลู ย่านาง รางจืด และชุมเห็ดเทศ โดยใช้ใบสมุนไพรสดมาอบแห้งจำนวน 200 กรัม พบว่าสามารถสกัดสารหยาบได้ 15.00, 13.67, 12.30, 9.24 และ 13.00 กรัม ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของสารสกัดที่ได้ 7.50, 6.84, 6.15, 4.62 และ 6.50 ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 โดยฟ้าละลายโจรสามารถสกัดสารได้มากที่สุด รองลงมาเป็นพลู ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และ รางจืด ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

สมุนไพร	สมุนไพรแห้งที่ใช้ (กรัม)	สารสกัดหยาบที่ได้ (กรัม)	ร้อยละของสารที่สกัดได้
ฟ้าทะลายโจร	200	15.00	7.50
พลู	200	13.67	6.84
ย่านาง	200	12.30	6.15
รางจืด	200	9.24	4.62
ชุมเห็ดเทศ	200	13.00	6.5

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี Agar diffusion

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบพืชสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยวัดจากค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการยับยั้งเชื้อ พบว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ดีที่สุด ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด

สารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ดีที่สุด คือ 2.33±0.22 เซนติเมตร รองลงมาเป็นฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด คือ 2.08±0.53, 1.74±0.04, 1.53±0.11 และ 1.22±0.09 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็น Negative control และใช้ยาปฏิชีวนะเตตระซัยคลิน เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น Positive control ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (เซนติเมตร) ของสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi*

สมุนไพร	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (เซนติเมตร)
ฟ้าทะลายโจร	2.08±0.53
พลู	2.33±0.22
ย่านาง	1.53±0.11
รางจืด	1.22±0.09
ชุมเห็ดเทศ	1.74±0.04

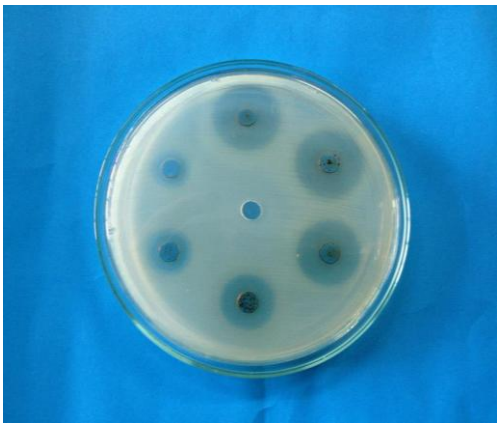
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยวิธี Agar dilution

จากการศึกษาเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* หรือ Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธีการเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (Serial 2-fold dilution) ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สามารถบันทึกค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ดังภาพที่ 22 – 25 พบว่า สารสกัด

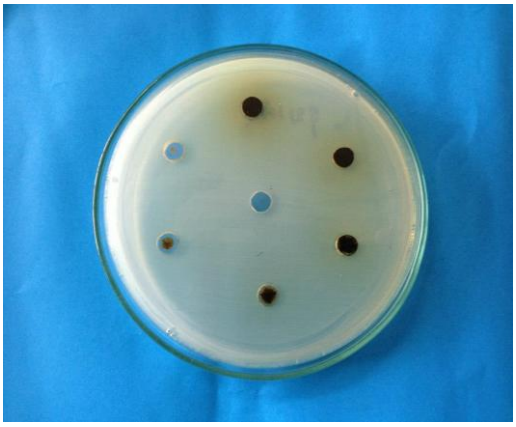
จากใบพลูมีค่า MIC ต่ำที่สุดคือ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดจากฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด คือ 12.50, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration) ของสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

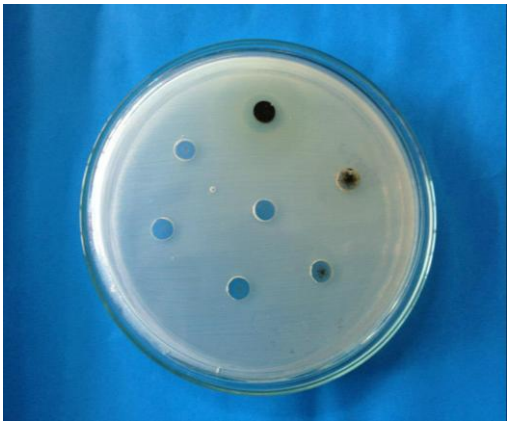
สมุนไพร	**ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**
ฟ้าทะลายโจร	12.50
พลู	6.25
ย่านาง	100
รางจืด	200
ชุมเห็ดเทศ	50



