

การศึกษาสาเหตุการเกิดอาการจี้ขาวในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ

Study on the Causes of White Feces Syndrome in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Culture in Low Salinity Water

คำนำ

สถานการณ์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในขณะนี้ มีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จากข้อมูลสถิติการส่งออกกุ้งแยกตามชนิดของกรมศุลกากร ช่วงเดือนมกราคมถึงมิถุนายน ปี พ.ศ. 2548 พบว่ามีปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำเพียง 25,587 เมตริกตัน ลดลงถึง 49.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปี พ.ศ. 2547 ทั้งนี้เนื่องจากปัญหาการเลี้ยงที่ให้ผลไม่เป็นไปตามเป้าหมายจากความไม่แน่นอนของพ่อแม่พันธุ์ซึ่งต้องอาศัยจากธรรมชาติเท่านั้น ทำให้เกษตรกรจำนวนมากเปลี่ยนไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) แทน ซึ่งสัดส่วนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในขณะนี้ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ และเกษตรกรที่ยังคงเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องมีเป้าหมายเพื่อผลิตกุ้งขนาดใหญ่ระหว่าง 30-40 ตัวต่อกิโลกรัม เพื่อหลีกเลี่ยงกุ้งขนาดเล็กที่มีการผลิตออกมาจากการเลี้ยงกุ้งขาวซึ่งมีแนวโน้มสามารถเลี้ยงได้ขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ถ้าระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น ทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำถูกจำกัดให้อยู่ในเฉพาะการผลิตกุ้งขนาดใหญ่เท่านั้น

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ได้ขนาดใหญ่ต้องอาศัยลูกพันธุ์ที่ดี มีอัตราการปล่อยลูกกุ้งไม่หนาแน่นคือ 40,000-50,000 ตัวต่อไร่ และมีการจัดการระหว่างการเลี้ยงที่ดี โดยเฉพาะสามารถควบคุมให้พื้นที่บ่อสะอาดเป็นบริเวณกว้าง เพราะกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีพฤติกรรมอยู่ตามพื้นบ่อตลอดเวลา ถ้าพื้นที่บ่อสกปรกมีสารอินทรีย์ต่าง ๆ จำนวนมาก จะเป็นที่หมักหมมของเชื้อโรค ทำให้กุ้งกุลาดำอ่อนแอ มีการเจริญเติบโตช้า โอกาสป่วยเป็นโรคได้ง่าย อัตราการรอดตายต่ำและไม่สามารถเลี้ยงได้ขนาดใหญ่ตามที่ต้องการ ต้นทุนการผลิตจึงสูงขึ้น ต้องประสบปัญหาการขาดทุน (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ได้ขนาดใหญ่ ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงในพื้นที่ต่าง ๆ ที่พบบ่อย คือ กุ้งมีอาการตัวหวมและต่อมากุ้งมีอาการจี้ขาว ซึ่งที่ผ่านมามีหลายสาเหตุแต่ส่วนใหญ่จะเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (ชลอ, 2543) ในสภาวะเมื่อสภาพต่าง ๆ ในบ่อไม่เหมาะสมทำให้กุ้ง

อ่อนแอติดเชื้อแบคทีเรียและมีอาการจ้ำขาว ซึ่งปัญหาอาการจ้ำขาวจากแบคทีเรียมีมานานแล้วแต่แนวโน้มของปัญหาเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในเกือบทุกพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยเฉพาะการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ หลังจากมีการเลี้ยงกุ้งในระบบปิดเพื่อหลีกเลี่ยงการนำเชื้อโรคจากภายนอกเข้ามาในบ่อและเพื่อการรักษาสภาพแวดล้อมจากการลดปริมาณการถ่ายน้ำออกจากบ่อเลี้ยง (อนันต์, 2536) การแก้ไขปัญหาโดยการใชยาปฏิชีวนะในระยะแรก ๆ ได้ผลพอสมควรแต่ในปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่ นอกจากจะไม่ได้ผลในการรักษาแล้ว ยังมีโอกาสทำให้เกิดยาตกค้างมีปัญหาในการส่งออกด้วย ที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงของอาการจ้ำขาว ดังนั้นการแก้ปัญหาจึงไม่ค่อยได้ผลเท่าที่ควร การวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาชนิดของปรสิตตลอดจนแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดอาการจ้ำขาว เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการหาแนวทางสำหรับการป้องกันและลดปัญหาการเกิดอาการจ้ำขาวในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ใช้น้ำความเค็มต่ำต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสาเหตุการเกิดอาการจ้ำขาวในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ
2. เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวในบ่อที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำและในห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยสามารถแบ่งตามลักษณะการเลี้ยง ได้เป็น 3 ลักษณะ คือ

1. การเลี้ยงแบบธรรมชาติ หรือแบบดั้งเดิม (extensive) เป็นการเลี้ยงในบริเวณพื้นที่ป่าชายเลน บ่อมีขนาดใหญ่มากกว่า 25 ไร่ขึ้นไป ความลึกของน้ำน้อยกว่า 50 เซนติเมตร โดยจะได้ลูกกุ้งจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยตรง ลูกกุ้งจะเข้ามากับน้ำทะเล แล้วจะเก็บกักน้ำทะเลไว้ประมาณ 45-90 วัน เพื่อให้กุ้งเจริญเติบโตโดยกินอาหารธรรมชาติ การเลี้ยงแบบนี้จะไม่มีการให้อาหารสมทบ ผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงจึงขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของน้ำเป็นหลัก การเลี้ยงแบบนี้จะใช้ต้นทุนต่ำและให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ โดยผลผลิตที่ได้ประมาณ 30-60 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี การเลี้ยงแบบนี้จะมีปัญหาเรื่องโรคน้อย แต่มีข้อเสียคือ นอกจากลูกกุ้งที่เข้ามากับน้ำแล้ว ยังมีลูกปลาหรือลูกปูซึ่งเป็นศัตรูของกุ้งติดมาด้วย (บรรจง, 2521)
2. การเลี้ยงแบบพัฒนากึ่งหนาแน่น (semi-intensive) เป็นการเลี้ยงโดยมีการควบคุมปัจจัยการผลิตบางส่วน มีการปล่อยลูกกุ้งจากการเพาะฟัก เสริมกับลูกกุ้งธรรมชาติ มีการให้อาหารสมทบวันละ 2-3 ครั้ง ไม่มีการใช้เครื่องให้อากาศและสารเคมี มีการป้องกันและกำจัดศัตรูของลูกกุ้ง ใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 2-6 เดือน การเลี้ยงวิธีนี้ ทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และให้ผลผลิตต่อไร่มากขึ้น โดยผลผลิตที่ได้ประมาณ 80-240 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี
3. การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (intensive system) เป็นวิธีการเลี้ยงกุ้งที่พัฒนาขึ้นมา เริ่มมีการเลี้ยงตั้งแต่ปี 2524 (ประจวบ, ม.ป.ป.) การเลี้ยงแบบนี้จะมีการควบคุมปัจจัยการผลิตทั้งหมด ได้แก่ พันธุ์กุ้ง อาหารกุ้ง คุณภาพน้ำ เป็นต้น บ่อเลี้ยงมีขนาดประมาณ 3-6 ไร่ มีการปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงอย่างหนาแน่น (Clifford, 1985) ในอัตรา 25 ตัวต่อตารางเมตรขึ้นไป ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปและอาจเสริมพวกปลาสดหรือหอยสดสับละเอียด นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องให้อากาศ 1 เครื่องต่อพื้นที่ผิวน้ำ 1-2 ไร่ การเลี้ยงแบบนี้จะใช้เวลาเลี้ยงนานประมาณ 4-5 เดือน และผลผลิตที่ได้ประมาณ 1,000-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (Tacon, 2002)

อนันต์ (2536) ได้แบ่งการเลี้ยงกุ้งกุลาดำตามลักษณะการใช้น้ำ เป็น 3 รูปแบบ ดังนี้คือ

1. การเลี้ยงระบบเปิด เป็นการเลี้ยงโดยมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในปริมาณมากและบ่อยครั้ง ตามที่ต้องการ เพื่อควบคุม รักษาคุณสมบัติของน้ำ และแก้ไขปัญหาดังกล่าว ภายในบ่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง การเลี้ยงระบบนี้ จะอิงสภาพแวดล้อมภายนอกบ่อ อาจก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบการเลี้ยงถ้าคุณภาพน้ำภายนอกไม่ดี

2. การเลี้ยงระบบปิดหรือระบบที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำน้อย เป็นการเลี้ยงโดยการใช้กระบวนการต่าง ๆ ทั้งทางชีวเคมี และฟิสิกส์ ในการควบคุมรักษาคุณสมบัติของน้ำและการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ภายในบ่อระหว่างการเลี้ยง โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายน้ำ แต่มีการเติมน้ำเพื่อทดแทนส่วนที่ระเหย และรั่วซึม

3. การเลี้ยงในระบบหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ เป็นการเลี้ยงโดยการใช้กระบวนการต่าง ๆ ทั้งทางชีวเคมี และฟิสิกส์ ในการบำบัดน้ำที่ระบายออกมาจากบ่อเลี้ยง แล้วนำน้ำหมุนเวียนกลับมาใช้เปลี่ยนถ่ายในบ่อได้ตลอดระหว่างการเลี้ยง ชลอ และคณะ (2547) รายงานว่า การเลี้ยงกุ้งระบบนี้ จะแบ่งพื้นที่ออกเป็นพื้นที่บ่อเลี้ยง 40 เปอร์เซ็นต์ บ่อพักน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ คูน้ำจืดล้อมรอบ และพื้นที่ใช้สอยอื่นๆ อีก 20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเลี้ยงระบบน้ำหมุนเวียนจะช่วยลดปัญหามลภาวะแก่สิ่งแวดล้อม ประหยัดต้นทุนและป้องกันการเกิดโรคในระหว่างการเลี้ยงได้

พยุง (2546) รายงานว่าระบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในระยะแรก จะเป็นรูปแบบการเลี้ยงระบบเปิด มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดเวลา โดยเฉพาะในช่วงเดือนสุดท้ายของการเลี้ยง ถ้าในพื้นที่เลี้ยงไม่มีการระบาดของโรค เช่น โรคไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus) และไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus) กุ้งจะมีการเจริญเติบโตดี และให้ผลผลิตค่อนข้างสูง แต่ถ้าหากมีการระบาดของโรค การเลี้ยงระบบนี้จะมีความเสี่ยงสูง เนื่องจากเชื้อโรคจะสามารถแพร่กระจายไปยังบ่อเลี้ยงข้างเคียงอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก แต่ภายหลังเกิดปัญหาสถานะแวดล้อมเสื่อมโทรมและเกิดการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองในปี พ.ศ. 2533 และไวรัสดวงขาว ในปี พ.ศ. 2537 (จิราพร และคณะ, 2538) ทำให้การเลี้ยงกุ้งระบบเปิดมีโอกาสรับน้ำที่มีเชื้อจากภายนอกเข้าสู่ฟาร์มมากขึ้น จึงได้มีการนำการเลี้ยงแบบระบบปิดมาใช้โดยระหว่างการเลี้ยงจะไม่มี การเปลี่ยนระบายน้ำทิ้งตลอดระยะเวลาเลี้ยง แต่จะใช้น้ำที่เก็บไว้และผ่านการบำบัดทางชีวภาพ เพื่อเติมในบ่อเลี้ยงทดแทนน้ำส่วนที่ระเหย และรั่วซึมเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาระบบการเลี้ยง

แบบนําน้ำหมุนเวียนมาใช้โดยน้ำที่ระบายออกมาจากบ่อเลี้ยงทั้งหมดจะเก็บไว้ในบ่อพักน้ำที่มีการบำบัดโดยธรรมชาติ และจะนำมาใช้เปลี่ยนถ่ายในบ่อได้ตลอดระหว่างการเลี้ยง การเลี้ยงแบบนี้จะช่วยลดปัญหาการเกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อม และป้องกันการเกิดโรคในระหว่างการเลี้ยงได้

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยน้ำความเค็มต่ำ

เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบริเวณพื้นที่ความเค็มปกติ มักประสบกับปัญหาเรื่องโรคระบาดโดยเฉพาะโรคแบคทีเรียเรืองแสง ที่มีสาเหตุจาก *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำที่มีความเค็ม 10-30 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความรุนแรงจากโรคไวรัสดวงขาวและโรคไวรัสหัวเหลือง ที่เลี้ยงในพื้นที่ความเค็มต่ำจะน้อยกว่าการเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ความเค็มปกติ ทำให้พื้นที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยน้ำความเค็มต่ำเพิ่มมากขึ้นโดยในปี พ.ศ. 2542 ผลผลิตกุ้งกุลาดำของไทย ประมาณ 230,000 เมตริกตัน มาจากการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ (ชลอ, 2543)

รูปแบบการเลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำ

การเลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำ เป็นการเลี้ยงกุ้งในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 0-8 พีพีที โดยใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีความเค็มสูงระหว่าง 100-200 พีพีที มาเติมน้ำจืดจนได้ความเค็มต่ำตามต้องการ ชลอ (2543) รายงานว่า การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยน้ำความเค็มต่ำในประเทศไทยมีหลายรูปแบบคือ

1. ใช้น้ำจากแม่น้ำลำคลองที่มีความเค็มต่ำไม่เกิน 10 พีพีที ส่วนใหญ่จะเป็นพื้นที่อยู่ไกลจากปากแม่น้ำหรือเป็นการเลี้ยงในช่วงฤดูฝนที่น้ำในแม่น้ำลำคลองมีความเค็มต่ำ ในจังหวัดที่มีแม่น้ำสายใหญ่ ๆ จะมีการเลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำกันมาก และได้ผลผลิตสม่ำเสมอดีกว่าพื้นที่ริมชายฝั่งทะเลที่ใช้น้ำทะเลความเค็มปกติ มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงตามริมชายฝั่งแม่น้ำต่างๆที่อยู่ห่างไกลจากทะเลมากขึ้น

2. การเลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำแต่เป็นพื้นที่ซึ่งไม่ใช้น้ำที่มีความเค็มจากแม่น้ำลำคลอง ต้องมีการบรรทุกน้ำเค็มเข้าไปเติมในบ่อเลี้ยงกุ้งและผสมกับน้ำจืดจนได้ความเค็มต่ำ ระหว่างการเลี้ยงมี

การเติมน้ำจืดเข้าไปทดแทนน้ำที่หายไปเรื่อย ๆ จากการซึมและการระเหย การเลี้ยงกุ้งแบบนี้ มี 2 แบบ คือ

2.1 การปล่อยกุ้งลงในบ่อที่มีความเค็มประมาณ 5-6 พีพีที โดยเติมน้ำจืดเข้าไปในบ่อความลึกประมาณ 60-80 เซนติเมตร และเติมน้ำความเค็ม 100-250 พีพีที จนได้ความเค็มประมาณ 5-6 พีพีที

2.2 การปล่อยกุ้งในคอกที่กั้นด้วยผ้าพลาสติก ขนาดประมาณ 10x10 เมตร ลึกประมาณ 1 เมตร โดยเติมน้ำเค็มจากนาเกลือในคอกจนได้ความเค็มประมาณ 10 พีพีที ในขณะที่น้ำนอกคอกควรจะเติมน้ำเค็มจนได้ความเค็ม 2-3 พีพีที หลังจากปล่อยกุ้งลงในคอก จึงค่อยๆ ลดความเค็มของน้ำในคอกโดยปล่อยน้ำภายนอกคอกเข้ามาภายในคอกและระบายน้ำออกจากคอกอย่างช้าๆ ใช้เวลาลดความเค็มลงเรื่อยๆ ประมาณ 5-14 วัน ก็เปิดให้กุ้งออกไปอยู่กระจายทั่วบ่อ วิธีการแบบนี้เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย

โรคกุ้งกุลาดำ

ในอดีตการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจะเป็นการเลี้ยงแบบธรรมชาติ โดยเปิดประตูให้น้ำทะเลซึ่งมีลูกกุ้งตามธรรมชาติเข้ามาในบ่อเลี้ยงขนาดใหญ่ เนื่องจากปริมาณความหนาแน่นของลูกกุ้งมีน้อย ไม่มีการให้อาหารเสริม ปัญหาการเกิดโรคน้อยตามไปด้วย ต่อมาได้มีการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงแบบพัฒนาขึ้น มีการปล่อยลูกกุ้งที่ได้จากการเพาะฟักในอัตราความหนาแน่นสูง มีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปในระหว่างการเลี้ยง ทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น การเลี้ยงแบบพัฒนาถ้ามีการจัดการระหว่างการเลี้ยงที่ขาดประสิทธิภาพ เช่น อาหารเหลือมากเกินไปจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงและเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคทำให้คุณภาพน้ำในบ่อไม่ดีและเกิดโรคตามมาได้ (ชลอ, 2543) สำหรับโรคที่สำคัญในกุ้งกุลาดำได้แก่

1. โรคไวรัสดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

โรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำ มีรายงานว่าพบในแถบเอเชียในปี ค.ศ. 1992 และระบาดที่มลรัฐ Texas ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1995 (Nunan *et al.* , 1997) สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดในช่วงปลายปี พ.ศ. 2537 ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่จังหวัดสงขลา และจังหวัดตรัง

(จิราพร และคณะ, 2538) ปัจจุบันพบว่าการระบาดทุกพื้นที่โดยเฉพาะในช่วงฤดูหนาวระหว่างเดือนตุลาคมถึงมกราคม (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) การระบาดของโรคดวงขาวก่อให้เกิดความสูญเสียต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศอย่างมากและต่อเนื่อง ทั้งนี้ น่าจะเป็นสาเหตุจากการที่กุ้งสามารถรับเชื้อไวรัสได้ตลอดเวลา ดังจะเห็นได้ว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้ตั้งแต่ พ่อแม่พันธุ์ ลูกกุ้ง จนกระทั่งในบ่อเลี้ยง

สาเหตุของโรค เกิดจากเชื้อไวรัส WSSV ลักษณะของไวรัสชนิดนี้เป็น DNA ไวรัสสายคู่ (dsDNA) มีรูปร่างเป็นแท่ง (bacilliform morphology) (จิราพร และคณะ, 2538) ไม่มีเกราะโปรตีนหุ้ม (non-occluded) มีความยาว 250-280 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 110-120 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสประกอบด้วย nucleocapsid ขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 70 นาโนเมตร ซึ่งจะล้อมรอบด้วย trilaminar envelope การรวมตัวเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส เมื่อย้อมนิวเคลียสของเซลล์ที่มีอนุภาคไวรัสรวมอยู่ด้วยสี acridine orange พบว่านิวเคลียสย้อมติดสีเขียว

ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อดวงขาวพบการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ที่กำเนิดจากชั้น ectoderm และชั้น mesoderm ซึ่งได้แก่ ต่อม้ำเหลือง (lymphoid organ) อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เป็นต้น เซลล์ของอวัยวะดังกล่าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ที่ผิวชั้นนอก (cuticular epidermis) จะเกิดการเสื่อมสภาพ (degeneration) (Pantoja and Lightner, 2002; จิราพร และคณะ, 2540) เชื้อไวรัสดวงขาวจะมีการสร้างตัวอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสชัดเจน โดยนิวเคลียสของเซลล์ดังกล่าวจะขยายใหญ่ขึ้น (hypertrophy nuclei) และมีเส้นโครมาตินติดสีน้ำเงิน (basophilic) อยู่ล้อมรอบ นอกจากนั้นเมื่อการขยายของนิวเคลียสเพิ่มมากขึ้นจนเกือบจะเต็มเซลล์ พบว่าการติดสีจะเปลี่ยนไป โดยที่สีจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากแดง (acidophilic) เป็นสีน้ำเงินอ่อน (basophilic)

ลักษณะอาการของโรคที่เห็นชัดเจนคือ มีดวงสีขาวลักษณะเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บริเวณเปลือกหุ้มลำตัวโดยจะชัดเจนบริเวณส่วนหัว (carapace) และบริเวณลำตัวปล้องสุดท้าย (จิราพร และคณะ, 2538) กุ้งที่เป็นโรคจะว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำ และเกาะขอบบ่อ ไม่คิดตัว อ่อนแอ บางตัวจะลอกคราบไม่ออก ตัวที่ลอกคราบก็จะตัวนึ่ม กินอาหารลดลง กิจการ และ สิทธิ (2539) รายงานว่า การติดเชื้อไวรัสจะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งลดลง กุ้งจะ

ทยอยตายเรื่อย ๆ อัตราการตาย 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 4-5 วันหลังจากตรวจพบเชื้อ ในกรณีที่มีการจัดการบ่อที่ดีจะสามารถยืดอายุการตายไปได้ ใช้เวลามากกว่า 10 วัน มักพบกุ้งตายจำนวนมากบริเวณพื้นบ่อ

2. โรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus; YHV)

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งของไทยอย่างมาก เนื่องจากกุ้งจะมีอัตราการตายสูงในระยะเวลาอันรวดเร็วภายใน 2-5 วัน กุ้งที่ป่วยเป็นโรคนี้ส่วนมากมีอายุระหว่าง 20-35 วัน และ 50-70 วัน การระบาดของโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ มีรายงานว่าพบการระบาดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 ในแหล่งเลี้ยงกุ้งบริเวณภาคกลางรวมทั้งแหล่งเลี้ยงกุ้งบริเวณภาคตะวันออก และระบาดในภาคใต้ของประเทศไทย บริเวณ จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2535 (สิทธิ และคณะ, 2535)

สาเหตุของโรค เกิดจากเชื้อไวรัส YHV ซึ่งเป็น RNA virus สายเดี่ยว (ssRNA) รูปร่างเป็นแท่ง (bacilliform) เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไวรัส 40-50 นาโนเมตร และยาว 150-170 นาโนเมตร มีผนังหุ้ม (envelope) เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่ ความเค็ม 27-28 พีพีที มีชีวิตอยู่ได้ที่ pH 6-7 และทนต่อความร้อนสูงถึง 60 องศาเซลเซียส แต่จะถูกทำลายหมดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (สิทธิ และคณะ, 2535) สามารถพบการติดเชื้อได้ในบริเวณเหงือก ระบบต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด และ เม็ดเลือด นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่โน้มนำให้เกิดโรค ได้แก่ การจัดการคุณภาพน้ำภายในบ่อที่ไม่ดี เช่น การเตรียมน้ำไม่ดี น้ำมีการเปลี่ยนแปลงเสมอ การให้อาหารมากเกินไปในช่วงแรกทำให้พื้นบ่อมีการสะสมของของเสียมาก รวมถึงการนำน้ำจากภายนอกฟาร์มที่มีการระบาดของโรคโดยไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหรือมีพาหะนำเชื้อเข้ามาทำให้กุ้งเสี่ยงกับการติดเชื้อได้ง่าย

ลักษณะอาการของโรค กุ้งที่ป่วยมักจะกินอาหารเพิ่มมากขึ้นในระยะแรก หลังจากนั้นการกินอาหารจะลดลง และกุ้งจะเริ่มแสดงอาการป่วยโดยกุ้งจะเกาะขอบบ่อ อ่อนแอ ไม่คิดตัว ลำตัวจะซีด บริเวณส่วนหัวมีสีเหลืองชัดเจน เนื่องจากตับและตับอ่อน (hepatopancreas) บวมและมีสีเหลืองซีด เหงือกมักมีสีซีดหรือเหลือง กุ้งที่ป่วยจะทยอยตายอย่างรุนแรงและรวดเร็วภายใน 2-3 วัน และอัตราการตายประมาณ 70-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5 วัน หลังจากกุ้งเริ่มแสดงอาการ กุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองจะมีอัตราการตายที่สูงกว่าโรคอื่น ๆ (สิทธิ และคณะ, 2535)