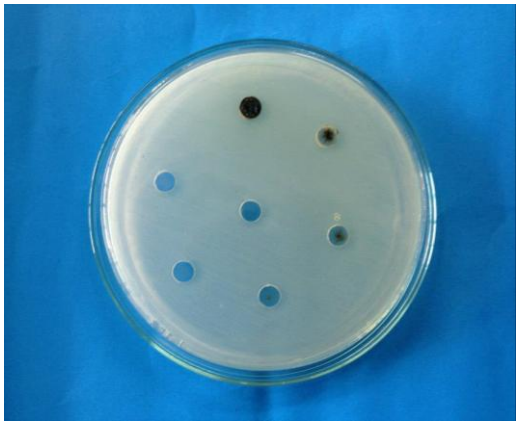
ภาพที่ 22 วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากพลู



ภาพที่ 23 วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากรางจืด



ภาพที่ 24 วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากฟ้าทะลายโจร



ภาพที่ 25 วงใสของการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* จากชุมเห็ดเทศ

จากค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลู ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับสมุนไพรชนิดอื่นๆ จึงเลือกสารสกัดจากใบพลูมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกุ้งขาวต่อองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน โดยการผสมสารสกัดลงในอาหารกุ้งขาวสำเร็จรูปทางการค้าต่อไป

การเตรียมอาหารเลี้ยงกุ้งขาว

โดยนำอาหารสำเร็จรูปทางการค้าชนิดจมน้ำ (บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ 9704S) คลุกผสมกับสารสกัดใบพลู ความเข้มข้นดังนี้ 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม โดยใช้เครื่องผสม สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อผสมลงไป อบให้แห้งแล้วเก็บในตู้เย็น ดังภาพที่ 26 – 27 จากนั้นส่งตัวอย่างอาหารที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารกุ้งขาว ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โดยทำการวิเคราะห์ค่าโปรตีน (Crude protein), ไขมัน (Crude fat), ความชื้น (Moisture), เถ้า (Ash) คาร์โบไฮเดรตและกากใย

(Carbohydrate) ในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว จากผลการวิเคราะห์ พบว่ามีค่าร้อยละ 32.35, 12.51, 9.40, 13.19 และ 32.55 ตามลำดับ ดังตารางที่ 6

ภาพที่ 26 การเตรียมอาหารกุ้งขาวโดยการผสมสารสกัดจากใบพลูกับอาหารกุ้งขาว

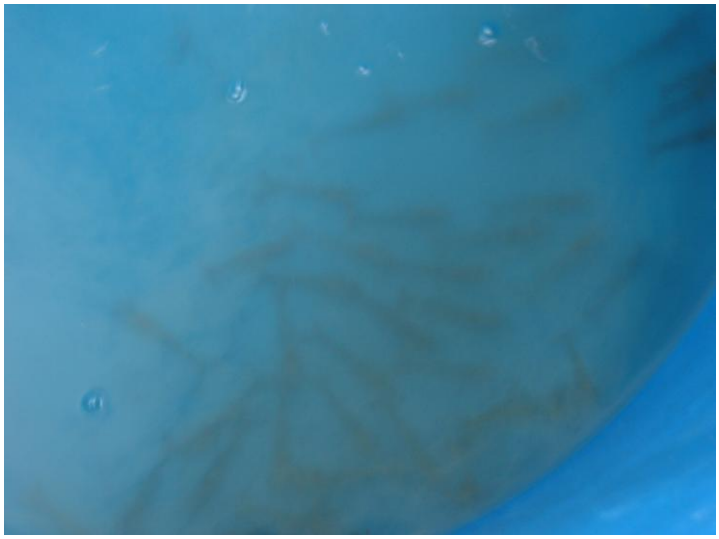
ภาพที่ 27 อาหารกุ้งขาวอบแห้งที่ผ่านการผสมสารสกัดจากใบพลู

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารกุ้งขาว

องค์ประกอบ	ร้อยละ	วิธีการวิเคราะห์
โปรตีน (Crude protein)	32.35	Kjeldal Method; AOAC 1990
ไขมัน (Crude fat)	12.51	Ether Extract; AOAC 1990
ความชื้น (Moisture)	9.40	Hot air oven; AOAC 1990
เถ้า (Ash)	13.19	Muffle furnace Combustion; AOAC 1990
คาร์โบไฮเดรตและกากใย (Carbohydrate)	32.55	100% - Proximate

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกุ้งขาวต่อองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