3. โรค *Monodon baculovirus* (MBV)

มีการรายงานการเกิด MBV ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1981 (Lightner and Redman, 1981) ทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งทะเลกลุ่ม penaeid ในหลายประเทศตั้งแต่ ออสเตรเลียจนถึงประเทศในแถบอินโดจีน ได้แก่ ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จีน ไต้หวัน ศรีลังกา และอินเดีย ในตะวันออกกลางและแอฟริกา พบว่ามีรายงานในมาดากัสการ์ เคนยา แคมเบีย กูเวตและโอมาน นอกจากนี้ยังมีรายงานในเขตเมดิเตอร์เรเนียนเช่น อิสราเอล อิตาลี และตุรกี และยังพบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำที่นำเข้ามาในตาฮิติ ฮาวายและแถบอเมริกาใต้แก่ เม็กซิโก เอกวาดอร์ บราซิล เปอร์โตริโก และหลายรัฐในบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา (Lightner, 1996)

การติดเชื้อ MBV ในประเทศไทย พบว่า MBV เป็นไวรัสชนิดแรกที่พบในกุ้งกุลาดำ มีการรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1981 เชื้อ MBV ทำให้เกิดการตายของกุ้งอย่างมากร่วมกับการติดเชื้อโรคชนิดอื่น ๆ โดยพบในระยะเดือนแรกของการเลี้ยง ต่อมาจะพบการตายลดลง และพบว่าการติดเชื้อ MBV มีผลเพียงทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าลง ในประเทศไทยพบ MBV ในลูกกุ้งกุลาดำจากโรงเพาะฟักและกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน การตายของกุ้งที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส MBV ยังมีความรุนแรงไม่มากและไม่ชัดเจน นอกจากมีสาเหตุอื่นร่วมด้วย เช่น คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม การปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง พื้นบ่อสกปรก นอกจากนี้การมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวกุ้งอยู่แล้วก็อาจทำให้มีอัตราการสูญเสียเพิ่มขึ้นได้ และในปัจจุบันมีการยอมรับว่าลูกกุ้งที่ติดเชื้อ MBV มักจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตช้าแต่ถ้าการติดเชื้อ MBV เพียงเล็กน้อยจะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตมากนัก (ชลอ, 2543)

สาเหตุของโรค เกิดจากเชื้อไวรัส โมโนดอน แบคคิโลไวรัส ไทป์ เอ (monodon baculovirus type A) เป็น DNA virus double-strain ลักษณะเป็น rod-shape อยู่ในครอบครัว Baculoviridae (Lightner and Redman, 1977) สามารถทำลาย epithelial cell ได้ทั้งใน hepatopancreas และส่วน midgut (Belcher and Young, 1998)

อาการของโรค ในประเทศไทยโรค MBV เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอย่างมาก เนื่องจากเมื่อเลี้ยงกุ้งไปแล้วจะทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้า กุ้งจะตัวแคระแกร็น และมีอัตราการรอดตายต่ำ (Flegel *et al.* , 2004) ในอินเดียกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV มีอัตราการตายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Ramasamy *et al.* , 1994) ฉันทนา (2547) ทำการตรวจหาเชื้อไวรัส MBV ในลูกกุ้ง

กลูตาไธโอนระยะโพสลาว่า พบว่าลูกกึ่งกลูตาไธโอนที่เพาะมาจากแม่พันธุ์ที่จับมาจากธรรมชาติที่มีไข่แก่ พบเชื้อไวรัส MBV สูงถึง 80.45 เปอร์เซ็นต์ และลูกกึ่งกลูตาไธโอนระยะโพสลาว่าที่ติดเชื้อจะมีความยาวเฉลี่ยน้อยกว่าตัวที่ไม่มีเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความรุนแรงของไวรัส MBV นั้นมีปัจจัยของสภาพการเลี้ยงเป็นปัจจัยเสริม เช่น การเลี้ยงกึ่งที่มีความหนาแน่นสูง สภาพน้ำและการจัดการที่ไม่ดี เป็นต้น สาเหตุเหล่านี้จะทำให้ไวรัส MBV ก่อความรุนแรงมากขึ้นได้

วรินธา (2548) ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัส MBV และ HPV ตลอดจนความผิดปกติของต่อมน้ำเหลืองในกึ่งกลูตาไธโอน ผลการศึกษาพบว่า กึ่งกลูตาไธโอนขนาดเล็ก (3-4 เซนติเมตร) ในบ่ออนุบาลอายุ 49 วัน พบอัตราการติดเชื้อ MBV, HPV และ MBV ร่วมกับ HPV สูง และหลังจากย้ายไปเลี้ยงในบ่อใหม่ 2 บ่อ ระยะเวลาเลี้ยง 98 วัน พบอัตราการติดเชื้อ MBV ร่วมกับ HPV สูงในกึ่งกลูตาไธโอนขนาดเล็ก (5-6 เซนติเมตร) ทั้ง 2 บ่อ และก่อนจับขาย ระยะเวลาเลี้ยง 156 วัน ไม่พบการติดเชื้อ MBV แต่พบอัตราการติดเชื้อ HPV สูงในกึ่งกลูตาไธโอนขนาดกลาง (11-12 เซนติเมตร) และขนาดใหญ่ (16-17 เซนติเมตร) นอกจากนี้ยังพบว่าในกึ่งกลูตาไธโอนขนาดเล็กในแต่ละระยะเวลาเลี้ยงจะพบ MBV ร่วมกับ HPV มากกว่าการพบไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่ง และลักษณะการเกิด spheroid ของต่อมน้ำเหลืองของกึ่งขนาดต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาเลี้ยง 156 วัน พบว่าบริเวณของต่อมน้ำเหลืองที่มีการเกิด spheroid มากขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง แต่ไม่พบความแตกต่างในกึ่งกลูตาไธโอนที่มีขนาดแตกต่างกัน

4. ไวรัส HPV (Hepatopancreatic parvovirus)

ไวรัส HPV เป็นไวรัสที่พบในประเทศไทยมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 สามารถตรวจพบไวรัสครั้งแรกในลูกกึ่งที่อยู่ในระยะโพสลาว่า ก่อนที่จะถูกนำไปเลี้ยงในบ่อดิน ลูกกึ่งอาจติดไวรัสจากพ่อแม่กึ่งได้แต่ยังไม่ทราบว่าติดต่อผ่านทางไหน และพบว่าการติดตัวของไวรัส HPV สามารถติดต่อผ่านจากกึ่งตัวหนึ่งสู่กึ่งอีกตัวหนึ่งได้เฉพาะในระยะตัวอ่อน และระยะโพสลาว่า โดยจะไม่พบการติดตัวของไวรัสชนิดนี้ในกึ่งโตที่เลี้ยงในบ่อดิน (Chanratchakool, 2004)

สาเหตุของโรค เกิดจากเชื้อไวรัส HPV จัดอยู่ในกลุ่ม parvovirus มีลักษณะเป็น non-enveloped single-strand DNA virus มีรูปร่างแบบ icosahedral symmetry มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22-24 นาโนเมตร ลักษณะเด่นของไวรัส HPV คือ มี inclusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ตับ

และด๊ับอ่อน (intranucleus inclusion bodies) (Lightner, 1996; Lightner *et al.* , 1993; Osmond, 2003)

อาการของโรค ลักษณะของ HPV นี้จะพบในกุ้งแคะแกระแกร็นและอยู่อย่างหนาแน่นแต่ไม่เป็นสาเหตุทำให้กุ้งตาย (Flegel *et al.* , 1999) และยิ่งมีการติดเชื้อรุนแรงก็ยิ่งทำให้กุ้งมีขนาดเล็กลงมากขึ้น ในกรณีที่มียอัตราการตายสูงมักพบว่าการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน โดยมีการประมาณความสูญเสียภายในบ่อเลี้ยงหนึ่ง ๆ ว่า ถ้ามีกุ้งติดไวรัสชนิดนี้จำนวน 10 เปอร์เซนต์ ของกุ้งทั้งบ่อก็จะมีกุ้งแคะอยู่ภายในบ่อจำนวน 10 เปอร์เซนต์ พบว่าไวรัส HPV ส่งผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตของกุ้งมากกว่า ไวรัส MBV ซึ่งกุ้งที่ติดไวรัสจำนวนมากพบว่ามีน้ำหนักไม่เกิน 5 กรัม หลังจากการเลี้ยงไปแล้ว 4 เดือน กุ้งที่ติดเชื้อ HPV จะมีความยาวเฉลี่ยน้อยกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อถึง 2.5 เซนติเมตร (Flegel *et al.* , 2004)

5. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial diseases)

ชลอ (2543) รายงานว่า กุ้งป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียมักจะพบตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงตั้งแต่โรคตายเดือน ซึ่งอาจจะไม่มีอาการผิดปกติภายนอกเด่นชัด จนถึงกุ้งตัวสีแดงหรือกุ้งป่วยมีสีเข้มกว่าปกติ นอกจากนั้นการติดเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยๆ ในช่วงของการเลี้ยงเดือนท้ายๆ กุ้งที่ป่วยด้วยการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะในกลุ่ม vibrio (*Vibrio*) ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด อาการของกุ้งที่ป่วยที่ขึ้นมาอยู่ตามขอบบ่อ หรือลอยตามผิวน้ำมีตั้งแต่กุ้งตัวสกปรก มีตะกอนตามผิวหนัง กุ้งตัวสีส้ม จับคู่ตัวหลวม ตามลำตัวสกปรก หางมักจะกร่อน บางลักษณะจะพบว่าตามลำตัวจะมีจุดดำขนาดเล็ก บริเวณแผ่นปิดเหงือกจะบวม หรือตามเปลือกจะมีจุดขาวๆ ทั่วไป ลักษณะของกุ้งป่วยที่กล่าวไปแล้วนั้น เมื่อนำมาเช็ชเชื้อจากตับและด๊ับอ่อน หรือน้ำเลือด จะมีเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก ตับและด๊ับอ่อนมักจะมีขนาดเล็กลงกว่าปกติ กุ้งที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในลักษณะที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด ไม่สามารถที่จะทำการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากกุ้งในลักษณะอาการเหล่านี้มีการป่วยมาเป็นเวลานาน จนถึงระยะที่กุ้งไม่กินอาหารดังนั้นการรักษาจึงไม่ได้ผล

ปัญหาของโรคแบคทีเรียส่วนใหญ่มาจากการจัดการ สามารถแก้ไขได้โดยการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมทั้งภายในและนอกบ่อ ส่วนใหญ่แล้วเกิดจากการเลือกพื้นที่ไม่เหมาะสม ปล่อยกุ้งหนาแน่น ให้อาหารมากเกินไป ขาดการดูแลคุณสมบัติน้ำและสุขภาพกุ้ง โรคแบคทีเรียที่พบในกุ้งมักจะมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Vibrio* ได้แก่ *V. harveyi*, *V. penaeicida*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Nash *et al.* , 1992; Ishimaru *et al.* , 1995; Lightner, 1996) การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อ

Vibrio ยังไม่แน่นอนโดยเฉพาะเชื้อที่พบในเขตร้อน (Suwanto *et al.* , 1998; Bhat and Singh, 1998) โดยความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และลักษณะของเชื่อนั้นๆ รวมถึงความทนต่อความเค็ม (Vattanaviboon and Mongkolsuk, 2001)

5. 1 วibriโอ (Vibrio species)

ถิ่นกำเนิดของ *Vibrio* สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำเค็มและน้ำกร่อย เป็นสาเหตุของโรคกุ้งเกือบทุกชนิดที่พบในประเทศไทย *Vibrio* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม microflora พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นแบคทีเรียพอกฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) (Sindermann, 1990) มักพบร่วมกับเชื้อโรคชนิดอื่นๆ แต่บางครั้งก็เป็นสาเหตุของโรคเอง (Costa *et al.* , 1998; Goarant *et al.* , 2000; Harris and Owens, 1999)

การแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรียในห้วงปฏิบัติการซึ่งสามารถทำให้กุ้งป่วยเป็นโรคได้ โดยการฉีด เช้ หรือกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ (Gomez-Gil *et al.* , 1998; Saulnier *et al.* , 2000; Alday-Sanz *et al.* , 2002) ในธรรมชาติ และกุ้งที่เลี้ยงในบ่อจะได้รับเชื้อแบคทีเรียโดยผ่านทางน้ำ บาดแผล หรือกินอาหารที่มีเชื้ออยู่ การเกิดโรค vibriosis ในกุ้งกุลาดำจะใกล้เคียงกับกุ้งขาว แต่อัตราการตายในโรงเพาะฟักประมาณ 60-75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในบ่อดินประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุการตายที่สูงนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกิดจากการจัดการที่ไม่เหมาะสม

ลักษณะอาการทั่วไปของโรค ที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* เช่น กุ้งจะมีลำตัวสีแดง เหงือกแดงหรือน้ำตาล กินอาหารลดลง เชื่องซึม ลอยบริเวณผิวน้ำ มีอัตราการตายสูง โดยเฉพาะระยะ postlarvae และ juvenile กุ้งที่ลอยขึ้นจะง่ายต่อการจับกินของนกทะเล กุ้งเรืองแสงพบได้ทั้งในบ่อดินและในโรงเพาะฟัก ลักษณะอื่นๆ ได้แก่ มีรอยแผลดำที่เปลือกหรือเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อมีสี ขาวขุ่น เป็นต้น (Lightner, 1988 a; Lightner, 1996; Graindorge and Flegel, 1999)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งป่วย พบเชื้อ *Vibrio* จากอวัยวะภายในมีลักษณะเป็นท่อนติดสีน้ำตาล ขนาด 1.5-4.0x0.5-1.0 ไมครอน (Lightner, 1999) ในตับและตับอ่อน จะพบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวในท่อตับและลำไส้ สำหรับ systemic vibriosis ซึ่งเป็นการติดเชื้อในระบบต่างๆ ของร่างกาย จะพบการรวมตัวของเม็ดเลือดเป็น nodule กระจายอยู่ทั่วไป (generalized haemocytic nodules) ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อ

ช่วงอายุที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคและความเสี่ยง พบโรค vibriosis ในทุกช่วงเวลาของการเลี้ยง (Pitogo *et al.* , 1990; Lightner, 1988 b, 1996) ในระยะแรกพบการติดเชื้อ *Vibrio* ในโรงเพาะฟัก แต่หลังจากการเลี้ยงอย่างหนาแน่นในบ่อดินจะพบกุ้งป่วยเป็นโรคได้ทุกช่วงอายุ สำหรับความเสี่ยงของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับความเครียดที่กุ้งได้รับ แต่ในกรณีที่เชื้อแบคทีเรียมีความรุนแรงสูงสามารถทำให้เกิดโรคได้ (Pitogo and Pena, 1998)

5.2 โรคแบคทีเรียเรืองแสง (Luminescent disease)

โรคแบคทีเรียเรืองแสงพบทำให้เกิดปัญหาทั้งในบ่อเลี้ยงและโรงเพาะฟักลูกกุ้ง (Abraham and Palaniappan, 2003) โรคนี้ในบ่อดินพบมากในกุ้งอายุระหว่าง 1 ถึง 2 เดือน แบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) ทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งอย่างรุนแรง สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 1.2-4x0.3-1.0 ไมครอน เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา เป็นพวก halophile เป็นทั้ง aerobic และ anaerobic bacteria ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีของ oxidase test catalase test และ nitrate reductase เป็น positive เจริญบน TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose) ได้โคโลนีสีเขียว เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 1-6 เปอร์เซ็นต์ (สุมงกษ, 2540) มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ซึ่งการเรืองแสงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ luciferase (Prosser *et al.* , 1996) เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมาซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มีด เจริญได้ดีที่ความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที คุณสมบัติพิเศษของเชื้อคือสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH กว้าง คือ 6-9 และอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส มีความสามารถปรับตัวค่อนข้างดีได้ทุกสภาพการเลี้ยง ในน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

ลักษณะอาการ กุ้งที่ป่วยจะขึ้นมาอยู่ที่บริเวณริมบ่อ หรือลอยอยู่ตามผิวน้ำ ระวังกุ้งร่อนดำ ลำตัวมักมีสีเข้ม บางตัวลำตัวจะมีสีค่อนข้างแดง นอกจากนี้กุ้งที่ป่วยจะกินอาหารลดลง ตัวหลวม ตัวอืดเสป ตัวมีสีซีดลง เซลล์เหงือกตาย เวลากลางคืนจะเห็นการเรืองแสงที่หัวชัดเจน ถ้าติดเชื้อรุนแรงจะพบการเรืองแสงทั้งตัว และจะทยอยเกาะข้างตาย (กุลวรา, 2534; ชลอ, 2543)

ลักษณะทางพยาธิสภาพ เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจ โดยนำส่วนของตับและตับอ่อนหรือเลือด กุ้งมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40-100 เท่า จะพบแบคทีเรียรูปแท่งสั้น ๆ เคลื่อนที่ได้

เป็นจำนวนมาก ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งป่วย บริเวณส่วนตับและตับอ่อนนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรง พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวในตับและตับอ่อนตลอดจนบริเวณลำไส้ (Sung *et al.* , 2000)

6. โรคปรสิต

6.1 ซูโอแทมเนียม (Zoothamnium)

เป็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัว มีรูปร่างแบบระฆัง ตัวมีขนาด 2-3 ไมครอน มีซิเลีย (cilia) สำหรับการเคลื่อนไหว ซิเลียนี้จะอยู่ล้อมรอบบริเวณปาก มีก้าน (stalk) อันเดียวเชื่อมโยงเซลล์แต่ละเซลล์ไว้ด้วยกันและใช้สำหรับยึดติดกับวัตถุในน้ำ ก้านนี้สามารถยืดหดได้ ภายในก้านของเซลล์และโคโลนีมี myonemes ติดต่อกันตลอดเวลา เวลาหดตัวจึงหดลงทั้งโคโลนี (ประไพศิริ, 2546)

สาเหตุการเกิด *Zoothamnium* sp. เกิดจากมีตะกอนสะสมอยู่ตามพื้นบ่อ เนื่องจากการให้อาหารเกินความต้องการของกุ้ง รวมทั้งเกิดจากการที่แพลงก์ตอนในบ่อตายพร้อมกัน ทำให้มีการสะสมของซากแพลงก์ตอนเป็นจำนวนมาก ถ้าการวางตำแหน่งเครื่องให้อากาศไม่เพียงพอหรือการวางตำแหน่งเครื่องให้อากาศไม่ดีพอจะทำให้ตะกอนกระจายทั่วบ่อ และจะเป็นแหล่งขยายพันธุ์ของ *Zoothamnium* sp. เป็นอย่างดี *Zoothamnium* sp. ที่อยู่ตามตะกอนเหล่านี้ก็จะเข้าเกาะตัวและเหงือกกุ้ง (ชลอ, 2543)

ลักษณะอาการของกุ้งที่มี *Zoothamnium* sp. เกาะ สังเกตที่ผิวของลำตัวจะเห็นจุดเล็กๆ คล้ายทรายติดอยู่ ทั้งส่วนหัว และส่วนอกตลอดจนส่วนท้อง ลักษณะภายนอกจะมีสีน้ำตาลหรือคล้ำไม่สดใส บริเวณขาว่ายน้ำจะสกปรกเพราะหมกเลน ถ้าเป็นมากจะสังเกตได้ว่าฟูไปทั้งตัว ถ้าเข้าเหงือกเหงือกจะเป็นสีน้ำตาลคล้ายกับตะกอนหรือเส้นใยตามลำตัว ถ้ามีปริมาณมากกุ้งจะลอยบริเวณผิวน้ำ (ชลอ, 2543) ไม่ค่อยกินอาหารและตัวจะหลวม กุ้งจะอ่อนแอสามารถติดเชื้อโรคอื่น เช่น เชื้อแบคทีเรีย ได้ง่ายขึ้น

6.2 กรีการีน (Gregarina)

เป็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัว โดยเป็นปรสิตภายในช่องตัวของเจ้าบ้าน รูปร่างของกริการินมีหลายระยะ ส่วนหนึ่งของวงจรชีวิตจะมีรูปร่างประกอบด้วยสองส่วน ส่วนหัวเรียกว่า protomerite ปลายด้านหน้าเรียกว่า epimerite และส่วนหลังเรียก deutomerite มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ (ประไพศิริ, 2546) ขนาดของกริการินมีขนาดเล็กมากต้องใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงส่องดู ไปจนถึงขนาดใหญ่ ประมาณ 10 มิลลิเมตร ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การสืบพันธุ์ของกริการินมี 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ โดยการแบ่งตัวออกเป็น 2 ส่วน ซ้ำกันหลายครั้งหรือโดยการแตกหน่อ และการสืบพันธุ์แบบมีเพศ โดยเมื่อ sporadin มาต่อกันแล้วก็จะสร้าง cyst หรือ gametocyst มาหุ้ม sporadin ไว้ และแต่ละตัวก็จะสร้าง gamete จำนวนมาก หลังจากนั้น gamete จะจับกันเป็นคู่ ๆ แล้วเกิดเป็น zygote (Lom and Dykova, 1992)

วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ เมื่อหลุดออกจาก gametocyte จะเรียกว่า oocyte หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ sporozoite ซึ่งระยะนี้จะเข้าสู่เซลล์บุผนังในผนังลำไส้ ต่อจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ trophozoite และ trophozoite จะออกจากเซลล์บุผนังลำไส้มาเกาะอยู่กับผนังลำไส้และเข้าสู่ระยะ sporadin หรือ gamont ซึ่งจะหลุดจากการเกาะผนังลำไส้มาอยู่ในช่องลำไส้ ต่อจากนั้นจะจับคู่กันโดยต่อกันตามแนวยาวเรียกการอยู่ร่วมกันนี้ว่า syzygy เมื่อ sporadin ทั้งคู่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วก็จะสร้างเชื้อหุ้ม เรียกว่า gametocyte หุ้มทั้งคู่ไว้จากนั้นภายใน cyst จะมีการปฏิสนธิกันของ gamete จำนวนมาก เกิดเป็นไซโกต (zygote) ซึ่งต่อมาจะมีการพัฒนาและหลุดออกจากตัวเจ้าบ้าน ซึ่งก็จะถูกกินโดยเจ้าบ้านตัวกลาง (intermediate host) (บพิธ, 2546) เช่น โพลีคีต (polychaete worm) ที่อยู่ตามพื้นบ่อกุ้ง (*Polydora cirrhosa*) หรือหอยสองฝาบางชนิด เมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารของเจ้าบ้านตัวกลาง กระบวนการสร้างสปอร์ (sporogony) ก็จะเกิดบริเวณเยื่อบุผิวของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ สปอร์โรซิสต์ (sporocysts) ที่สร้างขึ้นจะถูกปล่อยออกมาจากหอยและหนอนเหล่านี้พร้อมกับอุจจาระและก้นก็จะติดเชื้อโดยการกินอุจจาระที่มีสปอร์เหล่านี้เข้าไป

กริการินจะเป็นอันตรายกับกุ้งเนื่องจากจะมีส่วนที่เรียก epimerite ยึดเกาะและทำลายผนังลำไส้ทำให้ระบบทางเดินอาหารเป็นแผล สามารถพบ trophozoite ของกริการินตามส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารกุ้ง เช่น midgut anterior midgut caecum ท่อของตับและตับอ่อน กระเพาะอาหาร ส่วนท้าย หรือลำไส้ส่วนต้น ถ้ามีกริการินเกาะจำนวนมากจะสังเกตเห็น midgut มีสีค่อนข้างเหลือง โดยลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในบริเวณที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงจะพบว่าชั้น midgut mucosa จะหดตัวลง เยื่อบุผิวของ midgut จะเพิ่มจำนวนผิดปกติ (hyperplasia) ทำให้เกิดลักษณะการยึดตัว

ของเยื่อผิวเป็น villus-like fold เป็นจำนวนมากและเยื่อของ midgut mucosa จะมีลักษณะเป็นรูปพรุน (Overstreet, 1973)

7. โรคจี้ขาว

อาการจี้ขาวสามารถพบได้ทุกช่วงของการเลี้ยง แต่มักพบในกึ่งอายุประมาณ 60 วัน (ชลอ, 2543) การเกิดจี้ขาวดูเหมือนจะก่อความเสียหายไม่รุนแรงและไม่ทำให้เกิดการตายของกึ่งจำนวนมากเหมือนโรคไวรัสดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง โดยพบว่ากึ่งในบ่อจะทยอยตายแต่อัตราการตายจะน้อยมาก เนื่องจากกึ่งที่เป็นจี้ขาวเป็นกึ่งที่มีความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร อาจมีการอักเสบของลำไส้เนื่องจากการติดเชื้อหรืออาจมีสารพิษบริเวณลำไส้ การติดเชื้อในทางเดินอาหารทำให้เกิดปัญหากับการย่อยและการดูดซึมอาหารไปใช้ประโยชน์ กึ่งที่เป็นจี้ขาวจะกินอาหารลดลง ตัวที่ติดเชื้อรุนแรงจะไม่กินอาหาร ทำให้ตัวหลวม เวลาลอกคราบเปลือกจะไม่แข็งและอาจถูกกึ่งตัวที่แข็งแรงกิน (พรชัย, 2546) เกษตรกรจะสังเกตได้ว่าบ่อที่มีอาการจี้ขาวกึ่งจะกินอาหารไม่เพิ่มขึ้น อาจกินเพิ่มเล็กน้อยแต่ก็จะกลับมากินลดลงอีก จากการที่กึ่งกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารจะเป็นปัญหากับการรักษาโดยการผสมยาปฏิชีวนะเพราะกึ่งจะไม่ได้รับยาหรือได้รับปริมาณน้อยซึ่งไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อ ยิ่งทำให้ความรุนแรงของอาการจี้ขาวเพิ่มขึ้น บ่อที่มีจี้ขาวจะทำให้ผลผลิตน้อยลง และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) จะสูง

สาเหตุของอาการจี้ขาว ยังไม่มีรายงานยืนยันชัดเจนว่าเกิดจากสาเหตุใด ชลอ (2543) รายงานสาเหตุการเกิดจี้ขาวไว้ว่า ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการที่กึ่งกินอาหารที่มีไขมันมากเกินไป เมื่อถ่ายออกมาจะมีจี้เป็นสีขาว อันเนื่องมาจากมีก้อนไขมันอยู่เป็นจำนวนมาก อีกสาเหตุหนึ่ง อาจมาจากโรคได้แก่ โรคที่เกิดจากโปรโตซัวบางชนิด เช่น กรีการินหรือแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย จะมีผลทำให้ลำไส้ตอนบนของกึ่งอักเสบ กึ่งที่ป่วยจะมีอาการดังนี้คือ กึ่งจะกินอาหารลดลง ตัวพอม อ่อนแอ จะสังเกตเห็นจี้เป็นเส้นสีขาวลอยอยู่บริเวณท้ายลม หรืออยู่ในข่อยซึ่งในจี้จะไม่มีอาหารอยู่เลย ถ้าเป็นรุนแรงจะไม่กินอาหาร ชลอ และ พรเลิศ (2547) รายงานว่า การเกิดอาการจี้ขาวมักจะมีความสัมพันธ์กับสภาพพื้นบ่อที่ไม่ดี อาจจะเนื่องมาจากการเตรียมบ่อที่ไม่เหมาะสมหรือการจัดการระหว่างการเลี้ยงไม่ดีพอ ฟาร์มที่ไม่มีปัญหาอาการจี้ขาวจะมีการเตรียมบ่อและจัดการพื้นบ่อในระหว่างการเลี้ยงที่ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มีอาการจืดขาวและยังมีชีวิตจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจำนวนทั้งหมด 9 ฟาร์ม ดังนี้ ในพื้นที่อำเภอ บางแพ จังหวัดราชบุรี 1 ฟาร์ม อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม 1 ฟาร์ม อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม 2 ฟาร์ม อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี 1 ฟาร์ม และ อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี 4 ฟาร์ม โดยแต่ละฟาร์มจะเก็บกุ้งจำนวน 60 ตัว นำกุ้งที่ยังมีชีวิตมาศึกษาในห้องปฏิบัติการดังนี้

1. การศึกษาชนิดของปรสิต

นำกุ้งตัวอย่างที่มีอาการจืดขาวฟาร์มละ 25 ตัว ทำการตรวจหาชนิดของปรสิตภายนอกและปรสิตภายในลำไส้

1.1 ตรวจหาชนิดของปรสิตภายนอก โดยตัดเหงือก ส่วนปลายขาว่ายน้ำ แขนหาง วางบนสไลด์ที่มีหยดน้ำเกลือหรือน้ำธรรมดา จากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีของ Brock and Main (1994)

1.2 ตรวจหาชนิดของปรสิตภายในลำไส้ โดยผ่าหลังกุ้งแล้วดึงลำไส้ออกมาวางในจานแก้วที่มีน้ำอยู่ จากนั้นรีดขี้น้ำออกจากลำไส้จนหมด ทำการกวนน้ำในจานแก้วแล้วดูครีบน้ำวางในแผ่นสไลด์ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

1.3 การจำแนกชนิดของปรสิต ปรสิตที่ตรวจพบจะบันทึกรายละเอียดและจำแนกชนิดโดยจำแนกตามหลักอนุกรมวิธาน ของ Kudo (1977) Levine *et al.* (1980) และ Farmer (1980)

2. การศึกษาและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

นำกึ่งตัวอย่างที่มีอาการจี่ขาวฟาร์มละ 15 ตัว มาแยกและทำเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้ เข็ม ขนาด 26 Gx1/2 นิ้ว และกระบอก syring ขนาด 1 มิลลิลิตร คูดน้ำเลือดกึ่งมาเพาะเชื้อลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) ที่เติมเกลือแกง 0.5 เปอร์เซนต์ และ Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่มีเป็น จำนวนมากมาทำ sub-culture จนได้โคโลนีชนิดเดียวเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดในการจำแนกชนิด ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 E

3. การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคจี่ขาวที่ทำให้กึ่งกุลาดำที่เลี้ยงในพื้นที่ ความเต็มต่ำตายครั้งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (96 ชั่วโมง LD₅₀)

3.1 การเตรียมการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง นำกึ่งกุลาดำน้ำหนัก 8-12 กรัม ซึ่งได้จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งกุลาดำ ในพื้นที่ความเต็มต่ำ มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 45x100x45 เซนติเมตร ซึ่งได้เตรียมน้ำความเต็ม 5-10 ลิตร ปริมาตรตู้ละ 100 ลิตร ให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องให้อากาศและพักไว้อย่างน้อย 1-2 วัน ก่อน นำกึ่งมาใส่ลงในตู้ที่ใช้ทดลองตู้ละ 10 ตัว ให้อาหารเม็ดวันละ 3 ครั้ง ถ่ายน้ำและคูดตะกอนทุกวัน เพื่อปรับสภาพกึ่งให้ชินกับสภาพการทดลองประมาณ 1 สัปดาห์

การเตรียมแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่แยกได้จากการทดลองที่ 2 ซึ่งเก็บใน stock ใน TSA slant มาทำ sub-culture ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการ ย้อมสี gram stain จากนั้นนำไปเพาะลงบนอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) + เกลือ 0.5 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปเขย่าเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นให้ แบคทีเรียตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำเกลือ 1 เปอร์เซนต์ ปั่นให้ตกตะกอนอีกครั้งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าว มาทำสารละลาย

แบคทีเรีย โดยการเจือจางด้วยน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดความขุ่นสารละลายแบคทีเรีย (optical density, O.D.) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จะได้ค่า O.D. stock หลังจากนั้นทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียที่ได้ด้วยน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อปรับให้สารละลายแบคทีเรียมีค่า O.D. ที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการ โดยคำนวณจากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ นำแต่ละระดับสารละลายแบคทีเรียมาศึกษาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี standard plate count ด้วย drop plate technique และทำ standard curve ระหว่างค่า O.D. และจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

3.2 การดำเนินการทดลอง

การทดลองขั้นต้น (preliminary test) เป็นการทดลองเพื่อหาปริมาณของแบคทีเรียในช่วงกว้าง ๆ ที่อยู่ระหว่างระดับต่ำสุดที่ทำให้กุ้งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสูงสุดของแบคทีเรียที่ไม่ทำให้กุ้งตายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้เข็มขนาด 26 Gx1/2 นิ้ว และกระบอก syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายแบคทีเรียเข้าทางกลัมนี้อด้านข้างของตัวกุ้งบริเวณปล้องที่ 3 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรต่อตัว ในแต่ละระดับความเข้มข้นใช้กุ้งกุลาดำ 10 ตัว มีกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยฉีดปริมาตรเท่ากับกลุ่มทดลอง แล้วนำค่าที่ได้จากการทดลองขั้นต้นนี้ไปใช้ในการจัดระดับของปริมาณแบคทีเรียที่เหมาะสมในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

การทดลองอย่างละเอียด (full scale test) เป็นการทดลองเพื่อจัดระดับของปริมาณแบคทีเรียซึ่งอยู่ระหว่างช่วงต่ำสุดที่ทำให้กุ้งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณสูงสุดที่ไม่ทำให้กุ้งตาย ซึ่งจะแบ่งเป็น 6 ระดับความเข้มข้น โดยใช้เข็มขนาด 26 Gx1/2 นิ้ว และกระบอก syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายแบคทีเรียเข้าทางกลัมนี้อด้านข้างของตัวกุ้งบริเวณปล้องที่ 3 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรต่อตัว ในแต่ละระดับความเข้มข้นใช้กุ้งกุลาดำ 10 ตัว มีกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยฉีดปริมาตรเท่ากับกลุ่มทดลอง กุ้งที่ได้รับการฉีดแล้วจะนำมาใส่ในตู้กระจกเพื่อสังเกตอาการและบันทึกจำนวนกุ้งที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้เกณฑ์การตัดสินใจว่ากุ้งตายจะนอนตะแคงโดยเอาด้านข้างลงและไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อสัมผัสที่ตัว กุ้งที่ตายจะถูกนำออกจากตู้ทันทีที่สังเกตเห็นบันทึกจำนวนกุ้งที่ตายทั้งหมดและนำไปคำนวณหาค่า 96 ชั่วโมง LD_{50} ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

4. การศึกษากระบวนการเกิดโรค (Pathogenicity)

4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากกึ่งที่มีอาการไข้หวัดที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ (การทดลองที่ 2) ซึ่งเก็บไว้ใน TSA slant มา sub-culture บนอาหาร TSA จากนั้นเพาะต่อลงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) + กลีโกล 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเขย่าเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เพาะมาปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลีโกล 1 เปอร์เซ็นต์ ปั่นให้ตกตะกอนอีกครั้งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำแบคทีเรียดังกล่าว มาทำสารละลายแบคทีเรียโดยการเจือจางด้วยน้ำกลีโกล 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับจำนวนของแบคทีเรียโดยดูค่า O.D. ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียด้วยน้ำกลีโกล 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ค่า O.D. ในระดับที่ทำให้กึ่งทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 96 ชั่วโมง (LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง)

4.2 การทดสอบสถานะการเกิดโรค

นำกึ่งกลาดำ น้ำหนัก 8-12 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งด้วยน้ำความเค็มต่ำ มาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นใส่กึ่งลงในตู้กระจก ขนาด 45x100x45 เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำความเค็ม 5-10 พีพีที ปริมาตร 100 ลิตร จำนวน 10 ตัวต่อตู้ โดยมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา โดยกึ่งกลุ่มควบคุม 1 ตู้ ทำการฉีดด้วยน้ำกลีโกลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรต่อตัว เข้าในกล้ามเนื้อหางปล้องที่ 3 ของกึ่ง ส่วนกึ่งในกลุ่มทดลองทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียในระดับ O.D. ที่ทำให้กึ่งทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 96 ชั่วโมง (LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง) จากการทดลองที่ 3 เข้าในกล้ามเนื้อหางปล้องที่ 3 ของกึ่ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตอาการผิดปกติของกึ่ง สุ่มเก็บตัวอย่างกึ่งเพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียอีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

5. การศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำ

5.1 การเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างกึ่งกลาดำที่มีอาการจ้ำขาวจากฟาร์มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจำนวนฟาร์มละ 20 ตัวอย่าง มาดองในน้ำยา Davidson's fixative โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการคือ จะฉีคน้ำยา Davidson's fixative เข้าไปบริเวณตับและตับอ่อน และกล้ามเนื้อท้องบริเวณปล้องที่ 1 และปล้องที่ 5 ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 26 Gx1/2 นิ้ว ปริมาณน้ำยาที่ฉีดเข้าตัวอย่างประมาณ 0.1-10 มิลลิลิตร ขึ้นกับขนาดของกึ่ง แซ่ตัวอย่างในน้ำยาต้องประมาณ 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะย้ายไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเตรียมตัวอย่างขั้นต่อไป

5.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อ

- การเตรียมชิ้นเนื้อในกึ่งกลาดำขนาด 10 กรัม เฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษา ได้แก่ บริเวณตับและตับอ่อน และบริเวณลำไส้

- นำชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึ่งน้ำออก (dehydration) clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน

- นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วซ้อนด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืน

- เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์แล้ว นำมาข้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ คือละลายพาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นผ่านกระบวนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปความเข้มข้นต่ำ แล้วข้อมสี หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออก (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปความเข้มข้นสูง แช่ในไซลีน แล้ว mount ด้วย permount

- เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์แล้ว นำมาข้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Bell and Lightner (1988) เพื่อนำไปศึกษาทางพยาธิวิทยาต่อไป

6. สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการอาคารโรคสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
2. ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาและห้องปฏิบัติการแบคทีเรียสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือน มิถุนายน ปี พ.ศ. 2547 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2548

ผลและวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจากพื้นที่ต่าง ๆ จำนวน 9 ฟาร์ม แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาว

แหล่งที่มา ของตัวอย่าง	อายุ (วัน)	น้ำหนัก (กรัม)	ความเค็ม น้ำ (พีพีที)	ลักษณะภายนอก
บางแพ	84	13-16	4	ลำตัวมีสีเข้ม หนวดกุด
ดอนตูม	73	10-14	5	ระยางค์กร่อน ลำตัวสกปรกเล็กน้อย
แหลมสิงห์ 1	75	9-13	12	ลำตัวสีเข้ม แพนหางบวม
แหลมสิงห์ 2	79	11-15	11	ระยางค์กร่อน มีแผลดำที่ปลายระยางค์
แหลมสิงห์ 3	67	9-13	11	ลำตัวสีแดง ตัวหลวม
แหลมสิงห์ 4	69	9-12	10	ลำตัวสกปรก ตัวหลวม ระยางค์กร่อน
นายายอาม	66	9-14	11	หนวดกุด หางกร่อน
บางเลน 1	68	9-12	3	หนวดกุด ตัวสีฟ้า
บางเลน 2	72	10-12	5	ลำตัวมีสีแดงเข้ม ระยางค์กร่อน

1. การศึกษาชนิดของปรสิตภายนอกและปรสิตภายในลำไส้

1.1 การศึกษาชนิดของปรสิตภายนอก

จากการศึกษาปรสิตภายนอกของกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจากฟาร์มทั้งหมด 9 ฟาร์ม จำนวน 225 ตัวอย่าง พบปรสิต 1 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดตามวิธีของ Kudo (1977) และ Farmer (1980) มีรายละเอียดทางอนุกรมวิธานดังนี้คือ

Kingdom Animalia

Phylum Protozoa

Class Ciliata

Subclass Peritrichia

Order Peritrichida

Suborder Sessilina

Family Vorticellidae

Genus *Zoothamnium*

ผลการตรวจหาปรสิตภายนอก โดยทำการตรวจบริเวณส่วนเหงือก ส่วนปลายขาว่ายน้ำ ส่วนแพนหาง จากกึ่งทุกตัวอย่าง พบปรสิตชนิด *Zoothamnium* sp. เกาะอยู่โดยสามารถพบในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจ (ภาพที่ 1) ลักษณะกึ่งตัวอย่างจะมีลำตัวค่อนข้างสกปรก มีสีน้ำตาลหรือคล้ำ ไม่สดใส บริเวณผิวหนังจะเห็นจุดเล็ก ๆ คล้ายทรายติดอยู่ซึ่งสอดคล้องกับที่ ชลอ (2543) เคยรายงานไว้ ส่วนสาเหตุการเกิด *Zoothamnium* sp. เนื่องจากกึ่งมีอายุมากกว่า 60 วัน และไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ จึงมีตะกอนที่เกิดจากอาหารเหลือและตะกอนที่เกิดจากแพลงก์ตอนในบ่อตายพร้อมกัน ตะกอนเหล่านี้จะสะสมอยู่ตามพื้นบ่อ เป็นแหล่งขยายพันธุ์ของ *Zoothamnium* sp. และจะเข้าเกาะตัวและเหงือกกึ่ง ถ้าเกาะปริมาณมากกึ่งจะลอยบริเวณผิวน้ำ ไม่ค่อยกินอาหารและตัวหลวม กึ่งจะอ่อนแอสามารถติดเชื้อโรคอื่นเช่น เชื้อแบคทีเรีย ได้ง่ายขึ้น

1.2 การศึกษาชนิดของปรสิตภายในลำไส้

จากการศึกษาปรสิตภายในลำไส้ของกึ่งกุลาค่าที่มีอาการจี้ขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบว่าฟาร์มที่เลี้ยงในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี พบปรสิต 1 ชนิดในลำไส้ของกึ่งจำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็น 5.8 เปอร์เซ็นต์ จาก 225 ตัวอย่าง เมื่อจำแนกชนิดตามวิธีของ Levine *et al.* (1980) มีรายละเอียดทางอนุกรมวิธานดังนี้คือ

Subkingdom Protozoa

Phylum Apicomplexa

Class Sporozoa

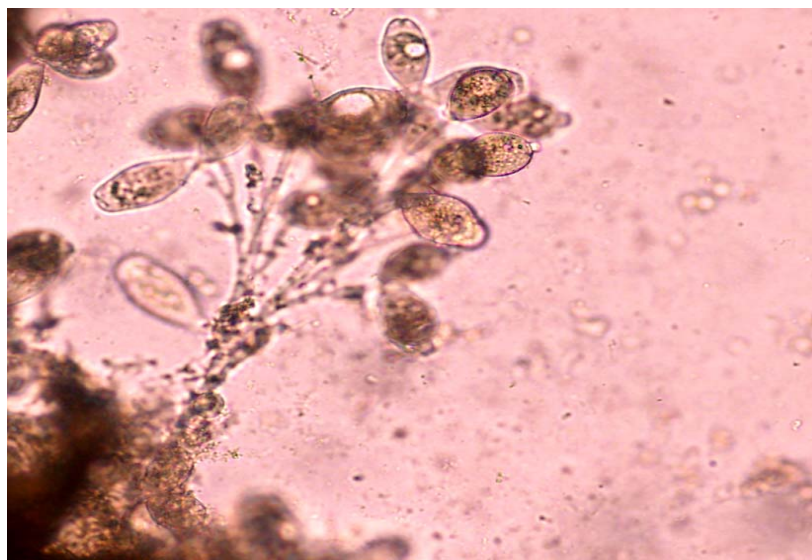
Order Eugregarinida

Suborder Cephalina

Family Gregarinidae

Genus *Gregarina*

จากการศึกษาปรสิตภายในลำไส้กิ้งกูดค้ำที่มีอาการจี้ขาว พบกริการินในลำไส้ของกิ้งกูดอย่างจาก ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรีเพียงแหล่งเดียว (ภาพที่ 2) โดยพบกริการินจำนวน 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 225 ตัวอย่าง คิดเป็น 5.8 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จะเนื่องมาจากแหล่งเลี้ยงดังกล่าวอาจมีสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น โพลีคีตหรือหอยสองฝา ที่เป็นเจ้าบ้านตัวกลางของกริการินอาศัยอยู่ (บพิช, 2546; Lom and Dykova, 1992; Overstreet, 1973) พรชัย (2546) กล่าวว่าพบการระบาดของกริการินในบางพื้นที่ของประเทศไทย และจะพบการเกิดอาการจี้ขาวร่วมกับการติดเชื้อกริการินเสมอ กริการินจะเป็นตัวเปิดแผลในระบบทางเดินอาหาร และเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการระบาดของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค การระบาดของกริการินทำให้กิ้งกูดมีการเจริญเติบโตลดลงและทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อกึ่ง (feed conversion ratio) เพิ่มขึ้น เนื่องจากประสิทธิภาพในการใช้อาหารของกิ้งกูดลดลง ซึ่งมีสาเหตุจากระบบทางเดินอาหารถูกทำลาย



ภาพที่ 1 *Zoothamnium* sp. ที่เกาะบริเวณระยางค์ของกิ้งกูดค้ำที่มีอาการจี้ขาว
(100x)



ภาพที่ 2 กรีกรินที่พบใน lumen ส่วน midgut ของกิ้งกูด้าที่มีอาการจี้ขาว (400x)

2. การศึกษาชนิดของแบคทีเรีย

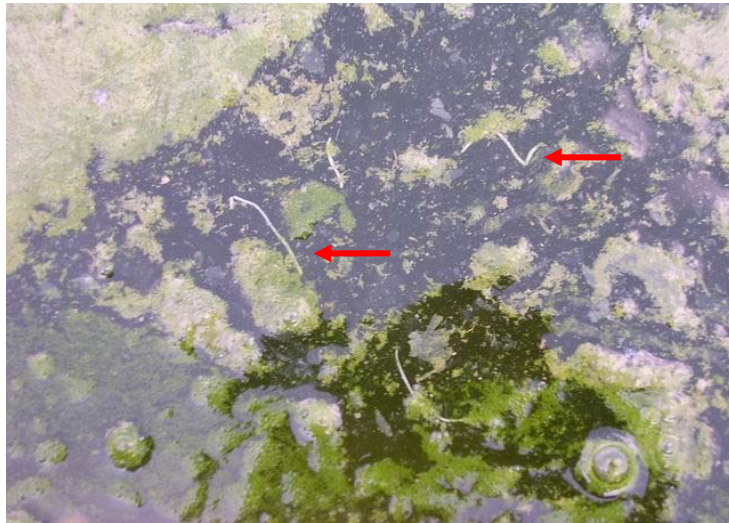
จากการตรวจตัวอย่างกิ้งที่มีอาการจี้ขาว จากฟาร์มเลี้ยงกิ้งกูด้าทั้งหมด 9 ฟาร์ม ฟาร์มละ 15 ตัวอย่าง โดยทำการแยกเชื้อจากน้ำเลือดกิ้ง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ TCBS โดยเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในกิ้งกูด้าที่มีอาการจี้ขาวในพื้นที่ต่าง ๆ แสดงได้ตามตารางที่ 2 ผลการศึกษาจะพบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมากจากทุกตัวอย่าง โดยลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โคโลนีจะมีลักษณะสีครีม รูปร่างกลมมน ขอบเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร และลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร TCBS จะมีทั้งโคโลนีสีเขียวและโคโลนีสีเหลือง เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E พบชนิดของแบคทีเรียแยกตามแหล่งเลี้ยงแสดงดังตารางที่ 3 และเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายของชนิดแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากกิ้งที่มีอาการจี้ขาวแสดงไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในกึ่งกลาดำที่มีอาการจี่ขาวในพื้นที่ต่าง ๆ