เตรียมกุ้งขาวทดลองที่ผ่านการตรวจคัดกรองโรค ได้แก่ โรคจากไวรัส และโรคจากแบคทีเรีย โดยให้กุ้งขาวกินอาหารสำเร็จรูปทางการค้า โดยปรับสภาพก่อนการเริ่มทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นให้อาหารที่ผสมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม โดยเลี้ยงกุ้งขาวอายุ 8 สัปดาห์ ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10 - 13 กรัม ในตู้ทดลองขนาด 250 ลิตร บรรจุน้ำความเค็ม 20 ppt ปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ถังละ 20 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ชุดควบคุมให้กินอาหารสำเร็จรูปทางการค้า ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลอง อายุ 8 สัปดาห์

แต่จากการทดลองเบื้องต้นพบว่ากุ้งขาวในชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากใบพลูไม่กินอาหารดังกล่าว เพราะอาหารกุ้งหลังจากการผสมสารสกัดจากใบพลูแล้วจะมีกลิ่นค่อนข้างฉุนของน้ำมันหอมระเหย และมีรายงานว่าสารประกอบหลักในน้ำมันพลูเป็นสารกลุ่มฟีนอลที่มีรสเผ็ด มีฤทธิ์ทำให้ปลายประสาทชา (วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก, 2555) จึงเป็นผลให้กุ้งไม่กินอาหารที่เตรียมสำหรับการทดลองจึงทำให้การทดลองไม่สามารถดำเนินการได้จนจบได้

บทที่ 5
สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. จากการสกัดสารด้วยเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 95 และทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ พบว่า ร้อยละของสารสกัดสูงสุด คือ ฟ้าทะลายโจร รองลงมา คือ พลู ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด ได้แก่ ร้อยละ 7.50, 6.84, 6.50, 6.15 และ 4.62 ตามลำดับ

2. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส พบว่า สารสกัดจากพลูสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด ได้แก่ 2.33±0.22, 2.08±0.53, 1.74±0.04, 1.53±0.11 และ 1.22±0.09 เซนติเมตร ตามลำดับ

3. ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration; MIC) ของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยวิธี Agar dilution พบว่า สารสกัดพลูมีค่า MIC ต่ำสุด รองลงมา คือ ฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด ได้แก่ 6.25, 12.50, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

4. จากการทดลองผสมสารสกัดพลูลงในอาหารกุ้งขาวสำเร็จรูปทางการค้า พบว่ากุ้งขาวไม่กินอาหารทดลองดังกล่าว จึงไม่สามารถศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในกุ้งขาวต่อองค์ประกอบเลือดและปัจจัยทางภูมิคุ้มกันได้

อภิปรายผลการวิจัย

1. ลักษณะของสารสกัดจากสมุนไพรที่ได้ทุกชนิดสอดคล้องกับการศึกษาของ ณิชากร เจริญกุล และคณะ (2547) ที่รายงานว่าสารที่สกัดได้เมื่อนำไประเหยแห้งแล้วจะได้สารมีลักษณะเหนียวหนืด มีสีเขียวปนน้ำตาล และมีกลิ่นตามชนิดของสมุนไพรแต่ละชนิด

2. จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โดยวัดจากค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส พบว่าสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ (อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ และคณะ, 2547; ประภาวดี ไพรินทร์ และคณะ, 2550)

3. สารสกัดจากใบพลูยับยั้งได้ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่าสารสกัดหยาบจากใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* เป็นต้น (อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ และคณะ, 2547; ประภาวดี ไพรินทร์ และคณะ, 2550) และสอดคล้องกับการศึกษาของวันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก (2555) รายงานว่าพลู ชุมเห็ดเทศ มีน้ำมันหอมระเหย เช่น ยูจีนอล (Eugenol), คาวิคัล (Chavical), ในใบพลู และยูจีนอล (Eugenol), แทนนิน (Tannin) ในใบชุมเห็ดเทศ ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, รา *Aspergillus flavus* เป็นต้น ปิยวดี เจริญวัฒนา (2550)

4. จากการทดลองเบื้องต้นพบว่ากุ้งขาวในชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากใบพลูไม่กินอาหารดังกล่าว เพราะอาหารกุ้งหลังจากการผสมสารสกัดจากใบพลูแล้วจะมีกลิ่นค่อนข้างฉุนของน้ำมันหอมระเหย และมีรายงานว่าสารประกอบหลักในน้ำมันพลูเป็นสารกลุ่มฟีนอลที่มีรสเผ็ด มีฤทธิ์ทำให้ปลายประสาทชา (วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก, 2555) จึงเป็นผลให้กุ้งไม่กินอาหารที่เตรียมสำหรับการทดลองจึงทำให้การทดลองไม่สามารถดำเนินการได้จนจบได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรปรับลดปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดพลูที่ผสมในอาหารกุ้งขาวลง และศึกษาปัจจัยทางภูมิคุ้มกันบางประการ ได้แก่ เม็ดเลือดรวม ปริมาณน้ำตาลในเลือด และวิเคราะห์ค่าเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส หลังจากกุ้งขาวได้รับอาหารผสมสารสกัดพลู เพื่อเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดสมุนไพรในการควบคุมโรคในสัตว์น้ำต่อไป