พื้นที่	จำนวนกึ่งกลาดำ (ตัว)	จำนวนกึ่งกลาดำ ที่พบเชื้อ (ตัว)	เปอร์เซ็นต์
บางแพ	15	13	86.7
คอนชุม	15	11	73.3
แหลมสิงห์ 1	15	10	66.7
แหลมสิงห์ 2	15	13	86.7
แหลมสิงห์ 3	15	9	60.0
แหลมสิงห์ 4	15	10	66.7
นายายอาม	15	11	73.3
บางเลน 1	15	7	46.7
บางเลน 2	15	8	53.3
รวม	135	92	68.15

ตารางที่ 3 ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากกึ่งที่มีอาการจี่ขาวในพื้นที่ต่าง ๆ

พื้นที่	ชนิดแบคทีเรีย
บางแพ	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i>
คอนชุม	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> (non 01)
แหลมสิงห์ 1	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i>
แหลมสิงห์ 2	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i>
บางเลน 1	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
บางเลน 2	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i>
แหลมสิงห์ 3	<i>V. fluvialis</i>
แหลมสิงห์ 4	<i>V. fluvialis</i>
นายายอาม	<i>V. fluvialis</i>



ภาพที่ 3 ลักษณะจิ้งขาวที่ลอยบริเวณผิวน้ำในบ่อเลี้ยง



ภาพที่ 4 ลักษณะจิ้งขาวที่พบลอยบริเวณผิวน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายของชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งที่มีอาการจ้ำขาวในทุกพื้นที่

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนที่พบเชื้อ (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การแพร่กระจาย
<i>V. parahaemolyticus</i>	46	34.1
<i>V. fluvialis</i>	45	33.3
<i>V. alginolyticus</i>	14	10.4
<i>V. cholerae</i> (non 01)	6	4.4
<i>V. mimicus</i>	3	2.2

ผลการพบเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวในพื้นที่ที่ศึกษาพบว่าจาก 135 ตัวอย่างพบเชื้อแบคทีเรีย 92 ตัวอย่าง คิดเป็น 68.15 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด ทั้งนี้พบกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิดในเลือดจำนวนถึง 22 ตัว คิดเป็น 16.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงซึ่งอาจเนื่องจากกุ้งในทุบ่อที่ศึกษามีอายุมากกว่า 60 วัน และการเลี้ยงในปัจจุบันเป็นแบบระบบปิดไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจากภายนอกฟาร์ม จึงทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ต่าง ๆ เป็นจำนวนมากและเมื่อกุ้งอ่อนแอก็สามารถติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย และจากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในกุ้งที่มีอาการจ้ำขาว พบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียชนิดที่พบมากที่สุดในเกือบทุกพื้นที่โดยมีเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายเท่ากับ 34.1 เปอร์เซ็นต์ และที่พบรองลงมาคือ *V. fluvialis* มีเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายเท่ากับ 33.3 เปอร์เซ็นต์ และ *V. alginolyticus* มีเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายเท่ากับ 10.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *V. cholerae* (non 01) และ *V. mimicus* มีเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายเพียง 4.4 เปอร์เซ็นต์ และ 2.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นที่ทราบกันว่า *Vibrio* sp. เป็นแบคทีเรียพอกฉวยโอกาส โดยจะก่อโรคเมื่อกุ้งอ่อนแอ แบคทีเรียชนิดนี้พบทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติและในบ่อเลี้ยง ทั้งในตัวกุ้ง บริเวณเหงือก ลำตัว และทางเดินอาหารของกุ้งปกติ แต่จะทำให้เกิดโรคได้เมื่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ไม่เหมาะสม กุ้งอ่อนแอ โดยโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* sp. ส่วนใหญ่มักเป็นการติดเชื้อภายใน มีความรุนแรงเฉพาะที่ และจะเข้าสู่ระบบเลือด (septicemia) เพ็ญศรี และอรอนงค์ (2548) รายงานว่าสามารถพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ในตับและตับอ่อนกุ้งกุลาดำที่ปกติและกุ้งป่วยร่วมกับเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ Lopez (1997) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้กุ้งปกติก็พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เช่นกัน แต่ถ้าหากกุ้งมีความแข็งแรงก็สามารถที่จะกำจัดแบคทีเรียเหล่านี้

ได้ โดยอาศัยกลไกการป้องกันตนเอง แต่ถ้ากระบวนการทำลายแบคทีเรียทำงานไม่สำเร็จก็จะทำให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายและแพร่ไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายทำให้กุ้งตายในที่สุด (Lightner, 1988a)

บ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการเลี้ยงแบบพัฒนา มีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่น ถ้าการจัดการเรื่องอาหารขาดประสิทธิภาพ เช่น มีการให้อาหารมากเกินไปเกินความต้องการของกุ้ง จะทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เป็นจำนวนมากสารเหล่านี้จะเป็นแหล่งอาหารให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี โดย Sung *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ในบ่อระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ร่วมกับเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น ขณะเดียวกันก็ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในตับและตับอ่อน พบว่า 68.2 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Vibrio* ทั้งหมดเป็นเชื้อ *V. harveyi* กุลวรา (2534) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งป่วยพบว่าเชื้อที่ได้ คือ *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *Vibrio* sp. Tendencia and Dureza (1996) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนตับและตับอ่อน antennal haemolymph และ lymphoid organ ในกุ้งที่มีอาการ red disease syndrome พบเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* sp. นอกจากนี้อมรรชัย (2536) ได้ทำการศึกษาโดยแยกเชื้อ *Vibrio* จากตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคจากฟาร์มกุ้งทั่วประเทศ พบว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุดถึง 27.03 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งกุลาดำตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (96 ชั่วโมง LD₅₀)

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวในพื้นที่ต่าง ๆ แล้วเลือกแบคทีเรียที่พบในปริมาณมากที่สุดอันดับ 1 และ 2 ในแต่ละพื้นที่เพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งกุลาดำตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (96 ชั่วโมง LD₅₀) แสดงผลการศึกษาดังตาราง ที่ 5

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากกุ้งที่มีอาการจ้ำขาวในพื้นที่ต่าง ๆ มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมงแตกต่างกัน ซึ่งค่าที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียในแต่ละพื้นที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน จะสังเกตได้ว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวในพื้นที่อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.89×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณเชื่อน้อยกว่า *V. parahaemolyticus* จากพื้นที่อื่น ๆ แสดงว่า

เชื้อมีความรุนแรงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดเดียวกันในพื้นที่ต่าง ๆ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดย ค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีค่าอยู่ในช่วง 4.89×10^6 ถึง 4.47×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ประพนธ์ (2535) รายงานว่าค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีค่าเท่ากับ 5.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเจดिया (2538) ได้ศึกษาพบว่าค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีค่าเท่ากับ 3.16×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ได้ก็ใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งกุลาดำตายครั้งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (96 ชั่วโมง LD_{50}) ในพื้นที่ต่าง ๆ

พื้นที่	ชนิดแบคทีเรีย	LD_{50} (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
บางแพ	<i>V. parahaemolyticus</i>	1.74×10^7
	<i>V. alginolyticus</i>	6.46×10^6
คอนตอม	<i>V. parahaemolyticus</i>	4.89×10^6
	<i>V. cholerae</i> (non 01)	4.57×10^8
แหลมสิงห์ 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	1.74×10^7
	<i>V. fluvialis</i>	6.6×10^7
แหลมสิงห์ 2	<i>V. parahaemolyticus</i>	3.98×10^7
	<i>V. fluvialis</i>	2.09×10^8
บางเลน 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	3.63×10^7
	<i>V. mimicus</i>	5.75×10^8
บางเลน 2	<i>V. parahaemolyticus</i>	4.47×10^7
	<i>V. alginolyticus</i>	1.55×10^6
แหลมสิงห์ 3	<i>V. fluvialis</i>	2.34×10^8
แหลมสิงห์ 4	<i>V. fluvialis</i>	2.24×10^8
นายายอาม	<i>V. fluvialis</i>	1.49×10^8

เชื้อ *V. fluvialis* จากการศึกษาครั้งนี้มีค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงแตกต่างกันโดย *V. fluvialis* ซึ่งแยกได้จากกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี มีค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงมีความรุนแรงสูงที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 6.6×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า LD_{50} ที่ 96

ชั่วโมงของเชื้อ *V. fluvialis* ที่แยกได้ในการศึกษารั้วนี้มีค่าอยู่ในช่วง $6.6 \times 10^7 - 2.34 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงที่แสดงความรุนแรงสูงสุดของการศึกษารั้วนี้คือเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกได้จากกุ้งป่วยในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอบางเลน มีค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 1.55×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าขณะเก็บตัวอย่างพบกุ้งในบ่อตัวสีแดงเข้มและตายเป็นจำนวนมาก โดยช่วงของค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของแบคทีเรียดังกล่าวที่ได้จากการศึกษารั้วนี้มีค่าเท่ากับ 1.55×10^6 และ 6.46×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของธนาทิพย์ (2537) ซึ่งรายงานค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของ *V. alginolyticus* ว่ามีค่าเท่ากับ 5.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *V. mimicus* และ *V. cholerae* (non 01) มีค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 5.75×10^8 และ 4.57×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของเชื้อ *V. mimicus* มีความรุนแรงน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่มีอาการจีขาวจากพื้นที่ต่าง ๆ

4. การทดสอบกระบวนการเกิดโรค

จากการฉีดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่มีอาการจีขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำเค็มดำในพื้นที่ต่าง ๆ ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งผลการฉีดกลับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มดำขนาด 8-12 กรัม โดยฉีดบริเวณระหว่างกล้ามเนื้อหางปล้องที่ 3 และ 4 ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 96 ชั่วโมง (LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง) ผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* และ *V. alginolyticus* จากทุกพื้นที่ที่มีผลทำให้กุ้งมีอาการจีขาว โดยจะแสดงอาการจีขาวประมาณ วันที่ 5-8 หลังจากเริ่มฉีดเชื้อ ซึ่งจะเห็นว่ามีลักษณะสีขาวใสและสีขาวขุ่นลอยบริเวณผิวหนังน้ำเช่นเดียวกับลักษณะที่พบในบ่อเลี้ยงที่มีกุ้งป่วย และเมื่อนำกุ้งที่มีอาการจีขาวไปดูเลือดเพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียก็พบว่า เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทดสอบ ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับที่ ชลอ (2543) รายงานไว้ว่าสาเหตุหนึ่งของอาการจีขาวเกิดจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งจะสัมพันธ์กับสภาพพื้นบ่อที่ไม่ดี ส่วนผลของการฉีดเชื้อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* (non 01) พบว่าเชื่อดังกล่าวไม่ทำให้อาการจีขาว สมฤดี (2545) รายงานว่าสามารถพบ *V. cholerae* (non 01) ได้ในน้ำที่มีความเค็ม 35 และ 40 พีพีที ซึ่ง *V. cholerae* (non 01) จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสกปรกในน้ำแต่ไม่ทำให้อาการโรคและเกิดการตายของกุ้งกุลาดำ และ Yamamoto et al. (1983) รายงานว่าสามารถพบ *V. cholerae* (non 01) ได้ในน้ำกร่อยและในอาหารทะเลอีกทั้งสามารถทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ (gastrointestinal) ในคนที่

รับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ได้ แต่ความรุนแรงจะน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ *V. cholerae* สายพันธุ์อื่น

ตารางที่ 6 ลักษณะอาการของกุ้งหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

พื้นที่	ชนิดแบคทีเรีย	ลักษณะอาการ
บางแพ	<i>V. parahaemolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 5 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
	<i>V. alginolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 6 กุ้งตาย 40 เปอร์เซ็นต์
คอนตุม	<i>V. parahaemolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 7 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
	<i>V. cholerae</i> (non 01)	ไม่พบจ๊ขาว กุ้งตาย 30 เปอร์เซ็นต์
แหลมสิงห์ 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 6 กุ้งตาย 60 เปอร์เซ็นต์
	<i>V. fluvialis</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 5 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
แหลมสิงห์ 2	<i>V. parahaemolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 7 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
	<i>V. fluvialis</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 8 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
บางเลน 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 5 กุ้งตาย 40 เปอร์เซ็นต์
	<i>V. mimicus</i>	ไม่พบจ๊ขาว กุ้งตาย 40 เปอร์เซ็นต์
บางเลน 2	<i>V. parahaemolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 6 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
	<i>V. alginolyticus</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 7 กุ้งตาย 60 เปอร์เซ็นต์
แหลมสิงห์ 3	<i>V. fluvialis</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 5 กุ้งตาย 60 เปอร์เซ็นต์
แหลมสิงห์ 4	<i>V. fluvialis</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 7 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์
นายายอาม	<i>V. fluvialis</i>	พบจ๊ขาวในวันที่ 6 กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 จี๊ขาวที่พบในกึ่งกลาดำหลังจากฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเวลา 5 วัน

5. การศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำที่มีอาการจี๊ขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำและในห้องปฏิบัติการ

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วนตับและตับอ่อน

ผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วนตับและตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่มีอาการจี๊ขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบการลดลงของเซลล์สะสมไขมัน (R-cell) ในตับและตับอ่อน (ภาพที่ 6) พบการตายของเซลล์เยื่อหุ้มตับเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 7-9) พบการเสื่อมและลอกหลุดของเซลล์ที่ตับ สำหรับการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดต่อเชื้อแบคทีเรีย เกิดการรวมตัวของเม็ดเลือดในเซลล์ที่ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 10-11) ควบคู่ไปกับการตายของเซลล์จำนวนมาก พบลักษณะการแบ่งตัวของเซลล์ใหม่ (mitotic figure) เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย พบการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดในลักษณะการเกิด encapsulation และ nodule formation ตลอดจนพบการเกิด Melanization เพื่อล้อมและกำจัดแบคทีเรียที่เข้ามาในร่างกาย (ภาพที่ 14-17)

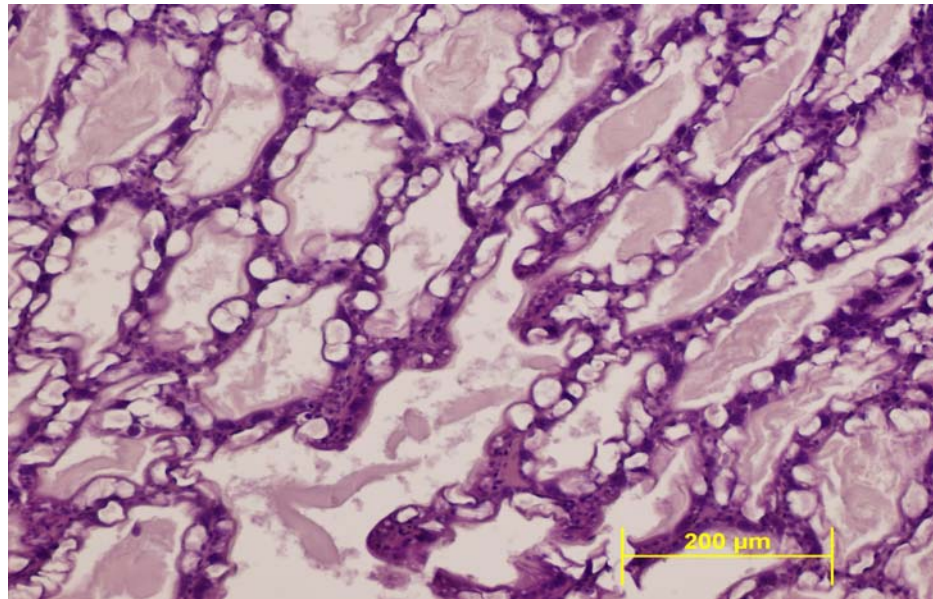
สำหรับลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการจี๊ขาว พบลักษณะทางพยาธิสภาพไม่แตกต่างไปจากตัวอย่างกึ่งที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยง (ภาพที่ 18-29) ยกเว้นลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งที่ได้รับการฉีดเชื้อจะพบการเกิด

nodule formation ในปริมาณมากกว่า ทั้งนี้จะเนื่องมาจากการฉีดเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมากเข้าไปในตัวกุ้ง เป็นการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียอย่างทันทีทันใด กุ้งจึงตอบสนองโดยการส่งเม็ดเลือดจำนวนมากเข้าไปในบริเวณที่มีการสะสมของเชื้อแบคทีเรียเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

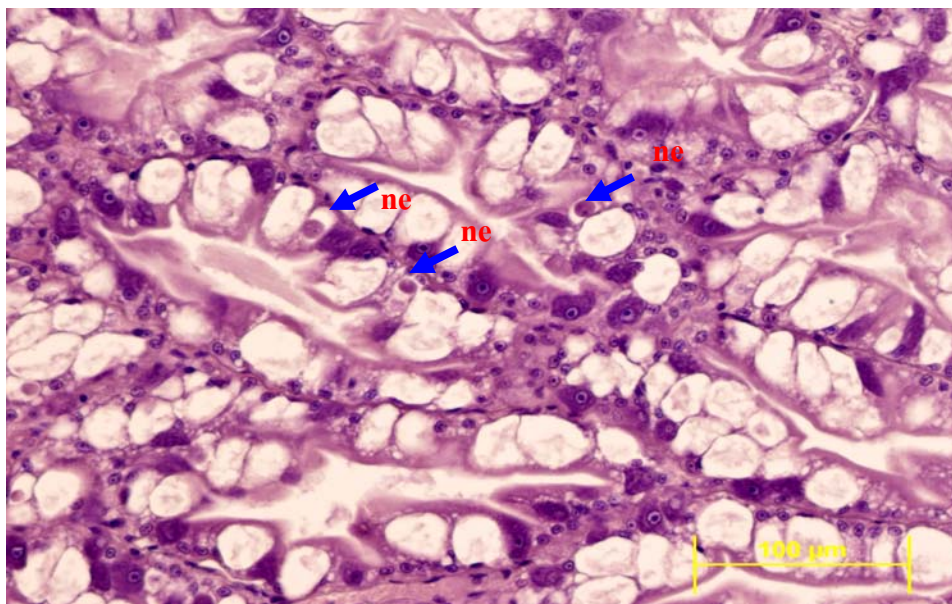
ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อส่วนลำไส้

จากการศึกษาพบกิริกรินในส่วนของลำไส้ (midgut) ของกุ้งตัวอย่างที่เก็บมาจากฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี (ภาพที่ 30) ในขณะที่ผลการศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เก็บจากแหล่งอื่น ๆ ไม่พบกิริกรินแต่พบลักษณะของการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยพบการเกิดการรวมตัวกันของเม็ดเลือดจำนวนมากในส่วนของเยื่อบุผนังลำไส้เกิดการตาย (necrosis) ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ พบลักษณะของการเกิด pyknotic nuclei และ karyorrhexis ของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ควบคู่ไปกับขบวนการแบ่งตัวสร้างเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่ตาย (mitotic figure) (ภาพที่ 31-33) ลักษณะทางพยาธิสภาพลำไส้ของกุ้งที่ฉีดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการจืดขาวพบว่าไม่แตกต่างจากกุ้งที่ป่วยจากฟาร์มเลี้ยง

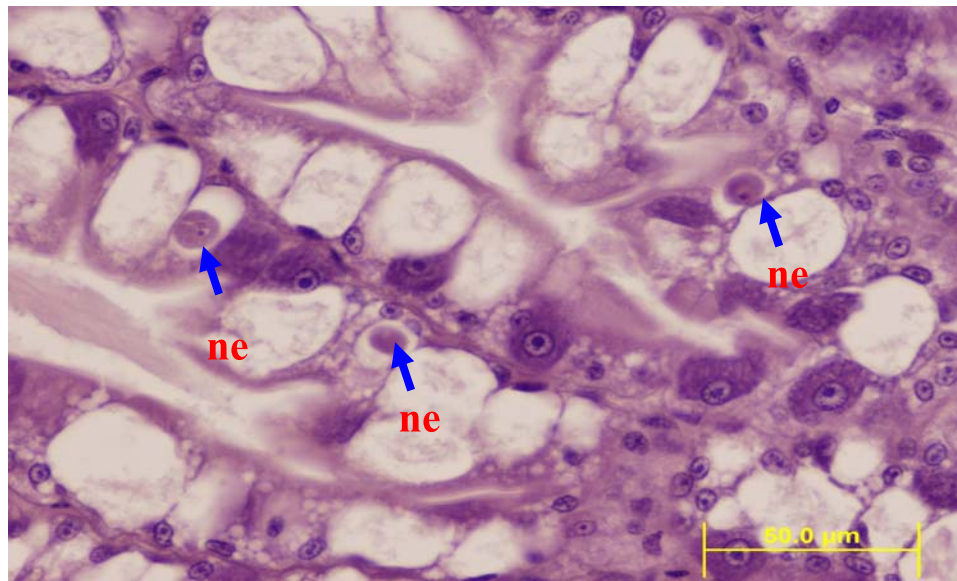
Sindermann (1971) รายงานว่า เมื่อมีแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในตัวกุ้ง กุ้งจะตอบสนองโดยการส่งเม็ดเลือดเข้ามาเป็นจำนวนมากในบริเวณที่อักเสบ (haemocytic infiltration) จากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดเพื่อล้อมและกำจัดสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) ในกรณีที่มีปริมาณแบคทีเรียจำนวนมากหรือพื้นที่การอักเสบมากขึ้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดมากขึ้นเรียงตัวหลายชั้นเพื่อป้องกันมิให้แบคทีเรียกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ เกิดขบวนการ nodule formation (Smith and Ratcliffe, 1976) และเกิดขบวนการ melanization ซึ่งมีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลหรือสีดำ (melanin pigment) จากการกระตุ้นโดยระบบ prophenoloxidase system (proPO) (Lightner and Redman, 1977; Johnson, 1980)



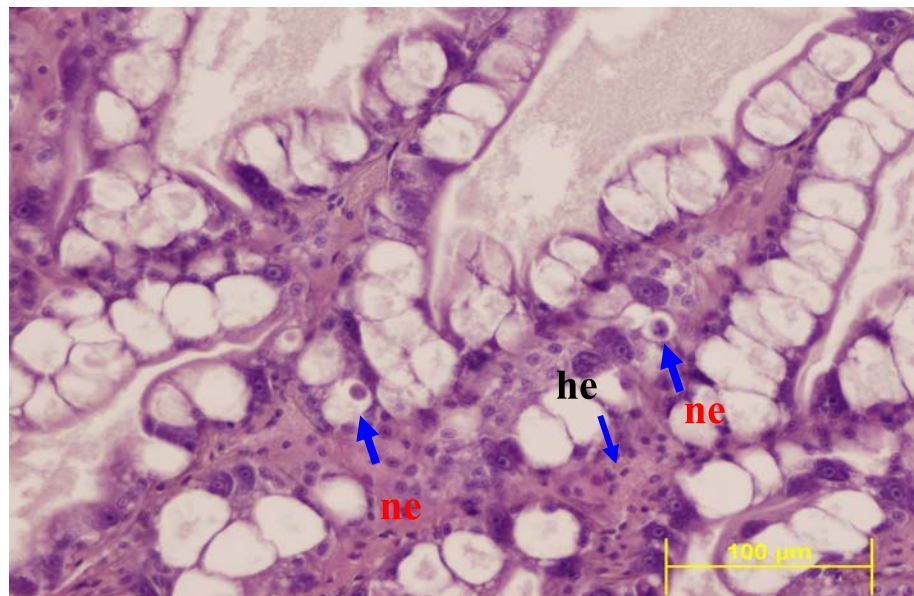
ภาพที่ 6 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจีขาว แสดง R-cell ที่มี ปริมาณน้อยลง (H&E , bar=200μm)



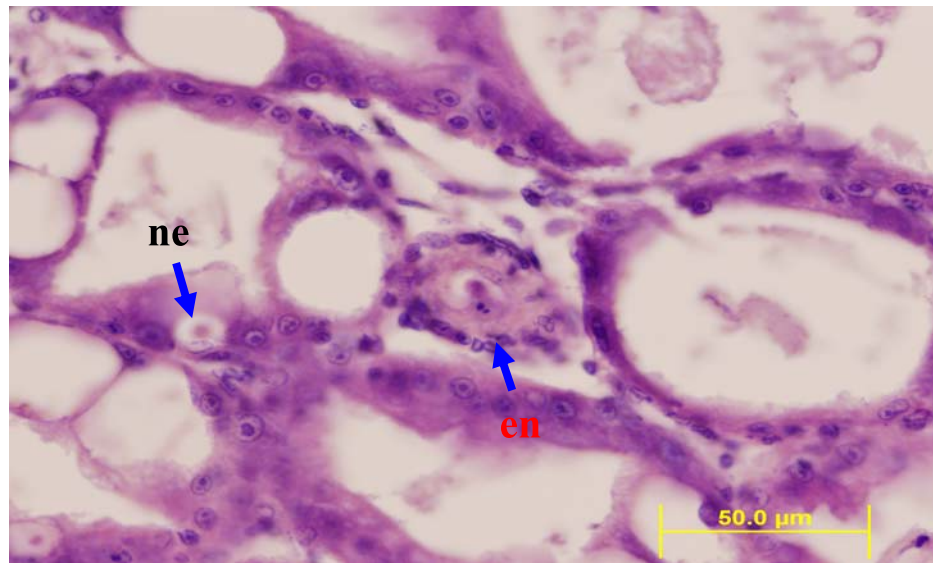
ภาพที่ 7 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจีขาว พบเซลล์ necrosis (ne) (H&E, bar=100μm)



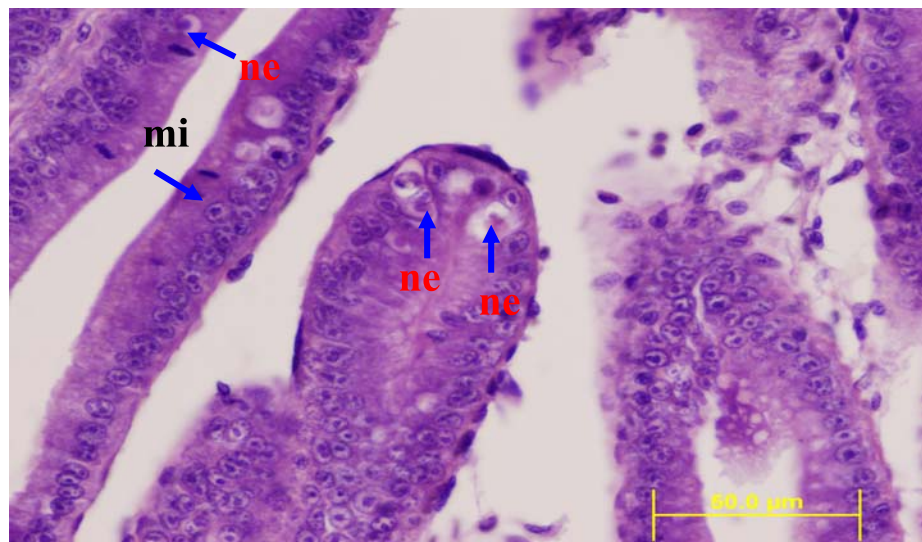
ภาพที่ 8 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการสีขาว พบ multifocal necrosis (ne) (H&E, bar=50μm)



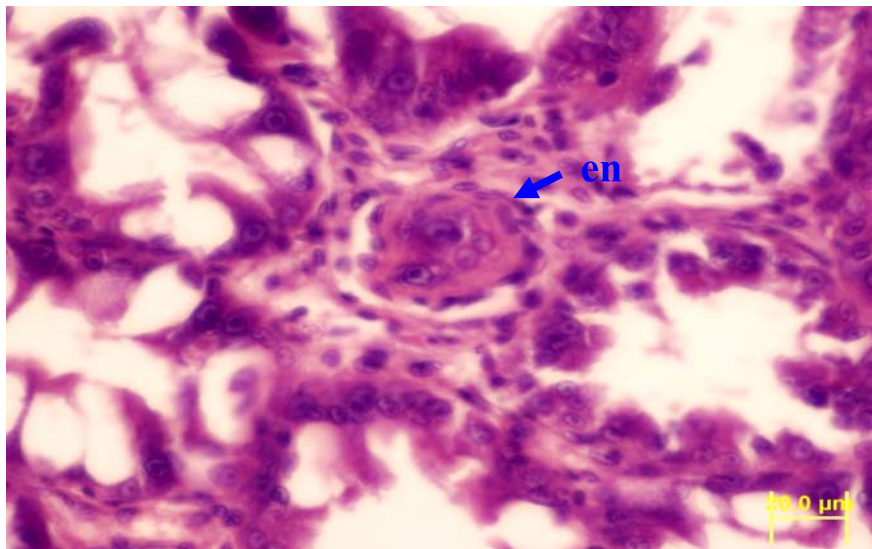
ภาพที่ 9 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการสีขาว พบเซลล์ necrosis (ne) พบ haemocytes จำนวนมากปะปน อยู่ใน haemolymph (he) (H&E, bar=100μm)



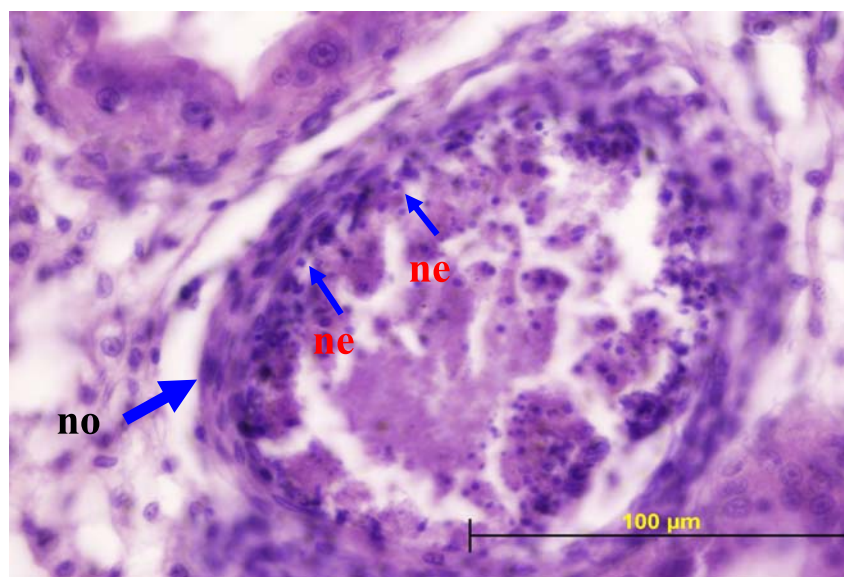
ภาพที่ 10 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งที่มีอาการไข้ขาว พบการเกิด encapsulation (en) และพบเซลล์ necrosis (ne) (H&E, bar=50 μm)



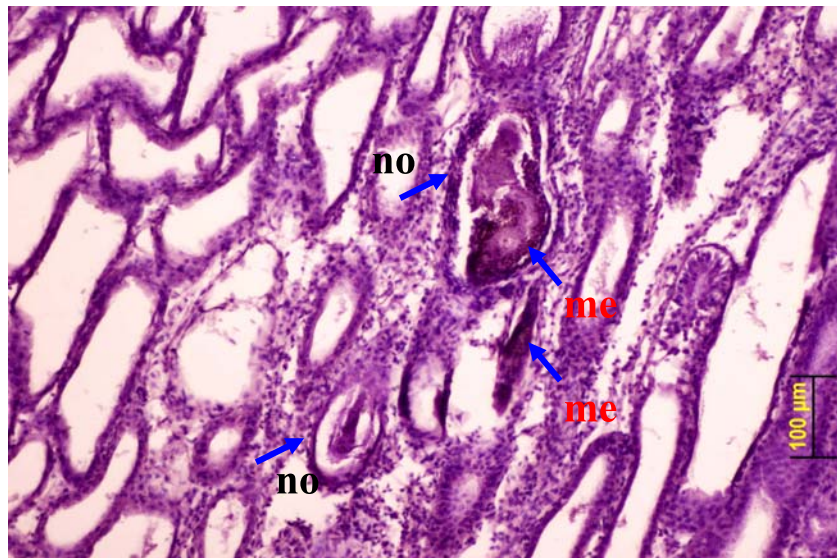
ภาพที่ 11 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งที่มีอาการไข้ขาว พบการเกิด เซลล์ necrosis (ne) และ mitotic figure (mi) (H&E, bar=50 μm)



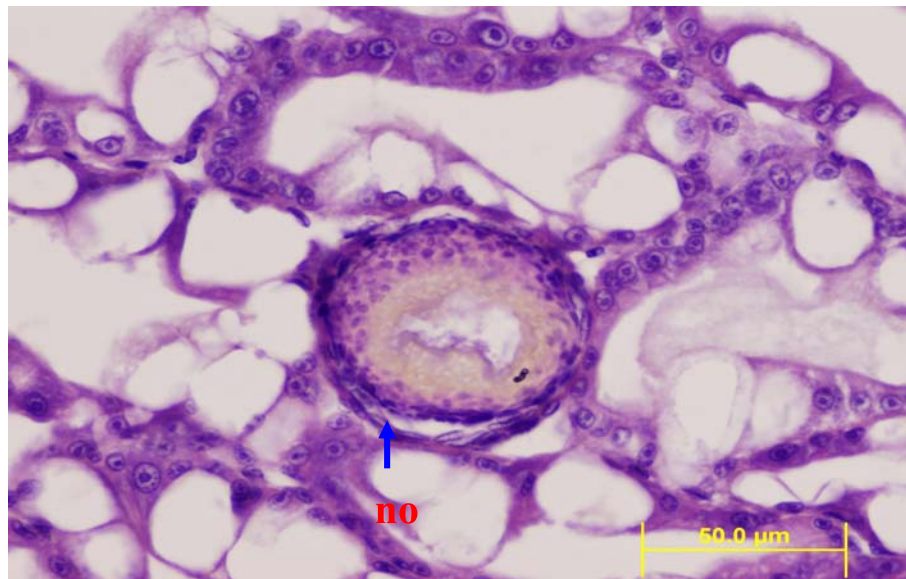
ภาพที่ 12 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดดำที่มีอาการจ้ำขาว พบการเกิด encapsulation (en) ในบริเวณที่มีแบคทีเรียเข้าทำลาย (H&E, bar=20μm)



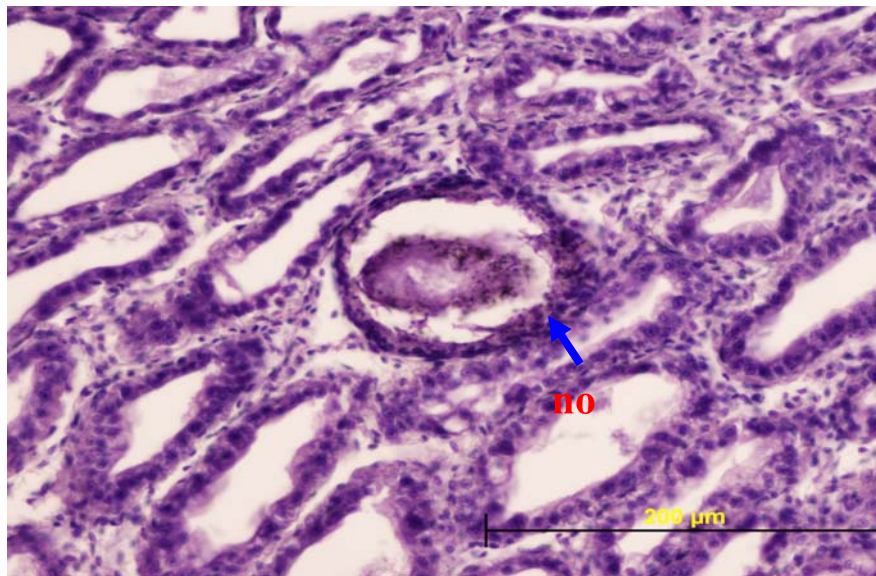
ภาพที่ 13 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดดำที่มีอาการจ้ำขาว พบการเกิด nodule formation (no) และพบเซลล์ necrosis (ne) (H&E, bar=100μm)



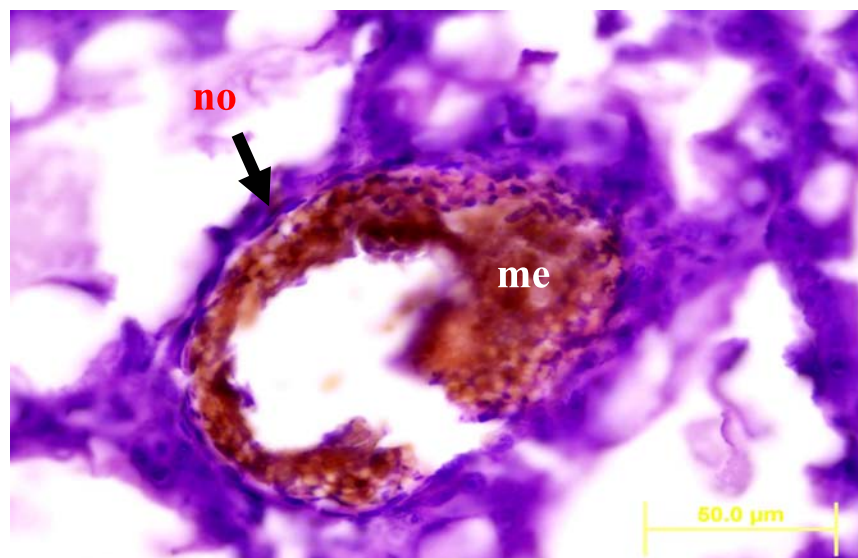
ภาพที่ 14 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่มีอาการจ้ำขาว พบท่อตับถูกทำลายอย่างรุนแรง เกิด nodule formation (no) และขบวนการ Melanization (me) (H&E, bar=100μm)



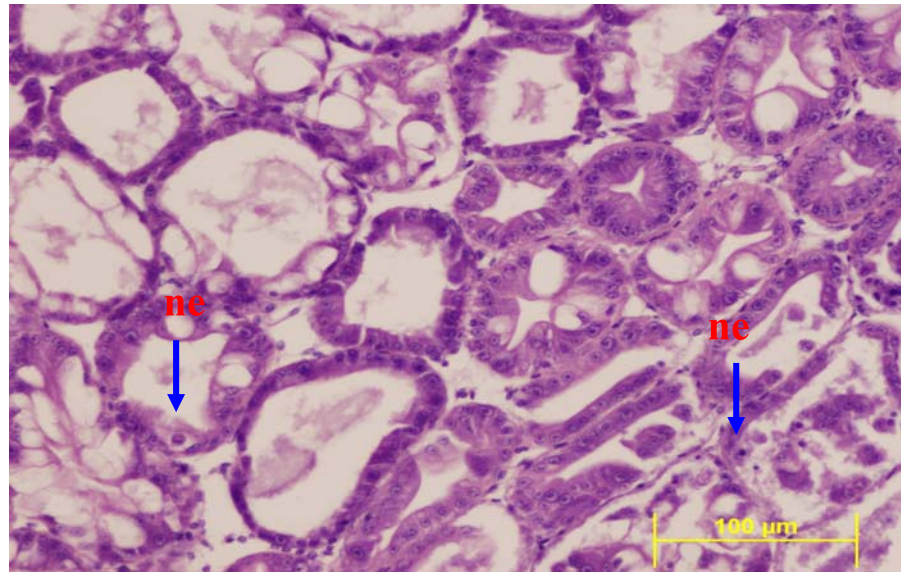
ภาพที่ 15 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจ้ำขาว พบ nodule formation (no) และเกิด melanin pigment (H&E, bar=50μm)



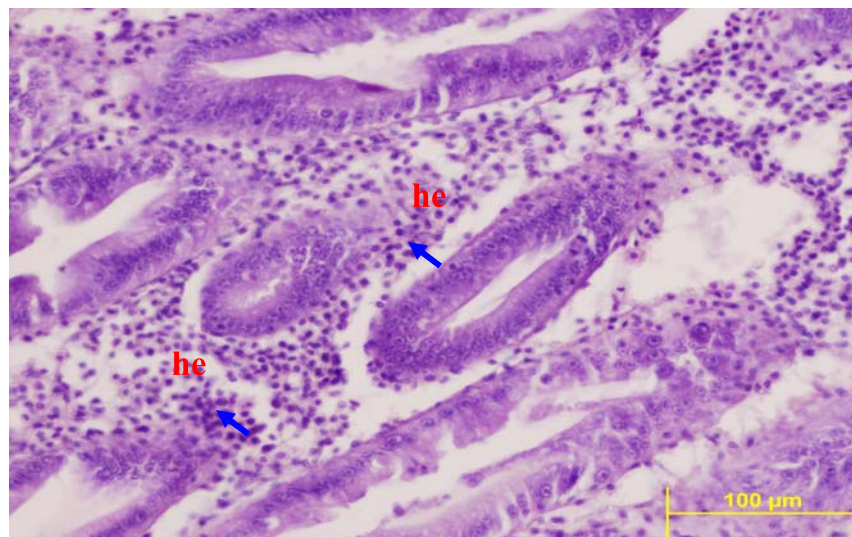
ภาพที่ 16 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดำที่มีอาการจ้ำขาว พบการ เกิด nodule formation (no) และพบการเกิด Melanization (H&E, bar=200μm)



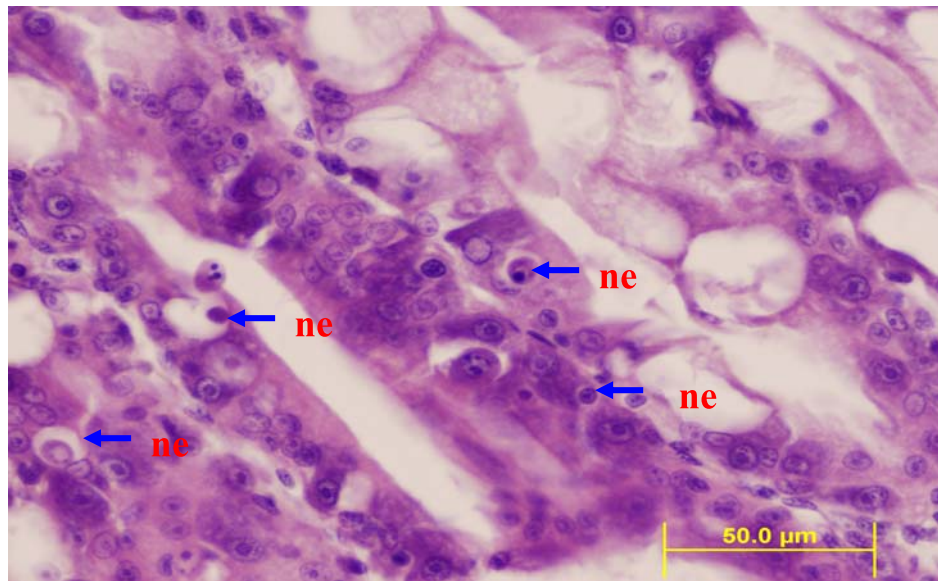
ภาพที่ 17 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดำที่มีอาการจ้ำขาว พบ nodule formation (no) และ พบ melanin pigment (me) (H&E, bar=50μm)



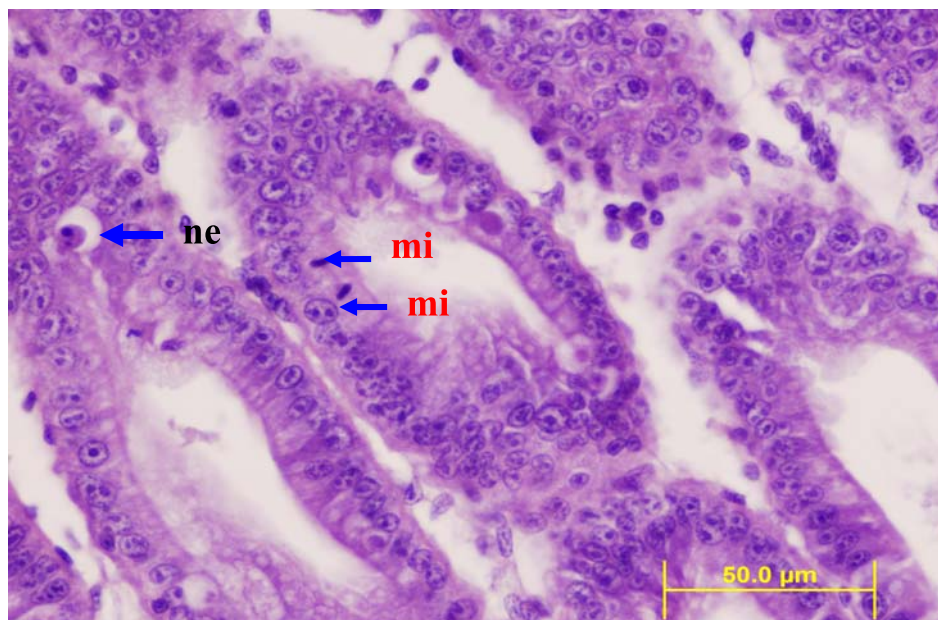
ภาพที่ 18 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งที่มีอาการจี้ขาวเนื่องจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบ เซลล์ necrosis (ne) และพบปริมาณ R-cell น้อยลง (H&E, bar=100μm)