2. ควรเปลี่ยนจากการใช้สารสกัดจากพลูเป็นสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นแทนผสมในอาหารกุ้งขาว เช่น ฟ้าทะลายโจร ชุมเห็ดเทศ ย่านาง และรางจืด ตามลำดับ

3. ควรปรับวิธีการทดลองใหม่จากเดิมที่ผสมลงในอาหารให้กุ้งขาวกิน เป็นการแช่สารละลายลงในน้ำเลี้ยงกุ้งแทน แต่การทดลองดังกล่าวอาจไม่เหมาะสำหรับการเลี้ยงในบ่อดินเพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณที่สูง

4. ช่วงระยะเวลา 1 ปีที่ทำการศึกษางานวิจัยฉบับนี้ได้เกิดการระบาดของโรคกุ้งตายด่วน (Early Mortality Syndrome; EMS) ขึ้น จึงทำให้การหาตัวอย่างกุ้งขาวปลอดโรคที่ผ่านการคัดกรองโรคแล้ว สำหรับใช้ในการทดลองเลี้ยงซ้ำใหม่ทำได้ยาก เนื่องจากกรมประมงและฟาร์มเอกชนหยุดการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวชั่วคราว และด้วยเวลาอันจำกัดจึงไม่สามารถทำการทดลองได้จนเสร็จสิ้นตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงรอให้สถานการณ์โรคลดความรุนแรงลงแล้วจึงทำการศึกษาวิจัยใหม่อีกครั้ง

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง (2555). **คุณภาพน้ำที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงกุ้ง.** สืบค้นเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2555 จาก http://www.kasetonline.net/newsite/index.

กมลศิริ พันธนียะ. (2548). **ชีววิทยาของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)**. สืบค้นเมื่อวันที่ 18 เมษายน 2548. จาก http://www.shrimpcenter.com/t-shrimp051.html.

กิจการ ศุภมาตย์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และธนาวุฒิ กล่าวเกลี้ยง. (2543ก). สารการตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: II ผลของบีต้ากลูแคน (Macro Gard) ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ). 678-687.

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. (2543ข). **ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ.** วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ). 581-588.

กิติมา วานิชกุล, นนทวิทย์ อารีย์ชน และงามผ่อง คงคาทิพย์. (2550). **การใช้สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius.** ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

กรณ์กาญจน์ ภมรประวัติธนะ. (2553). **มหัศจรรย์ย่านางจากซุปหน่อไม้ถึงเครื่องดื่มสุขภาพ.** วารสารหมอชาวบ้าน. ปีที่ 31 ฉบับที่ 370 (กุมภาพันธ์ 2553): หน้า 36-40.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2541). **โรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ.** วารสารสัตว์น้ำ. 9, 93-94.

จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ, เจนจิตต์ คงกำเนิด, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และจิราพร เกสรจันทร์. (2553). **ประสิทธิภาพของน้ำมันกระเทียมในการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกุ้งขาว.** ในงานประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 7 เรื่องคุณภาพกุ้งไทยสู่อาหารปลอดภัยระดับโลก. โรงแรมทวินโลตัส นครศรีธรรมราช.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ภาวรยุติการต์ และวีณา เคยพุดซา. (2542). **การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ.** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา, เอกชัย ดำเกลี้ยง, พยุงศักดิ์ สุรินต๊ะ และวสันต์ ดีล้ำ. (2552). **ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันต้านออกซิเดชั่นและต้านจุลชีพของสกัดผักพื้นบ้าน**. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 5(2): 99-107.

ชัยพร สร้อยคำ และประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช. (2552). **ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Campylobacter* spp. ที่แยกได้จากไก่.** ในงานประชุมวิชาการแพทยศาสตร์ มข.ครั้งที่ 10.

ชนกันต์ จิตมนัส. (2556). ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. KKU Res.J.2013; 18(2): 257-269.

ฐานิดา ศรีหาวงศ์, สุนทรานี ทองใหญ่, สุภาพร อิสริโยดม, งามผ่อง คงคาทิพย์ และชนินทร์ ติรวัฒนวานิช. 2550. **ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่นในไก่เนื้อ.** ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาสัตว์และสัตวแพทยศาสตร์.กรุงเทพฯ

ณิชากร เจริญกุล, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, ประภัสสร รักถาวร, สิริพร ศิริวรรณ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. (2547). **การพัฒนาเจลทำความสะอาดมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดพลู (*Piper betle* Linn.)** ฝ่ายเทคโนโลยีพืชสมุนไพรเพื่อการอุตสาหกรรม สถาบันผลิตผลเกษตรฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เต็มดวง สมศิริ. (2555). **ฟ้าทะลายโจร.** สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง. สืบค้นจาก http://www.shrimpcenter.com/t-shrimp011.html. เมื่อวันที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2555.

ธิดาพร ฉวีภักดิ์, ชุติมา ขมวิลัย และลิลา เรืองแป้น. (2550). **ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเล.** สืบค้นจาก www.fisheries.go.th/cf-chan/Paper/seminar/.50/15di.htm. เมื่อวันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ. 2553.

นพดล ศุกระกาญจน์, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์. (2547). **การวิเคราะห์ความเสี่ยง: กรณีศึกษาการนำเข้ากุ้งขาวในประเทศไทย.** วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 27, 226-238.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร, สมโภชน์ วีระกุล, กิ่งกาญจน์ สาระชู และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. (2548). **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลป่วย.** การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 31 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.

ประภาวดี ไพรินทร์, ดวงพร พิชผล, นุชา สิมะสาธิตกุล, วีรศักดิ์ หลวงติ๊บ, ปิยะมาศ คงถึง และกรกฎ งานวงศ์พาณิชย์. (2550). **ผลการใช้สารสกัดหยาบจากใบพลูเพื่อป้องกันโรคท้องร่วงจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรระยะดูดนม.** The Thai Journal of Veterinary Medicine. 58(3), 1-11.

ปิยะวดี เจริญวัฒนา. (2007). **ประสิทธิภาพของสารสกัดพลูในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus*.** Agriculture Sci.J. 38(6).

ปรียา อุดมกุศลศรี, กมลชัย ตรงวานิชนาม, มาลินี ลิ้มโภคา, นฤมล กลางแก้ว และนภสร กู้สุจริต. (2541). **ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อโรค.** การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปวีณา วัดบัว, สินีนาฏ ศิริ, นิลุบล กิจอันเจริญ และประสาท โพธิ์นิ่มแดง. (2549). **สารสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก, *Aeromonas sobria*.** ในการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 32. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิต. กรุงเทพฯ.

ภัสสร สาทะสุข, เครือวัลย์ อ่อนทอง และสถาพร ดิเรกบุษราคม. (2540). **ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ.** การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มณฑกานต์ ทองสม. (2547). **แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เยาวนิตย์ คนยดล, สถาพร ดิเรกบุษราคม และชาญเดช วังสะวิบูลย์. (2541). **เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาสกัดจากใบฝรั่งและอ็อกเตตราซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ.** สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล กรมประมง.

ร่วมฤดี พานจันทร์, พงษ์กฤษณ์ ศิริสรณ์ และสมวิทย์ ผาพรม. (2553). **ฤทธิ์ของสารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophilla* ที่แยกได้จากปลาดุกผสม.** การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รัชนี คุณานุวัตน์. (2551). **ใบย่านางพืชสมุนไพรท้องถิ่น วิทยาอาชีพตระการพืชผลจับมาแปรรูป.** วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน วันที่ 15 เมษายน 2551 ปีที่ 20 ฉบับที่ 429.

รัชนี เต๋เอียดหยอ (2550). **การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดพืชสมุนไพรในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) แช่เย็น.** วิทยานิพนธ์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และนนทวิทย์ อารีย์ชน. (2549). **ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด.** การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วันทนี สว่างอารณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก. (2555). **การเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*.** วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ ปีที่ 12 (2).

ศศิธร วุฒิวณิช. (2547). **การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia Carotovora* subsp *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและผัก.** ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดสงขลา. (2557). โรคเรืองแสง. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 ตุลาคม 2557 จาก http://www.nicaonline.com/kungthaipage23.html

สถาพร ดิเรกบุษราคม, เครือวัลย์ อ่อนทอง, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ และนิพัทธ์ โชติการ. (2540). **ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ.** ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิริ ทุกข์วินาศ และชุติมา ขมวิลัย. (2545). **แนวทางการพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย.** วารสารการประมง. 55, 3.

สุภฎา คีรีรัฐนิคม, จรีพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, อภิญญา ส่งประดิษฐ์, นเรศ ช่วนชุก, วีรพงษ์ เทพอักษร และกิจการ ศุภมาตย์. (2543). **ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในน้ำทะเล.** วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ). 697-706.