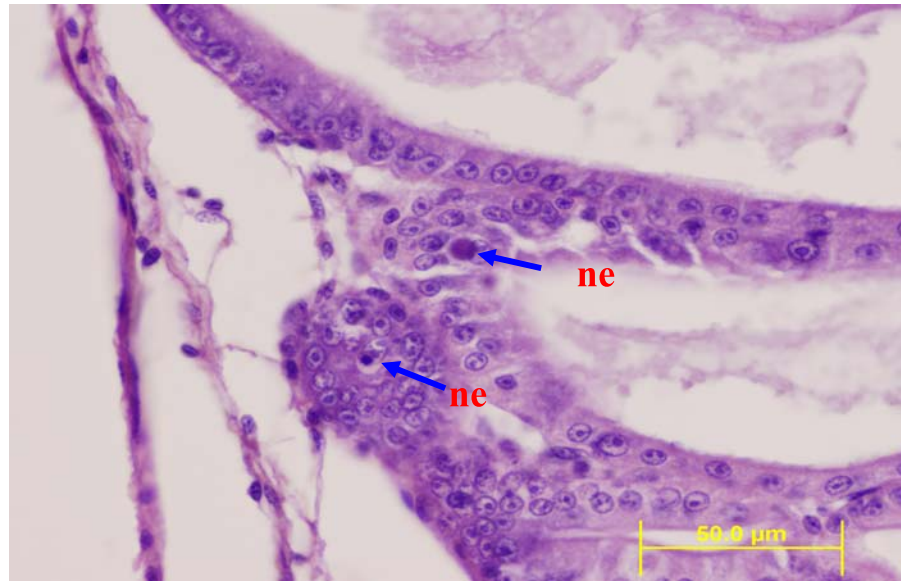
ภาพที่ 19 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกุลาดำที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบ haemocytic infiltration (he) (H&E, bar=100μm)



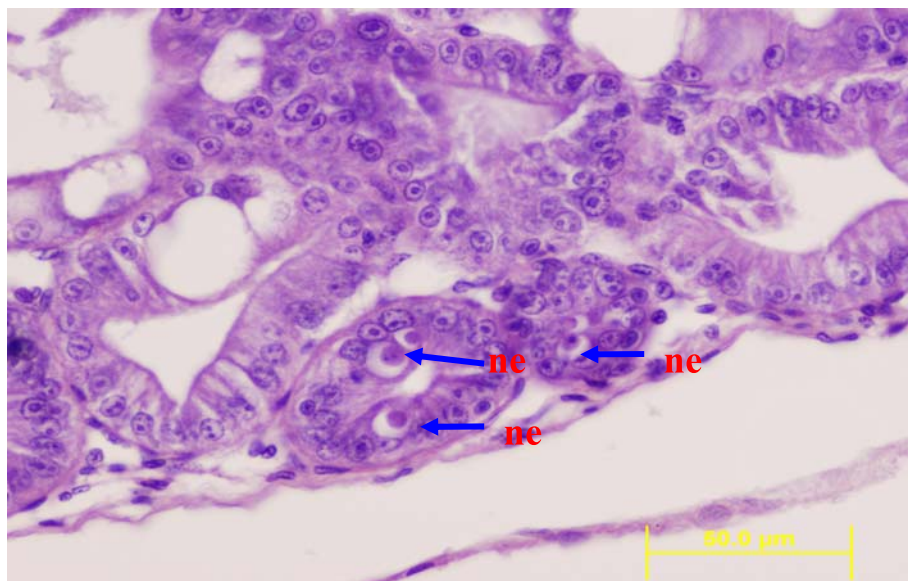
ภาพที่ 20 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจีขาวเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย พบ multifocal necrosis (ne) (H&E, bar=50μm)



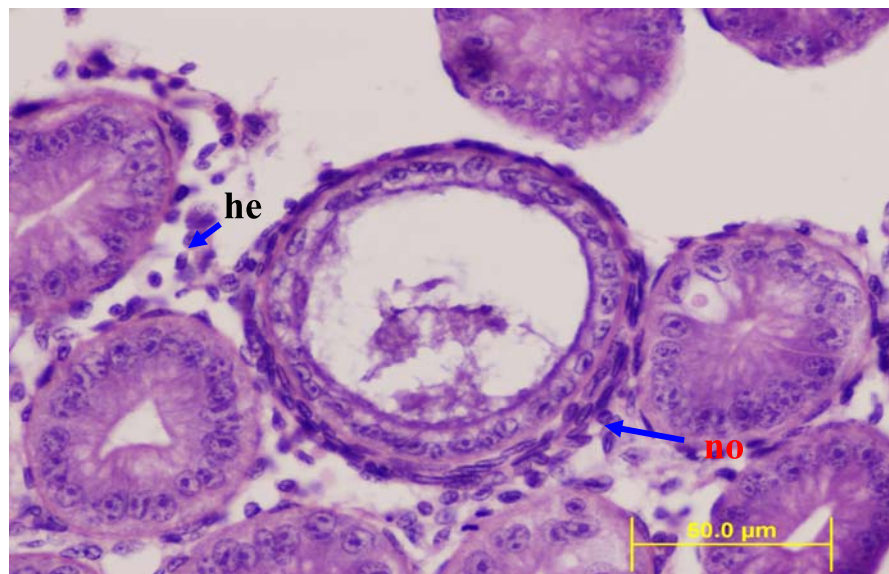
ภาพที่ 21 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจีขาวเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย พบเซลล์ necrosis (ne) และ mitotic figure (mi) (H&E, bar=50μm)



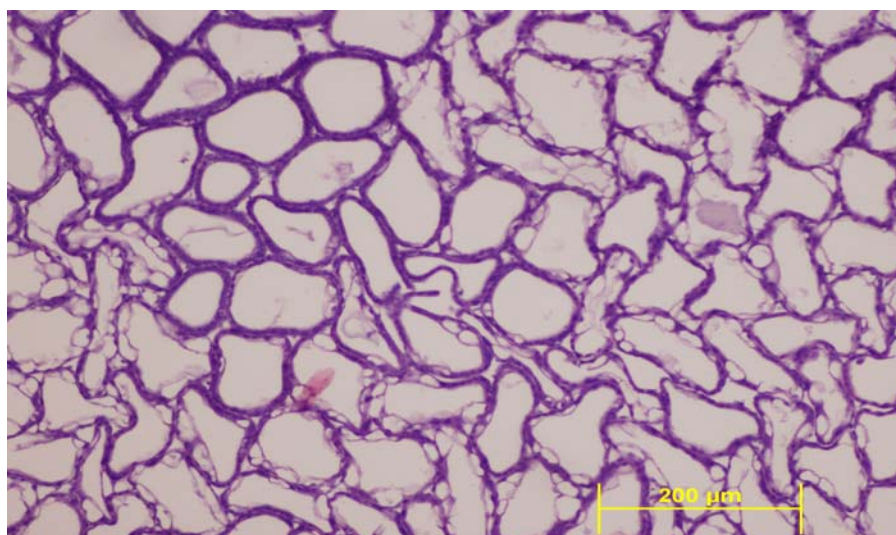
ภาพที่ 22 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งที่มีอาการจีขาวเนื่องจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบเซลล์ necrosis (ne) (H&E, bar=50μm)



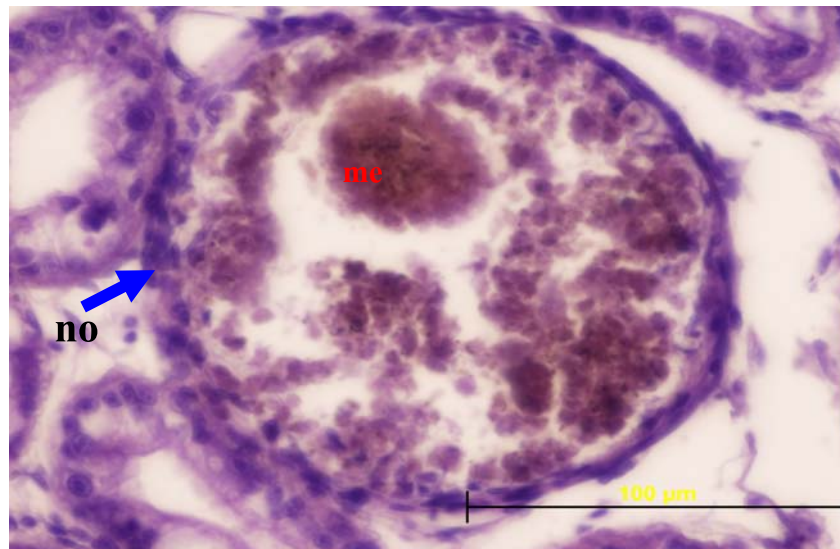
ภาพที่ 23 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งที่มีอาการจีขาวเนื่องจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบเซลล์ necrosis จำนวนมาก (ne) (H&E, bar=50μm)



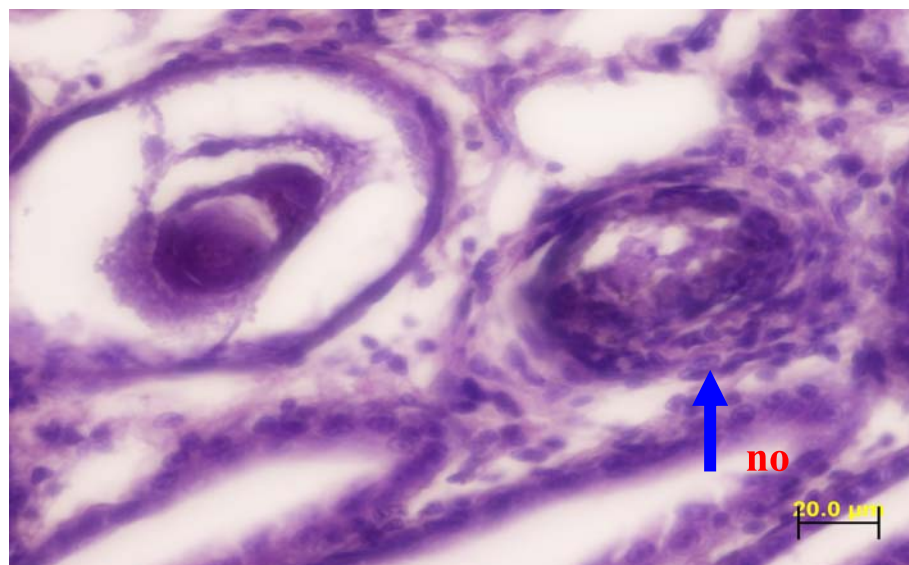
ภาพที่ 24 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจีขาวเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย พบ nodule formation (no) และพบ haemocytic infiltration (he) (H&E, bar=50μm)



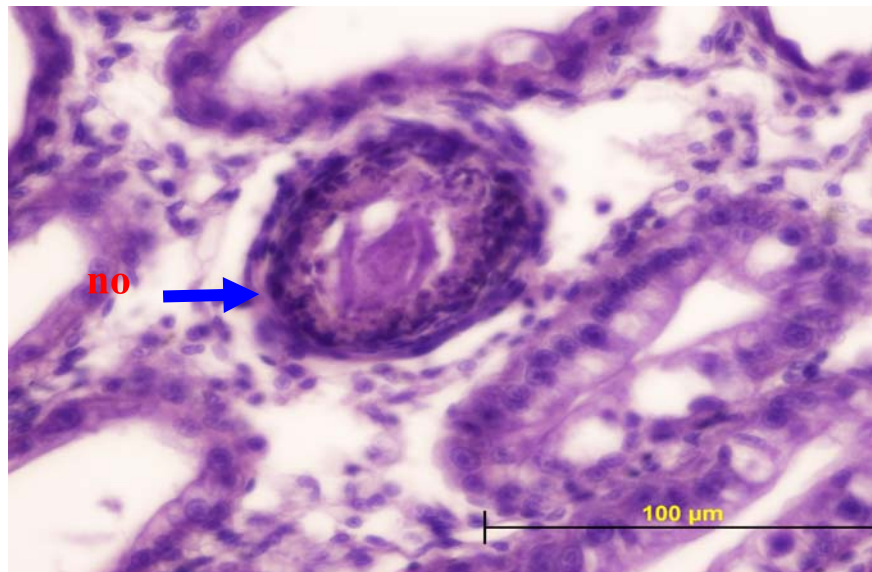
ภาพที่ 25 ส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งที่มีอาการจีขาวเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย พบ atrophic tubule (H&E, bar=200μm)



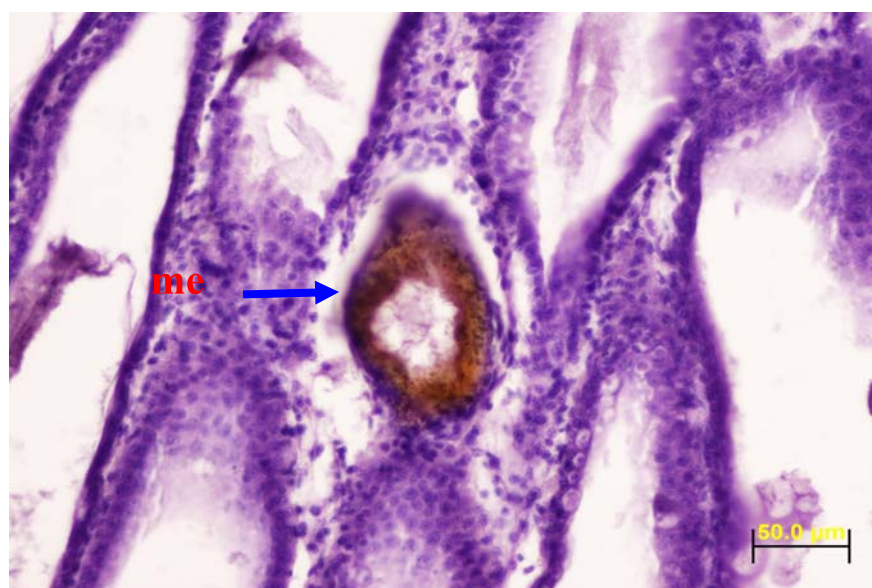
ภาพที่ 26 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดดำที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบการเกิด nodule formation (no) และพบ melanin pigment (me) (H&E, bar=100μm)



ภาพที่ 27 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดดำที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบการเกิด nodule formation (no) บริเวณท่อตับที่มีแบคทีเรียเข้าทำลาย (H&E, bar=20μm)



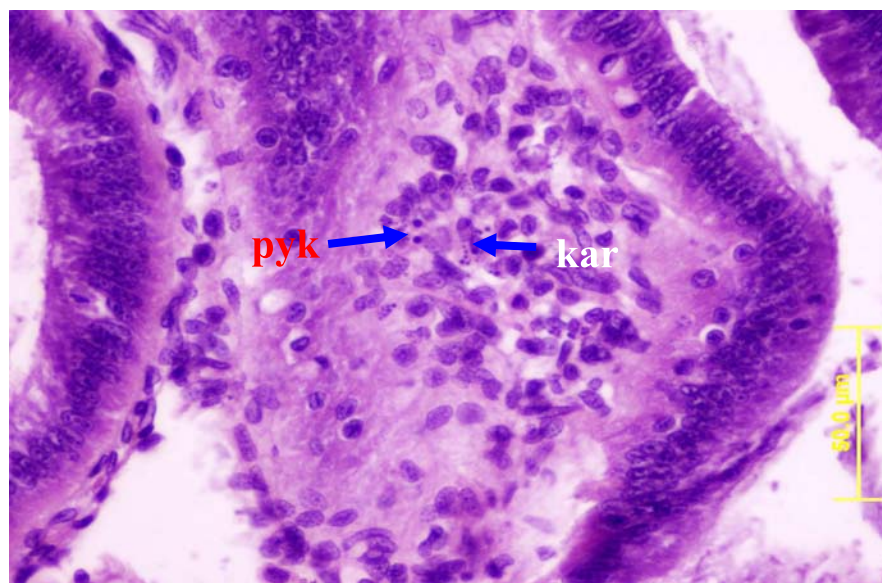
ภาพที่ 28 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดดำที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบการเกิด nodule formation (no) บริเวณท่อตับที่มีแบคทีเรียเข้าทำลาย (H&E, bar=100μm)



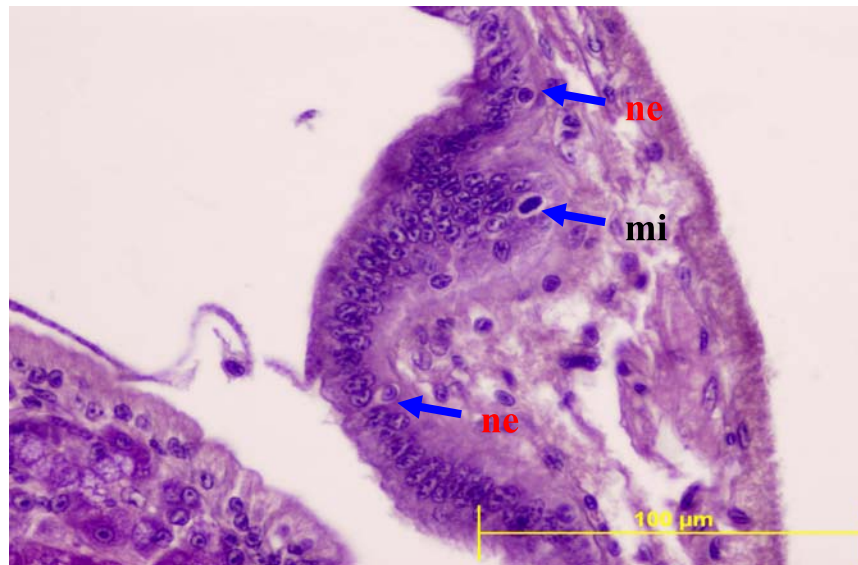
ภาพที่ 29 ส่วนของตับและตับอ่อนของกิ้งกูดดำที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบการเกิด melanization (me) (H&E, bar=50μm)



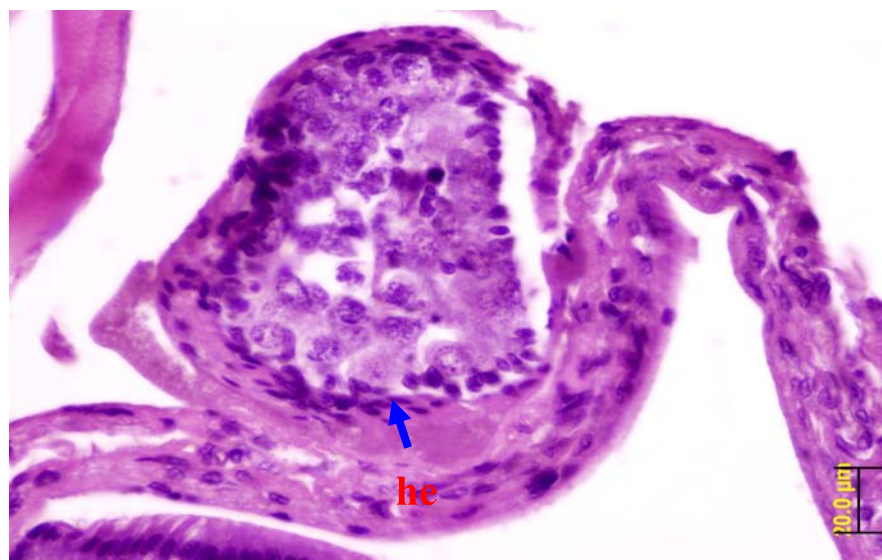
ภาพที่ 30 แสดงพยาธิกรีน (ลูกสรชี) ที่พบในส่วน lumen ของ midgut กุ้งกุลาดำที่มีอาการจี้ขาว จากฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี (H&E, bar=10µm)



ภาพที่ 31 ส่วนของ midgut กุ้งกุลาดำที่มีอาการจี้ขาว พบการตายของเซลล์เกิด pyknotic nuclei (pyk) และเกิด karyorhexis (kar) (H&E, bar=50µm)



ภาพที่ 32 ส่วนของ midgut ของกิ้งกูดำที่มีอาการซีขาว พบเซลล์ necrosis (ne) พบลักษณะการเกิด mitotic figure (mi) (H&E, bar=100μm)



ภาพที่ 33 ส่วนของ midgut กิ้งกูดำที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย พบการเกิด haemocytic infiltration (he) (H&E, bar=20μm)

สรุป

1. การศึกษาชนิดของปรสิตภายนอกของกึ่งกุลาคำที่มีอาการจี้ขาวในฟาร์มเลี้ยงกุ้งพื้นที่ความเค็มต่ำจำนวนทั้งหมด 9 ฟาร์ม 225 ตัวอย่าง พบปรสิต 1 ชนิด คือ *Zoothamnium* sp.
2. ผลการศึกษาชนิดของปรสิตภายในลำไส้ของกึ่งกุลาคำที่มีอาการจี้ขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจากทั้งหมด 9 ฟาร์ม 225 ตัวอย่าง พบ *Gregarina* sp. ในลำไส้ของกุ้งตัวอย่างจากพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี เพียงพื้นที่เดียวพบ จำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 5.8 เปอร์เซ็นต์ ของกุ้งทั้งหมดที่ทำการศึกษา
3. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งที่มีอาการจี้ขาว จากฟาร์มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำพบแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (non 01) และ *V. mimicus* โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่พบมากที่สุดคิดเป็น 34.1 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยเชื้อ *V. fluvialis* 33.3 เปอร์เซ็นต์, *V. alginolyticus* 10.4 เปอร์เซ็นต์, *V. cholerae* (non 01) 4.4 เปอร์เซ็นต์ และ *V. mimicus* 2.2 เปอร์เซ็นต์
4. การศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกึ่งกุลาคำที่มีอาการจี้ขาวซึ่งเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำที่ทำให้กึ่งกุลาคำตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (96 ชั่วโมง LD₅₀) ผลการศึกษาพบว่า *V. parahaemolyticus* ในพื้นที่ต่าง ๆ มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.89×10^6 - 4.47×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เชื้อ *V. fluvialis* มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 6.6×10^7 - 2.34×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เชื้อ *V. alginolyticus* มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 6.46×10^6 และ 1.55×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เชื้อ *V. cholerae* (non 01) มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.57×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ *V. mimicus* มีค่า LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 5.75×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
5. การศึกษากระบวนการเกิดโรคโดยทำการฉีดกลับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งที่มีอาการจี้ขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำโดยใช้ระดับความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งกุลาคำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 96 ชั่วโมง (LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *V. parahaemolyticus* *V. fluvialis* และ *V. alginolyticus* จากทุกพื้นที่มีผลทำให้กุ้งมีอาการจี้ขาว ในขณะที่การฉีดเชื้อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* (non 01) ไม่พบอาการจี้ขาวในกุ้งทดลอง

6. ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อถุงรกดำที่มีอาการเขียวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบการลดลงของเซลล์สะสมไขมัน (R-cell) ในตับและตับอ่อน เกิดการตายเป็นจำนวนมาก (multifocal necrosis) ของเซลล์เยื่อบุท่อตับและเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ การตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย พบการรวมกลุ่มของเม็ดเลือด (haemocyte aggregation) ในลักษณะ encapsulation , nodule formation และ เกิดขบวนการ melanization ในบริเวณที่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัญหาการเกิดโรคไข้หวัดในกุ้งขาวแวนนาไม เนื่องจาก กุ้งชนิดดังกล่าวเป็นที่นิยมเลี้ยงอย่างมากในปัจจุบัน อีกทั้งพฤติกรรมของกุ้งชนิดนี้ยังแตกต่างจาก กุ้งกุลาดำ ปัญหาอาการไข้หวัดที่เกิดขึ้นจึงน่าจะแตกต่างจากอาการไข้หวัดที่เกิดกับกุ้งกุลาดำ
2. การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ต้องควบคู่ไปกับการรักษาสภาพแวดล้อม ในบ่อให้ดี บางครั้งอาจต้องใช้ยาปฏิชีวนะไปพร้อมกัน อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะนั้นต้องทำ ด้วยความระมัดระวังอย่างยิ่ง ควรใช้ยาปฏิชีวนะที่ได้รับการอนุญาตจากกรมประมงเท่านั้น เพื่อ หลีกเลี่ยงปัญหาสารตกค้างในกุ้ง ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้ซื้อและการใช้ยาปฏิชีวนะบ่อยจะทำให้ เชื้อแบคทีเรียดื้อยานั้น ๆ ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ สุขมาตย์ และ สิทธิ บุญรัตน์ผลิน. 2539. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเซลล์ใน
กึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และ โรคตัวแดงดวงขาว. วารสารสงขลานครินทร์
ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 18 (1): 17-33.

กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2534. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำ.
เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 14/2534, ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน กองเพาะเลี้ยงสัตว์
น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 49 น.

จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุญรัตน์ผลิน, เรวัตร คงประดิษฐ์ และ อุษณีย์ เอกปฏิฐานพงศ์. 2538.
ไวรัสรูปแท่งสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวในกึ่งกลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2538,
สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 11 น.

_____. และ T. Itami. 2540. การตรวจวินิจฉัยโรคตัวแดงดวงขาว ของกึ่งที่เลี้ยงในแถบเอเชีย
ด้วยกล้องจุลทรรศน์และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 8/2540,
สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา. 16 น.

เจดียา โรจนศิริ. 2538. การศึกษาประสิทธิภาพของโรเมต-30 ในการป้องกันโรคไวรัสโอซิสในกึ่ง
กลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉันทนา แก้วดาปี. 2547. การตรวจหาเชื้อไวรัส MBV (Monodon Baculovirus) ในลูกกึ่งกลาดำวัย
อ่อน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 21/2547. 10 น.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000 คู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์เจริญรัฐ
การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 260 น.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุทิศกิจกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศ
ไทย. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติ
พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชเนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิม

พระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิฟับบลิเคชั่นจำกัด. 206 น.

ชลอ ลีมสุวรรณ, วราห์ เทพาหุดี, นิตี ชูเชิด และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. การเลี้ยงกุ้ง
กุลดำในระบบปิดต่าง ๆ. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักคณะกรรมการวิจัย
แห่งชาติ. 23 น.

ธนาทิพย์ แผลมคม. 2537. การศึกษาประสิทธิภาพของออกโซลินิคแอซิดในการป้องกันโรควิบริ
โอซิสในกุ้งกุลดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บพิธ จารุพันธุ์. 2546. โพรโทซัววิทยา. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. 425 น.

บรรจง เทียนส่องรัมย์. 2521. หลักการเลี้ยงกุ้งทะเล. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
117 น.

ประจวบ หล้าอุบล. 2530. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะ
ประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 48 น.

_____. ม.ป.ป. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม กุลดำ และระบบต่าง ๆ ของกุ้ง. ภาควิชา
วิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 น.

ประพนธ์ รักสินเจริญศักดิ์. 2535. การตกค้างและผลของยาปฏิชีวนะชนิดออกซีเตตราซัยคลินต่อ
การเจริญเติบโตและโรคกุ้งกุลดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประไพศิริ สิริกาญจน. 2546. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะ
ประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 270 น.

พยุง ภัทรกุลชัย. 2546. นโยบายการพัฒนากุ้งกุลดำคุณภาพเพื่อการบริโภคและการส่งออกใน
พื้นที่น้ำจืด. น. 53-62. ใน สุรศักดิ์ คิลกเกียรติ. กุ้งไทยก้าวหน้าใหม่.

เพ็ญศรี บุญตามช่วย และ อรอนงค์ คงทวี. 2548. ปริมาณและชนิดเชื้อไวรัสในตับกุ้งกุลาดำปกติ และในกุ้งกุลาดำป่วยในบ่อดิน. ใน การสัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ประจำปี 2548 ณ โรงแรมเซอร์มิเทจรีสอร์ทแอนด์สปา จังหวัดนครราชสีมาวันที่ 26-29 พฤษภาคม 2548.

พรชัย รุ่งศรี. 2546. ผลกระทบของกรีการีนต่อการเลี้ยงกุ้ง และแนวทางการจัดการ. แหล่งที่มา: <http://www.sittogroup.com/t-shrimp0756.html>, 15 มีนาคม 2549.

วรินชา วสินะเมฆินทร์. 2548. การศึกษาการติดเชื้อ *Monodon Baculovirus Hepatopancreatic Pavovirus* และพยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลืองในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิทธิ บุญยรัตผลิน, สถาพร ดิเรกบุษราคม, จิราพร เกษรจันทร์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, ไซยยุทธ จันทนชุกกลั่น และ กิจการ สุขมาตย์. 2535. *Baculovirus* สาเหตุของโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง วันที่ 16-18 กันยายน 2535 ณ สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด บางเขน. น. 200-205.

สุบงกช กำเนิดมณี. 2540. การศึกษาประสิทธิภาพของยานอร์ฟลอกซาซิน นิโคตินท ในการ ป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมฤดี ศิลาฤดี. 2545. การศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย, แพลงก์ตอนและคุณภาพน้ำในนาเกลือ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ ดันสุตะพานิช. 2536. แนวทางปฏิบัติการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด และระบบน้ำหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่. สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดเพชรบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง.

อมรรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. 2536. การศึกษาชนิดของไวรัส และการตกค้างของยาออกโซลิคแอซิดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Abrahama, T. J. and R. Palaniappan. 2003. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture** 232: 81-90.
- Alday-Sanz, V. , A. Rouge and J. F. Turnbull. 2002. Clearing mechanism of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aqua. Org.** 48: 91-99.
- Belcher, C. R. and P. R. Young. 1998. Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. **J. of Virol. Methods** 74: 21-29.
- Bell, T. A. and D. V. Lightner. 1988. **A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Bhat, S. G. and I. S. B. Singh. 1998. Vibrionaceae associated with the larvae and larval rearing system of *Macrobrachium rosenbergii*: systematics and pathogenicity, p. 225. In T. W. , Flegel ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**, Bangkok.
- Brock, J. K. and K. Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. **World Aquaculture Society**.
- Chanratchakool, P. 2004. Strategy for shrimp culture during price crisis. Aquatic Animal Health Research Institute, Thailand. Available source: <http://www.enaca.org/modules/news/article.php?storyid=446>, March 1, 2006.
- Clifford, H. C. 1985. Semi-intensive shrimp farming, pp. 13-40. In G. W. Chamberlain, M. G. Haby and R. J. Miget, eds. **Texas Shrimp Farming Manual, an Update on Current Technology**. Texas Agricultural Extension Service, Texas A&M University System, College Station, Texas.

- Costa, R. , I. Mermoud, S. Kobravi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Legroumellec and P. Grimont. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. **Dis. Aquat. Org.** 47: 1-12.
- Farmer, J. N. 1980. **The Protozoa: Introduction to Protozoology**. Department of Zoology, University of Okalahoma, Norman, Oklahoma.
- Flegel, T. W. , V. Thamawit, T. Pasharawipas and V. Alday-Sanz. 1999. Statistical correlation between severity of hepatopancreatic pavovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 174: 197-206.
- Flegel, T. W. , L. Nielsena, V. Thamavitb, S. Kongtimb and T. Pasharawipasc. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. **Aquaculture** 240: 55-68.
- Goarant, C. , J. Herlin, R. Brizard, A. L. Marteau, C. Martin and B. Martin. 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 40: 101-7.
- Gomez-Gil, B. , M. A. Herrera-Vega, F. A. Abreu-Grobois and A. Roque. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2318-2322.
- Graindorge, V. A.D. and T. W. Flegel. 1999. **Diagnosis of Shrimp Diseases with Emphasis on the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon***. Multimedia Asia.
- Harris, L. and L. Owens. 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. **Dis. Aquat. Org.** 38: 11-22.

- Humason, B. L. 1979. **Animal Tissue Techniques**. W. H. Freeman and Company, Sanfrancisco. 661 p.
- Ishimaru, K. , M. Akagawa-Matsushita and K. Muroga. 1995. *Vibrio penaeicida* a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). **J. Syst. Bacteriol.** 45: 134-138.
- Johnson, P. T. 1980. **Histology of Blue Crab, *Carinectes aspidus*: A Model for the Decapoda**. Praeger, New York. 440 p.
- Kudo, R. R. 1977. **Protozoology**. 5th ed. , Charles C. Thomas Pulisher, Springfield. 1174 p.
- Levine, N. D. , J. O. Corliss, F. E. G. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, III J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra and F. G. Wallace. 1980. A newly revised classification of the protozoa. **J. Protozool.** 27 (1): 37-58.
- Lightner, D. V. , R. M. Redman. ,D. W. Moore and M. A. Park. 1993. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic pavovirus of penaeid shrimp. **Aquaculture** 116: 15-23.
- Lightner, D. V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society.
- _____. 1988 a. Disease of culture penaeid shrimp and prawns,pp 15-23. In C. J. , Sinderman and D. V. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**.

- _____. 1988 b. Vibriosis of Penaeid Shrimp, pp. 42-47. *In* C. J. , Sindermann and D.V. Lightner, eds. **Disease Dignosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier Scince Oublishing Company, Inc. Newyork.
- _____. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic method, and management strategies. **J. Appl. Aquaculture** 9: 25-72.
- Lightner, D. V. and R. M. Redman. 1977. Histochemical demonstration of melanin in cellular inflammatory process of penaeid shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** 30: 298-302.
- _____. 1981. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture** 164: 201-220.
- Lom, J. and I. , Dykova 1992. Protozoan parasite of fish. **J. Fish. Dis.** 12: 151:156
- Lopez, J. H. , G. T. Galvan, M. F. Barajas and V. F. Albores. 1997. Isolation of *Vibrio* and *Pseudomonas* from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) intestine. **Rev. Latinoam Microbiol.** 39: 109-115.
- Nash, G. , C. Nithimathachock, C. Tungmandi, A. Arkarjamorn, P. Prathanpipat and P. Ruamthaveesub. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand, pp. 143-155. *In* M. , Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Authur, eds. **Diseases in Asian Aquaculture** . Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Nunan, L. M. , B. T. Poulos and D. V. Lightner. 1997. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture** 160 (1998): 19-30.
- Osmond, B. 2003. Parvoviridae. *In* The Universal Virus Data base. Available Source: <http://www.Ictvdb.Rothamsted.as.uk>, March 1, 2006.

Overstreet, R. M. 1973. Parasite of some penaeid shrimps with emphasis on reard hosts.

Aquaculture 2 (1973): 105-140.

Pantoja, C. R. and D. V. Lightner. 2002. Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. **Aquaculture** 218: 47-54.

Pitogo, C. R. L., M. C. L. Baticados, E. R. Cruz-Lacierda and L. D. De la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.

Pitogo, C. R. L. and L. D. De la Pena. 1998. Bacterial disease in shrimp (*Penaeus monodon*) culture in the Philippines. **Fish Pathol.** 33: 405-411.

Prosser, J. I. , K. Killham, L. A. Glover and E. A. S. Rattray. 1996. Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment. **Crit. Rev. in Biotech.** 16 (2): 157-183.

Ramasamy, P. , G. P. Brennanb and R. Jayakumar. 1994. A record and prevalence of *Monodon baculovirus* from postlarval *Penaeus monodon* in Madras, India. **Aquaculture** 130 (1995): 129-135.

Reed, L. J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. **Am. J. Hug.** 27: 493-497.

Saulnier, D. , P. Haffner, C. Goarant, P. Levy and D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture** 191: 133-144.

Sindermann, C. J. 1971. Internal defences of crustacean: a review. **Fish. Bull.** 69: 455-489.

- _____. 1990. **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish**, 2 eds. Academic Press, Academic Press.
- Smith, V. J. and N. A. Ratcliffe. 1976. Defensive reactions of the shore crab *Carcinus maenus*, to foreign particle, pp. 312-313. In T. A. Angus, P. Faulkener and A. Rosenfield, eds. **Proceedings of the first International Colloquium on Invertebrate Pathology**.
- Sung, H. H. , H. C. Li, F. M. Tsai, Y. Y. Ting and W. L. Chao. 1998. Chang in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus vannamei*.) cultivation and in hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 236: 261-271 .
- Sung, H. H. , S. F. Hsu, C. K. Chen, Y. Y. Ting and W. L. Chao. 2000. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture** 192: 101-110.
- Suwanto, A. , M. Yuhana, E. Herawaty and A. S. L. 1998. Genetic diversity of luminous *Vibrio* isolate from shrimp larvae, pp. 217-224. In T. W. , Flegel, ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Tacon, A. G. J. 2002. Thematic review of feed and feed management practices in shrimp aquaculture, p. 69. In The World Bank, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific [NACA], World Wildlife Fund [WWF] and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium.

Tendencia, E. V. A. and L. A. Dureza. 1996. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. **Aquaculture** 154: 107-114.

Vattanaviboon, P. and S. Mongkolsuk. 2001. Unusual adaptive, cross protection responses and growth phase resistance against peroxide killing in a bacterial shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **FEMS Microbiol. Letters** 200: 111-116.

Yamamoto, K. , Y. Takeda, T. Miwatani, and J. P. Craig. 1983. Evidence that a non-O1 *Vibrio cholerae* produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. **Infect. Immun.** 41:896-901.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียและวิธีทดสอบเชื้อ *V. cholerae*
(non 01)

ตารางผนวกที่ ก 1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

การทดสอบ	ชนิดของแบคทีเรีย		
	<i>V. parahaemolyticus</i> (บางแพ)	<i>V. parahaemolyticus</i> (ดอนตูม)	<i>V. parahaemolyticus</i> (แหลมสิงห์ 1)
ONPG	-	-	-
Arginine decarboxylase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Citrate	-	-	+
H ₂ S	-	-	-
Ureas	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole	+	+	+
Acetoin production	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Glucose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	+
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	+	+	-
Arabinose	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Nitrite	+	+	+
Nitrogen	-	-	-
Mobility	+	+	+
MacConkey	+	+	+
Oxidation	+	+	+
Fermentation	+	+	+

ตารางผนวกที่ ก 1 (ต่อ)

การทดสอบ	ชนิดของแบคทีเรีย		
	<i>V. parahaemolyticus</i> (แหลมสิงห์ 2)	<i>V. parahaemolyticus</i> (บางเลน 1)	<i>V. parahaemolyticus</i> (บางเลน 2)
ONPG	-	-	-
Arginine decarboxylase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Citrate	-	+	-
H ₂ S	-	-	-
Ureas	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole	+	+	+
Acetoin production	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Glucose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	+
Amygdalin	+	-	+
Arabinose	-	+	+
Oxidase	+	+	+
Nitrite	+	+	+
Nitrogen	-	-	-
Mobility	+	+	+
MacConkey	+	+	+
Oxidation	+	+	+
Fermentation	+	+	+

ตารางผนวกที่ ก 1 (ต่อ)

การทดสอบ	ชนิดของแบคทีเรีย		
	<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 1)	<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 2)	<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 3)
ONPG	+	-	+
Arginine decarboxylase	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Ureas	-	+	+
Tryptophane deaminase	+	-	-
Indole	+	+	+
Acetoin production	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
Glucose	+	+	+
Manitol	+	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	+	-	-
Sucrose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	+	-	-
Arabinose	-	+	-
Oxidase	+	+	+
Nitrite	+	+	+
Nitrogen	+	-	-
Mobility	+	+	+
MacConkey	-	+	+
Oxidation	+	+	+
Fermentation	+	+	+

ตารางผนวกที่ ก 1 (ต่อ)

การทดสอบ	ชนิดของแบคทีเรีย		
	<i>V. fluvialis</i> (ແຫລມສິງ 4)	<i>V. fluvialis</i> (ນາຍາຍອາມ)	<i>V. alginolyticus</i> (ບາງແພ)
ONPG	+	-	-
Arginine decarboxylase	-	+	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Ureas	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole	+	+	+
Acetoin production	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
Glucose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	+	+	-
Arabinose	-	+	-
Oxidase	+	+	+
Nitrite	+	+	+
Nitrogen	-	-	-
Mobility	+	+	+
MacConkey	+	+	+
Oxidation	+	+	+
Fermentation	+	+	+

ตารางผนวกที่ ก.1 (ต่อ)

การทดสอบ	ชนิดของแบคทีเรีย		
	<i>V. alginolyticus</i> (บางเลน 2)	<i>V. mimicus</i> (บางเลน 2)	<i>V. cholerae</i> (non 01)
ONPG	-	+	+
Arginine decarboxylase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+
Citrate	-	-	+
H ₂ S	-	-	-
Ureas	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	+	-
Indole	+	+	+
Acetoin production	-	-	+
Gelatinase	+	+	+
Glucose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	+	-	+
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	-	-	+
Arabinose	-	+	-
Oxidase	+	+	+
Nitrite	+	+	+
Nitrogen	-	-	-
Mobility	+	+	+
MacConkey	+	+	+
Oxidation	+	+	+
Fermentation	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย+หมายถึงให้ผล positive, เครื่องหมาย-หมายถึงให้ผล negative

วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *V. cholerae* (non 01)

การวินิจฉัยครั้งนี้จะใช้ชุดทดสอบ Serotest ของบริษัทไบโอเทค เคมีคัล จำกัด โดยเชื้อที่จะทดสอบต้องผ่านการทดสอบทาง Biochemical test มาก่อน และทดสอบดังต่อไปนี้

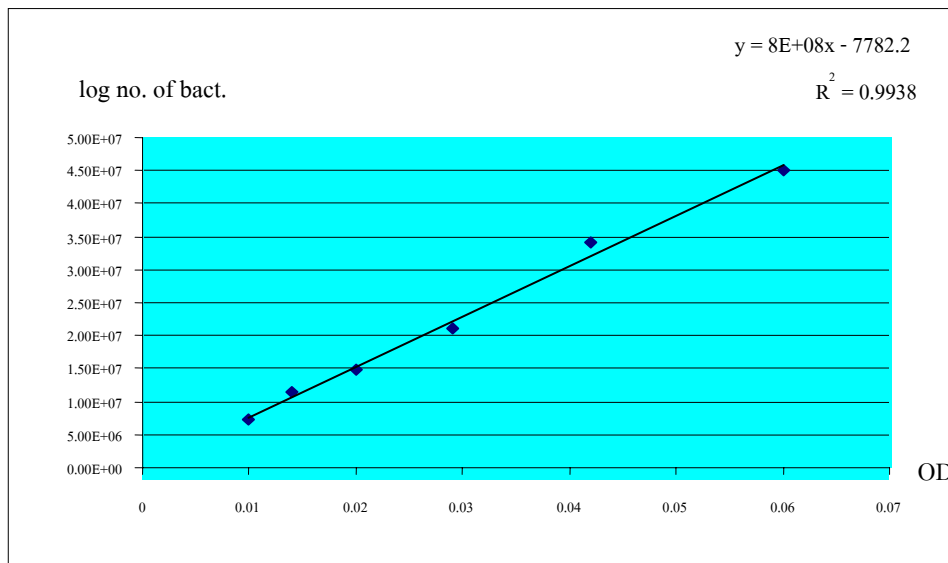
1. หยด *V. cholerae* 01 Polyvalent Antiserum และใช้น้ำเกลือเป็นกลุ่มควบคุม อย่างละ 1 หยด ลงบนสไลด์ ที่ใสสะอาด

2. ใช้ Platinum wire ตักเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนเล็กน้อย นำมาผสมกับ Antiserum และ น้ำเกลือ เขียงสไลด์กลับไปมาประมาณ 1 นาที

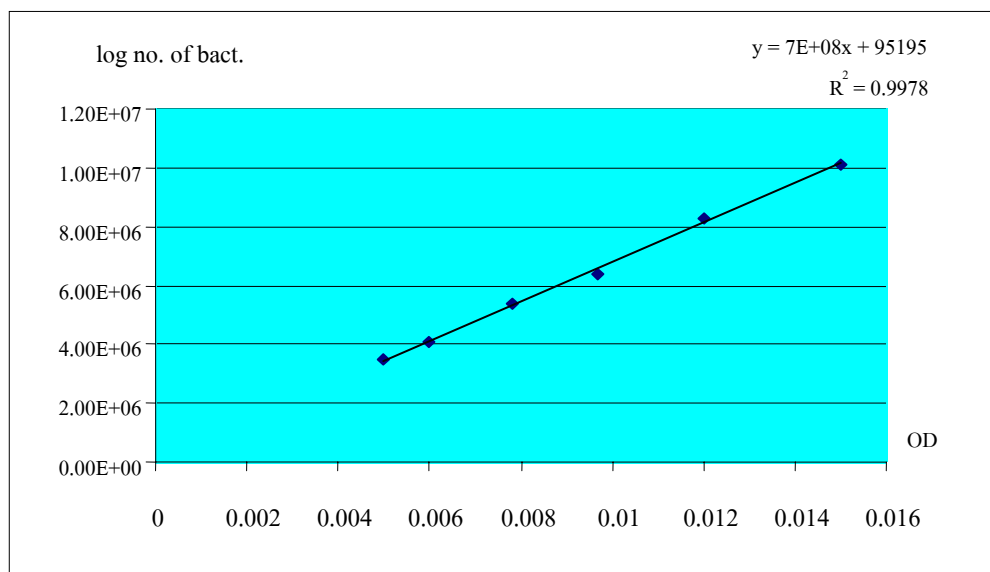
3. อ่านผลการเกิด Agglutination ถ้าให้ผล positive *V. cholerae* 01 Polyvalent Antiserum และน้ำเกลือ ถ้าให้ผล negative ทดสอบเชื้อนี้ต่อด้วย monospecific Inaba และ monospecific Ogawa antiserum

ภาคผนวก ข

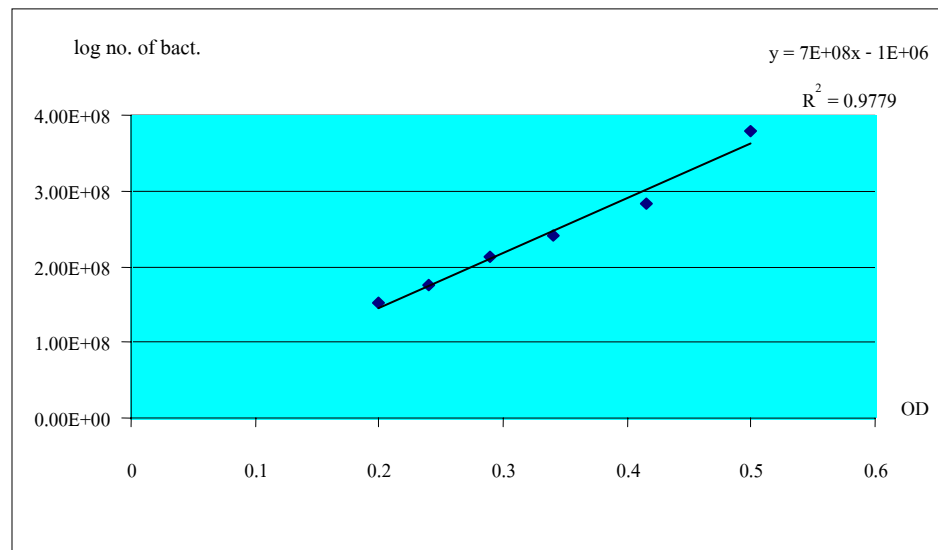
แสดง standard curve ของเชื้อแบคทีเรียและระดับค่า O.D. ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ



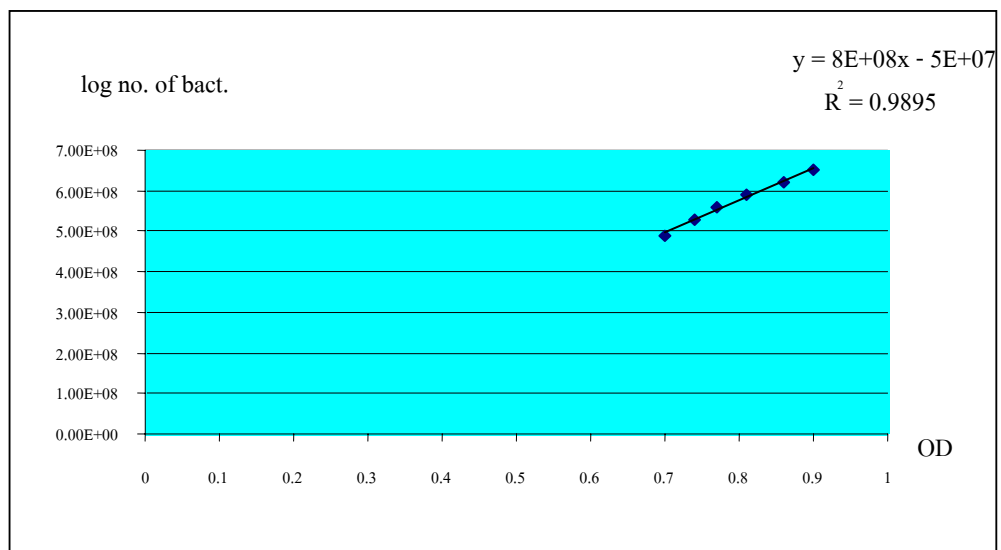
ภาพผนวกที่ ข 1 standard curve ของ *V. parahaemolyticus*



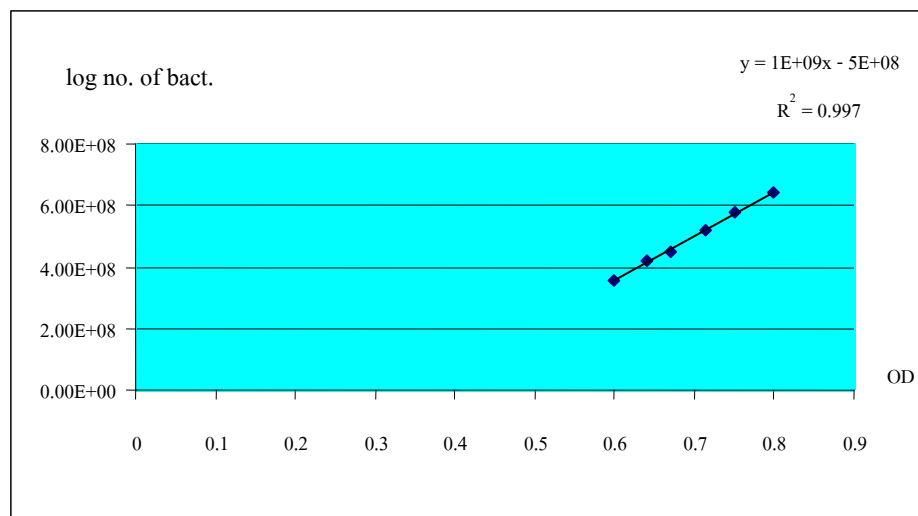
ภาพผนวกที่ ข 2 standard curve ของ *V. alginolyticus*



ภาพผนวกที่ ข 3 standard curve ของ *V. fluvialis*



ภาพผนวกที่ ข 4 standard curve ของ *V. mimicus*



ภาพผนวกที่ ข 5 standard curve ของ *V. cholerae* (non 01)

ตารางผนวกที่ ข.1 ระดับค่า O.D. ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ฉีดกึ่งกลาดำ

ชนิดของแบคทีเรีย	ระดับค่า O.D. ที่					
	1	2	3	4	5	6
<i>V. parahaemolyticus</i> (บางแพ)	0.01	0.014	0.02	0.029	0.042	0.06
<i>V. parahaemolyticus</i> (แหลมสิงห์ 1)	0.01	0.014	0.019	0.026	0.036	0.05
<i>V. parahaemolyticus</i> (แหลมสิงห์ 2)	0.02	0.028	0.038	0.053	0.072	0.1
<i>V. parahaemolyticus</i> (บางเลน 1)	0.02	0.028	0.038	0.053	0.072	0.1
<i>V. parahaemolyticus</i> (บางเลน 2)	0.02	0.028	0.038	0.053	0.072	0.1
<i>V. parahaemolyticus</i> (คอนตูม)	0.001	0.0019	0.0036	0.0069	0.013	0.025
<i>V. alginolyticus</i> (บางแพ)	0.005	0.006	0.0078	0.0097	0.012	0.015
<i>V. alginolyticus</i> (บางเลน 2)	0.001	0.0014	0.0019	0.0026	0.0036	0.005
<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 1)	0.005	0.066	0.087	0.115	0.152	0.2
<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 2)	0.2	0.24	0.29	0.35	0.42	0.5
<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 3)	0.2	0.25	0.31	0.39	0.48	0.6
<i>V. fluvialis</i> (แหลมสิงห์ 4)	0.2	0.24	0.29	0.35	0.42	0.5
<i>V. fluvialis</i> (นายายอาม)	0.15	0.17	0.2	0.23	0.26	0.3
<i>V. cholerae</i> (non 01)(คอนตูม)	0.6	0.64	0.67	0.714	0.75	0.8
<i>V. mimicus</i> (บางเลน 1)	0.7	0.74	0.77	0.81	0.86	0.9

ภาคผนวก ค

เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกิ้งกูดำและการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD_{50} ตาม
วิธีของ Reed-Muench (1938)

ตารางผนวกที่ ค 1 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
7.2×10^6	10	0	0	0	0
1.15×10^7	10	0	0	0	20
1.48×10^7	10	0	0	20	80
2.11×10^7	10	0	0	40	60
3.4×10^7	10	0	20	40	60
4.5×10^7	10	50	60	90	100

ตารางผนวกที่ ค 2 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. alginolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ อำเภอบางแพ จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
3.47×10^6	10	0	0	0	0
4.1×10^6	10	0	0	0	10
5.37×10^6	10	0	0	20	30
6.4×10^6	10	0	0	40	40
8.3×10^6	10	0	20	40	70
1.01×10^7	10	80	80	90	100

ตารางผนวกที่ ค 3 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
7.9×10^5	10	0	0	0	0
1.51×10^6	10	0	0	20	20
2.87×10^6	10	0	20	30	30
5.51×10^6	10	0	0	40	50
1.04×10^6	10	0	20	40	70
2.0×10^7	10	50	60	90	100

ตารางผนวกที่ ค 4 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. cholerae* (non 01) ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
3.55×10^8	10	0	0	0	0
4.2×10^8	10	0	0	0	30
4.5×10^8	10	0	0	20	50
5.2×10^8	10	0	0	40	70
5.8×10^8	10	0	40	80	80
6.4×10^8	10	70	90	90	100

ตารางผนวกที่ ค 5 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
7.99×10^6	10	0	0	0	0
1.12×10^7	10	0	0	0	20
1.52×10^7	10	0	20	40	40
2.08×10^7	10	0	30	40	70
2.88×10^7	10	0	20	40	80
4.0×10^7	10	50	90	90	100

ตารางผนวกที่ ค 6 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. fluvialis* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
3.4×10^7	10	0	0	0	0
4.52×10^7	10	0	0	10	10
5.99×10^7	10	0	0	20	40
7.05×10^7	10	0	0	40	60
1.05×10^8	10	0	20	40	80
1.39×10^8	10	90	90	90	100

ตารางผนวกที่ ค 7 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.6×10^7	10	0	0	0	0
2.24×10^7	10	0	10	10	10
3.04×10^7	10	0	30	30	30
4.24×10^7	10	0	20	30	50
5.76×10^7	10	0	20	40	80
8.0×10^7	10	80	80	90	100

ตารางผนวกที่ ค 8 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. fluvialis* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.39×10^8	10	0	0	0	0
1.67×10^8	10	0	0	20	20
2.02×10^8	10	0	0	20	50
2.44×10^8	10	0	0	40	70
2.94×10^8	10	0	40	80	90
3.49×10^8	10	70	70	90	100

ตารางผนวกที่ ค 9 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.6×10^7	10	0	0	0	0
2.24×10^7	10	0	0	0	20
3.04×10^7	10	0	0	20	40
4.24×10^7	10	0	0	40	60
5.76×10^7	10	0	20	40	80
8.0×10^7	10	70	70	90	100

ตารางผนวกที่ ค 10 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. mimicus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
4.9×10^8	10	0	0	0	0
5.3×10^8	10	0	0	0	20
5.6×10^8	10	0	0	20	40
5.9×10^8	10	0	20	50	50
6.2×10^8	10	0	20	50	80
6.5×10^8	10	60	80	90	100

ตารางผนวกที่ ค 11 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.6×10^7	10	0	0	0	0
2.24×10^7	10	0	0	10	10
3.04×10^7	10	0	0	20	20
4.24×10^7	10	0	0	40	40
5.76×10^7	10	0	20	40	70
8.0×10^7	10	50	90	90	100

ตารางผนวกที่ ค 12 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. alginolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
7.95×10^5	10	0	0	0	0
1.06×10^6	10	0	0	0	10
1.43×10^6	10	0	0	20	30
1.92×10^6	10	0	10	40	60
2.62×10^6	10	10	20	40	80
3.6×10^6	10	70	80	90	100

ตารางผนวกที่ ค 13 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. fluvilis* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 3 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.39×10^8	10	0	0	0	0
1.67×10^8	10	0	0	0	10
2.02×10^8	10	0	0	20	30
2.44×10^8	10	0	0	40	50
2.94×10^8	10	0	20	40	70
3.49×10^8	10	60	60	90	100

ตารางผนวกที่ ค 14 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. fluvilis* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 4 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.51×10^8	10	0	0	0	0
1.75×10^8	10	0	0	0	20
2.12×10^8	10	0	0	20	40
2.41×10^8	10	0	0	40	70
2.82×10^8	10	0	20	60	90
3.8×10^8	10	60	60	90	100

ตารางผนวกที่ ค 15 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ฉีดด้วย *V. fluvilis* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนกุ้งกุลาดำที่ใช้ ทดลอง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (ชั่วโมง)			
		24	48	72	96
0	10	0	0	0	0
1.04×10^8	10	0	0	0	0
1.18×10^8	10	0	0	0	10
1.39×10^8	10	0	0	20	40
1.6×10^8	10	0	0	40	60
1.81×10^8	10	0	20	60	80
2.09×10^8	10	60	60	90	100

ตารางผนวกที่ ค 16 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาว ในพื้นที่อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี

Concentration of <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	38	38	0
7.2×10^6	6.85	10	0	10	0	28	28	0
1.15×10^7	7.06	10	2	8	2	18	20	10
1.48×10^7	7.17	10	8	2	10	10	20	50
2.11×10^7	7.32	10	6	4	16	8	24	66.67
3.4×10^7	7.53	10	6	4	22	4	26	84.62
4.5×10^7	7.65	10	10	0	32	0	32	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below } 50 \% \text{ mortality} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality-mortality above } 50 \% \text{ below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 7.06 + \left| \frac{50 - 10}{66.67 - 10} \right| \times (7.32 - 7.06) \\ &= 7.24 \\ &= \text{Antilog } 7.24 \\ &= 1.74 \times 10^7 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.74x10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 17 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งแยกได้จากกุ้งที่มีอาการจีขาว ในพื้นที่อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี

Concentration of <i>V.</i> <i>alginolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	45	45	0
3.47x10 ⁶	6.54	10	0	10	0	35	35	0
4.1x10 ⁶	6.61	10	1	9	1	25	26	3.85
5.37x10 ⁶	6.73	10	3	7	4	16	20	20
6.4x10 ⁶	6.81	10	4	6	8	9	17	47.06
8.3x10 ⁶	6.92	10	7	3	15	3	18	83.33
1.01x10 ⁷	7.0	10	10	0	25	0	25	100

n = number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality} - \text{mortality}} \right| \left| \frac{\log \text{conc} - \log \text{conc}}{\text{above } 50 \% \quad \text{below } 50 \%} \right| \\ &= 6.81 + \left| \frac{50 - 47.06}{83.33 - 47.06} \right| \times (6.92 - 6.81) \\ &= 6.81 \\ &= \text{Antilog } 6.81 \\ &= 6.46 \times 10^6 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 6.46x10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 18 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง
แยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่อำเภอคอนตูม จังหวัดนครปฐม

Concentration of <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	43	43	0
7.9x10 ⁵	5.9	10	0	10	0	33	33	0
1.51x10 ⁶	6.18	10	2	8	2	23	25	8
2.87x10 ⁶	6.46	10	3	7	5	15	20	25
5.51x10 ⁶	6.74	10	5	5	10	8	18	55.5
1.04x10 ⁷	7.02	10	7	3	17	3	20	85
2.0x10 ⁷	7.3	10	10	0	27	0	27	100

n = number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality} - \text{mortality above } 50 \% \quad \text{below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 6.46 + \left| \frac{50 - 25}{55.5 - 25} \right| \times (6.74 - 6.46) \\ &= 6.69 \\ &= \text{Antilog } 6.69 \\ &= 4.89 \times 10^6 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 4.89x10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 19 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. cholerae* (non 01)
ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม

Concentration of <i>V.</i> <i>cholerae</i> (non 01)	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	37	37	0
3.55x10 ⁸	8.55	10	0	10	0	27	27	0
4.2x10 ⁸	8.62	10	3	7	3	17	20	15
4.5x10 ⁸	8.65	10	5	5	8	10	18	44.4
5.2x10 ⁸	8.72	10	7	3	15	5	20	75
5.8x10 ⁸	8.76	10	8	2	23	2	25	92
6.4x10 ⁸	8.81	10	10	0	33	0	33	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 8.65 + \left| \frac{50 - 44.4}{75 - 44.4} \right| \times (8.72 - 8.65) \\ &= 8.66 \\ &= \text{Antilog } 8.66 \\ &= 4.57 \times 10^8 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 4.57x10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 20 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง
แยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	39	39	0
7.99x10 ⁶	6.9	10	0	10	0	29	29	0
1.12x10 ⁷	7.05	10	2	8	2	19	21	9.5
1.52x10 ⁷	7.18	10	4	6	6	11	17	35.3
2.08x10 ⁷	7.32	10	7	3	13	5	18	72.2
2.88x10 ⁷	7.46	10	8	2	21	2	23	91.3
4.0x10 ⁷	7.6	10	10	0	31	0	31	100

n = number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 7.18 + \left| \frac{50 - 35.3}{72.2 - 35.3} \right| \times (7.32 - 7.18) \\ &= 7.24 \\ &= \text{Antilog } 7.24 \\ &= 1.74 \times 10^7 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.74x10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 21 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. fluvialis* ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V. fluvialis</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	41	41	0
3.4x10 ⁷	7.53	10	0	10	0	31	31	0
4.52x10 ⁷	7.66	10	1	9	1	21	22	4.54
5.99x10 ⁷	7.77	10	4	6	5	12	17	29.41
7.05x10 ⁷	7.85	10	6	4	11	6	17	64.71
1.05x10 ⁸	8.02	10	8	2	19	2	21	90.48
1.39x10 ⁸	8.14	10	10	0	29	0	29	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \frac{\log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \\ &= 7.77 + \left| \frac{50 - 29.41}{64.71 - 29.41} \right| \times (7.85 - 7.77) \\ &= 7.82 \\ &= \text{Antilog } 7.82 \\ &= 6.6 \times 10^7 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 6.6x10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 22 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง
แยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	43	43	0
1.6x10 ⁷	6.20	10	0	10	0	33	33	0
2.24x10 ⁷	7.35	10	1	9	1	23	24	4.17
3.04x10 ⁷	7.48	10	3	7	4	14	18	22.22
4.24x10 ⁷	7.63	10	5	5	9	7	16	56.25
5.76x10 ⁷	7.76	10	8	2	17	2	19	89.47
8.0x10 ⁷	7.90	10	10	0	27	0	27	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 7.48 + \left| \frac{50 - 22.22}{56.25 - 22.22} \right| \times (7.63 - 7.48) \\ &= 7.6 \\ &= \text{Antilog } 7.6 \\ &= 3.98 \times 10^7 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.98×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 23 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. fluvialis* ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V.</i> <i>fluvialis</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	37	37	0
1.39x10 ⁸	8.14	10	0	10	0	27	27	0
1.67x10 ⁸	8.22	10	2	8	2	17	19	10.53
2.02x10 ⁸	8.31	10	5	5	7	9	16	43.75
2.44x10 ⁸	8.38	10	7	3	14	4	18	77.77
2.94x10 ⁸	8.47	10	9	1	23	1	24	95.83
3.49x10 ⁸	8.54	10	10	0	33	0	33	100

n = number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 8.31 + \left| \frac{50 - 43.75}{77.7 - 43.75} \right| \times (8.38 - 8.31) \\ &= 8.32 \\ &= \text{Antilog } 8.32 \\ &= 2.09 \times 10^8 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.09x10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 24 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง
แยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม

Concentration of <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	40	40	0
1.6x10 ⁷	6.20	10	0	10	0	30	30	0
2.24x10 ⁷	7.35	10	2	8	2	20	22	9.09
3.04x10 ⁷	7.48	10	4	6	6	12	18	33.33
4.24 x10 ⁷	7.63	10	6	4	12	6	18	66.66
5.76x10 ⁷	7.76	10	8	2	20	2	22	90.91
8.0x10 ⁷	7.9	10	10	0	30	0	30	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 7.48 + \left| \frac{50 - 33.33}{66.66 - 33.33} \right| \times (7.63 - 7.48) \\ &= 7.56 \\ &= \text{Antilog } 7.56 \\ &= 3.63 \times 10^7 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.63x10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 25 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. mimicus* ซึ่งแยกจากกุ้ง
ที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 1 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม

Concentration of <i>V.</i> <i>mimicus</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	41	41	0
4.9x10 ⁸	8.69	10	0	10	0	31	31	0
5.3x10 ⁸	8.72	10	2	8	2	21	23	8.70
5.6x10 ⁸	8.75	10	4	6	6	13	19	31.58
5.9x10 ⁸	8.77	10	5	5	11	7	18	61.11
6.2x10 ⁸	8.79	10	8	2	19	2	21	90.48
6.5x10 ⁸	8.81	10	10	0	29	0	29	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \frac{\log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \\ &= 8.75 + \left| \frac{50 - 31.58}{61.11 - 31.58} \right| \times (8.77 - 8.75) \\ &= 8.76 \\ &= \text{Antilog } 8.76 \\ &= 5.75 \times 10^8 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 5.75x10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 26 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่ง
แยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม

Concentration of <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> เซลล์ต่อมิลลิลิตร	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
0	0	10	0	10	0	47	47	0
1.6x10 ⁷	6.20	10	0	10	0	37	37	0
2.24x10 ⁷	7.35	10	1	9	1	27	28	3.57
3.04x10 ⁷	7.48	10	2	8	3	17	20	15
4.24x10 ⁷	7.63	10	4	6	7	9	16	43.75
5.76x10 ⁷	7.76	10	7	3	14	3	17	82.35
8x10 ⁷	7.90	10	10	0	24	0	24	100

n = number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 7.63 + \left| \frac{50 - 43.75}{82.35 - 43.75} \right| \times (7.76 - 7.63) \\ &= 7.65 \\ &= \text{Antilog } 7.65 \\ &= 4.47 \times 10^7 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 4.47x10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 27 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 2 อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม

Concentration of <i>V. alginolyticus</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	42	42	0
7.95x10 ⁵	5.90	10	0	10	0	32	32	0
1.08x10 ⁶	6.03	10	1	9	1	22	23	4.35
1.43x10 ⁶	6.16	10	3	7	4	13	17	23.53
1.92x10 ⁶	6.20	10	6	4	10	6	16	62.5
2.62x10 ⁶	6.40	10	8	2	18	2	20	90
3.6x10 ⁶	6.55	10	10	0	28	0	28	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 6.16 + \left| \frac{50 - 23.53}{62.5 - 23.53} \right| \times (6.2 - 6.16) \\ &= 6.19 \\ &= \text{Antilog } 6.19 \\ &= 1.55 \times 10^6 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.55×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 28 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. fluvialis* ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 3 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V. fluvialis</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	44	44	0
1.39x10 ⁸	8.14	10	0	10	0	34	34	0
1.67x10 ⁸	8.22	10	1	9	1	24	25	4
2.02x10 ⁸	8.31	10	3	7	4	15	19	21.05
2.44x10 ⁸	8.38	10	5	5	9	8	17	52.94
2.94x10 ⁸	8.47	10	7	3	16	3	19	84.21
3.49x10 ⁸	8.54	10	10	0	26	0	26	100

n = number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 8.31 + \left| \frac{50 - 21.05}{52.94 - 21.05} \right| \times (8.38 - 8.31) \\ &= 8.37 \\ &= \text{Antilog } 8.37 \\ &= 2.34 \times 10^8 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.34x10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 29 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. fluvialis* ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ฟาร์ม 4 อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V. fluvialis</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	38	38	0
1.51x10 ⁸	8.18	10	0	10	0	28	28	0
1.75x10 ⁸	8.24	10	2	8	2	18	20	10
2.12x10 ⁸	8.33	10	4	6	6	10	16	37.5
2.41x10 ⁸	8.38	10	7	3	13	4	17	76.47
2.82x10 ⁸	8.45	10	9	1	22	1	23	95.65
3.80x10 ⁸	8.58	10	10	0	32	0	32	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \% \right| \\ &= 8.33 + \left| \frac{50 - 37.5}{76.47 - 37.5} \right| \times (8.38 - 8.33) \\ &= 8.35 \\ &= \text{Antilog } 8.35 \\ &= 2.24 \times 10^8 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.24x10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค 30 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา 96 ชั่วโมง LD₅₀ ของเชื้อ *V. fluvialis* ซึ่งแยกจากกุ้งที่มีอาการจีขาวในพื้นที่ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี

Concentration of <i>V. fluvialis</i>	Log dose	n dose	No. dead	No. alive	Acculated dead	Accumulated alive	Total	Cumulative Percentage
เซลล์ต่อมิลลิลิตร								
0	0	10	0	10	0	41	41	0
1.04x10 ⁸	8.01	10	0	10	0	31	31	0
1.18x10 ⁸	8.07	10	1	9	1	21	22	4.55
1.39x10 ⁸	8.14	10	4	6	5	12	17	29.41
1.60x10 ⁸	8.20	10	6	4	11	6	17	64.71
1.81x10 ⁸	8.26	10	8	2	19	2	21	90.48
2.09x10 ⁸	8.32	10	10	0	29	0	29	100

n=number of test shrimp per concentration

วิธีการคำนวณหาค่า LD₅₀

1. วิธีการคำนวณหาค่า Cumulative percentage mortality จากสูตร

$$\text{Cumulative percentage mortality} = \frac{\text{Accumulated dead} \times 100}{\text{Total}}$$

2. การคำนวณหาค่า LD₅₀ จากสูตร

$$\begin{aligned} \text{LD}_{50} &= \log