อิทธกร ชลจรารักษ์. (2553). **หยุดแบคทีเรียก่อโรคกระเพาะด้วยฤทธิ์ใบพลู.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อาทินันท์ ประสมพงศ์. (2548). **เทคนิคการเลี้ยงกุ้งขาว หรือวานาไม.** สืบค้นเมื่อวันที่ 18 เมษายน 2548 จาก http://www.nicaonline.com/articles2/site/viewarticle.asp?idarticle

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, อุไรวรรณ ดิลกคุณาพันท์, ประภัสสร รักถาวร, สิริพร ศิริวรรณ และพจมาน พิศเพียงจันทร์. (2550). **การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจุลินทรีย์ของสาสกัดจากเปลือกมังคุด.** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ณิชากร เจริญกุล, ประภัสสร รักถาวร และสิริพร ศิริวรรณ. (2547). **ประสิทธิภาพของสารสกัดพลูและน้ำมันพลูในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังบางชนิด.** *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 วันที่ 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abrahama, T. J. and Palaniappan, R. (2004). **Distribution of luminous bacteria in semi-intensine penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India.** Aquaculture. 232, 81-90.

Bray, W. A., Lawrence, A. L. and Leung-Trujillo, J. R., (1990). **The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity.** Aquaculture 122, 133-146.

Chen, J. C., Lin, M. N., Ting, Y. Y. and Lin, J. N., (1995). **Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinities and temperature levels,** Comparative Biochemistry and Physiology. 110, 253-258.

Chythanya, R., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2002). **Inhibition of shrimp pathogenic Vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain.** Aquaculture. 208, 1-10.

Gabriel, A. G. and Felipe, A. V. (2000). **Infectious diseases in shrimp species with aquaculture potential. Recent Research Development Microbiology.** 4, 333-348.

Gomez-Gil, B., Tron-Maye, L., Roque, A., Turnbull, J. F., Inglis, V. and Guerra-Flores, A. L. (1998). **Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus* v*annamei*.** Aquaculture. 163, 1-9.

Graslund, S., Holmstrom, K. and Wahlstrom, A. (2003). **A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming.** Marine Pollution Bulletin. 46, 81-90.

Moriarty, D. J. W. (1999). **Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria.** *In* Proceeding of the 8th International symposium on microbial ecology. from http://ag.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia_shrimp/moriarty.PDF

Le Moullac, G. and Haffner, P. (2000). **Environmental factors affecting immune responses in crustacean,** Aquaculture. 191, 121-131.

Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. C. and Levy, P., (1998). **Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*.** Fish&Shellfish Immunology. 8, 621-629.

Muir, P. R., Sutton, D. C. and Owens, L. (1991). **Nitrate toxicity to *Penaeus monodon* protozoan**, Marine Biology. 108, 67-71.

Oxley, A. P. A., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. (2002). **Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguiensis*.** Journal of Applied Microbiology. 93, 214-223.

Shakila R. J., Saravanakumar, R., Vyla, S. A. P., Jeyasekaran, G. and Jasmine, G. I. (2006). **Antagonistic activity of the gut microflora Isolated from farmed tiger shrimp (*Penaeus monodon*).** Asian Fisheries Science 19, 247-255.

Steenbergen, J. F., Steenbergen, S. M. and Schapiro, H. C. (1978). **Effects of temperature on phagocytosis in *Homarus americanus***, Aquaculture 14, 23–30.

Tsai, S. and Chen, J. (2002). **Acute toxicity of nitrate on *Penaeus monodon* juveniles at different salinity levels.** Aquaculture. 213, 163-170.

Tseng, I. T. and Chen, J. C. (2004). **The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress,** Fish&Shellfish Immunology. 17, 325-333.

Tummarongkongsatid A. and Rojtinnakorn J. (2007). Effective of Thai herbs extracts to inhibit bacterial pathogena in Giant freshwater prawn. J.Fish.Tech.Res. 1(2):192-200.

Van de Braak, C. B. T. (2002). **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).** Doctoral Dissertation, Wageningen University, Netherlands.

Vargas-Albores, F., Baltazar, P. H., Clark, G. P. and Barajas, F. M., (1998). **Influence of temperature and salinity on the yellowlegs shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system.** Aquaculture. 29, 549-553.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมตัวอย่างใบสมุนไพรก่อนการสกัดสาร

เตรียมตัวอย่างใบพืช 5 ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร พลู ย่านาง รางจืด และชุมเห็ดเทศ ล้างทำความสะอาด แล้วแช่ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ดังภาพที่ 29-33 อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ดังภาพที่ 34 – 38 บดให้เป็นผงละเอียด ดังภาพที่ 39 เพื่อเตรียมสกัดสารโดยแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ดังภาพที่ 40

ภาพที่ 29 ใบพลูสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง

ภาพที่ 30 ใบชุมเห็ดเทศสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง

ภาพที่ 31 ใบรางจืดสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง

ภาพที่ 32 ใบฟ้าทะลายโจรสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง

ภาพที่ 33 ใบย่านางสดที่ผ่านการล้างและแช่ฆ่าเชื้อในสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 ก่อนการนำไปอบแห้ง

ภาพที่ 34 ใบพลูที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 35 ใบชุมเห็ดเทศที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 36 ใบรางจืดที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 37 ใบฟ้าทะลายโจรที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 38 ใบย่านางที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 39 สมุนไพรอบแห้งที่ผ่านการบดละเอียดก่อนการแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

ภาพที่ 40 สมุนไพรที่แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น ร้อยละ 95 นาน 1 สัปดาห์

ภาพที่ 41 ลักษณะสารสมุนไพรผ่านการกรองก่อนนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีสำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือด

1. สารละลาย Trypan blue

Trypan blue	0.15 กรัม
NaCl	0.6 กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Trypan blue 0.15 กรัม ในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 2.6 เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 2 ปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที กรองด้วย 0.2 μm Membrane filter เก็บในขวด Stock ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลาย M-199

M-199	1 ซอง
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	500 มิลลิลิตร
$NaHCO_3$	2.2 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลาย M-199 1 ซองในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (Deionize sterilized) 500 มิลลิลิตร เติม $NaHCO_3$ 2.2 กรัม ปรับ pH 7.6 กรองด้วย 0.2 μm Membrane filter เก็บในขวด Stock ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลาย K-199 เตรียม 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

M-199	50 มิลลิลิตร
Salt mixture	10 มิลลิลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	10 มิลลิลิตร
NaCl	10 มิลลิลิตร
L-Glutamine	1 มิลลิลิตร
Hepes	0.238 กรัม

วิธีการเตรียม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับ pH 7.6 กรองด้วย 0.2 μm Membrane filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย Cacodylate buffer (CAC buffer) เตรียม 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Na Cacodylate	1.07 กรัม
$CaCl_2$	0.37 กรัม
$MgCl_2$	5.08 กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	500 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Na Cacodylate 1.07 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เติม $CaCl_2$ 0.37 กรัม ปั่นให้ละลายเติม $MgCl_2$ 5.08 กรัม ปรับ pH 7.0

<u>หมายเหตุ</u> ไม่ต้องกรองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ห้ามใช้ KOH ปรับ pH เนื่องจากจะทำให้ตกตะกอน)

5. สารละลาย Salt mixture เตรียม 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

KCl	0.4 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	3 กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	3.3 กรัม
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.05 กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.9 กรัม
NaCl	11 กรัม
L-Glutamine	0.015 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองด้วย 0.2 µm Membrane filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลาย L-cystein ร้อยละ 3

L-cystein	0.03 กรัม
K-199	1 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง L-cystein 0.03 กรัม ใส่ใน K-199 1 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.6 กรองด้วย 0.2 µm Membrane filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมก่อนใช้เท่านั้น)

7. สารละลาย Trypsin

Trypsin	0.001 กรัม
Cacodylate buffer	1 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Trypsin 0.001 กรัม ละลายในสารละลาย Cacodylate buffer (CAC buffer) 1 มิลลิลิตร เขย่าจนกว่าจะละลายหมดกรองด้วย 0.2 µm Membrane filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้พ้นแสง (เตรียมก่อนใช้เท่านั้น)

8. สารละลาย 3, 4 Dihydroxyl-L-phenylalamine

L-DOPA	0.003 กรัม
Cacodylate buffer	1 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง L-DOPA 0.003 กรัม ละลายใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร เขย่าจนกว่าจะละลายกรองด้วย 0.2 µm Membrane filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้พ้นแสง

<u>หมายเหตุ</u> เนื่องจาก L-DOPA ละลายช้ามากจึงควรเตรียมครั้งละน้อยๆ และเตรียมก่อนใช้เท่านั้น

9. สารละลาย Folin reagent นำมาเจือจาง 1 ต่อ 10 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. สารละลาย Working alkaline copper solution ประกอบด้วย

1) $CuSO_4.5H_2O$ 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

2) NaKtatrate 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

3) ต้มน้ำกลั่นวางจนเย็นสนิท 100 มิลลิลิตร ใส่ NaOH 2 กรัม เมื่อละลายแล้วเติม Na_2CO_3 1 กรัม คนให้ละลาย ผสมทั้ง 3 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 50

11. สารละลาย Trichoroacetic acid ร้อยละ 3

Trichoroacetic acid	3 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Trichoroacetic acid 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

12. สารละลาย Color reagent

Thiourea	1.5 กรัม
Glacial acetic acid	94 มิลลิลิตร
O-toluidine	6 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Thiourea 1.5 กรัม ใส่ลงใน Glacial acetic acid 94 มิลลิลิตร เติม O-toluidine 6 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดทึบแสงแช่ในตู้เย็น

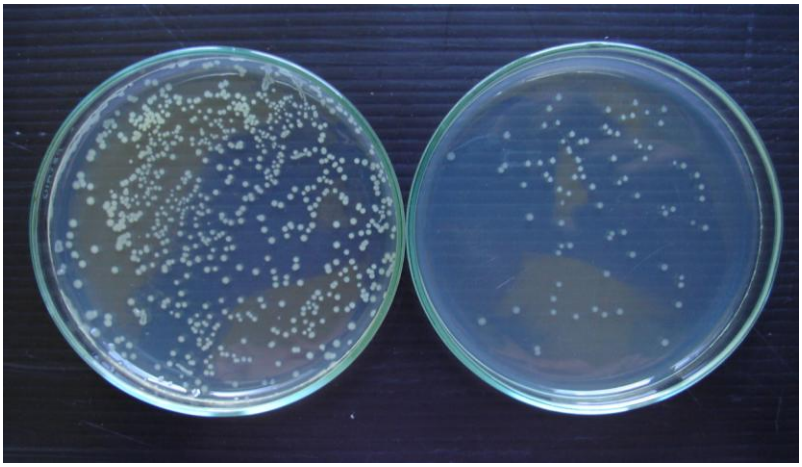
ภาคผนวก ค การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จากกุ้งที่เป็นโรคเรืองแสง

1. แยกตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) เติมเกลือความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เชื้อแบคทีเรียตกตะกอน ละลายตะกอนในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 วัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.5

2. การทดสอบความรุนแรงในการก่อโรค (Virulence test)

ฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จำนวน 0.01 มิลลิลิตร ในกุ้งขนาด 45-50 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้กุ้งเป็นโรคเมื่อกุ้งตายนำส่วนตับและตับอ่อนมาบดผสมในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วนำตับมาเขี่ยลงบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) เติมเกลือความเข้มข้นร้อยละ 2 บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จากอาหารแข็ง TSA ลงบนอาหารแข็ง Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) เพื่อแยกโคโลนีของแบคทีเรีย *V. harveyi* ออกมา



ภาพที่ 42 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บนอาหารแข็ง TSA หลังการคัดแยกแล้ว

ภาคผนวก ง ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ประกอบด้วย

Peptone	1.7 กรัม
Soya peptone	0.3 กรัม
Sodium chloride	0.5 กรัม
Potassium hydrogen phosphate	0.25 กรัม
Glucose	0.25 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ประกอบด้วย

Peptone	1.7 กรัม
Soya peptone	0.3 กรัม
Sodium chloride	0.5 กรัม
Potassium hydrogen phosphate	0.25 กรัม
Glucose	0.25 กรัม
Agar	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบลงในน้ำกลั่น ต้มให้วุ้นละลายแล้วใส่ในขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ประกอบด้วย

NaCl	2 กรัม
Beef extract	0.3 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบลงในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

NaCl	2 กรัม
Beef extract	0.3 กรัม
Peptone	0.5 กรัม
Agar	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบลงในน้ำกลั่น ต้มให้วุ้นละลายแล้วใส่ในขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ประกอบด้วย

Beef extract power	0.2 กรัม
Acid digest of casein	1.75 กรัม
Soluble starch	0.15 กรัม
Agar	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบลงในน้ำกลั่น ต้มให้วุ้นละลายแล้วใส่ในขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) ประกอบด้วย

Yeast extract	0.5 กรัม
Peptone	1 กรัม
Sodium citrate	1 กรัม
Sodium thiosulfate pentahydrate	1 กรัม
Trisodium citrate dehydrate	1 กรัม
Bile salt	0.8 กรัม
Sucrose	2 กรัม
Sodium chloride	1 กรัม
Iron(III)citrate	0.1 กรัม
Agar	1.5 กรัม
Bromothymol blue	0.004 กรัม

Thymol blue	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบลงในน้ำกลั่น ต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที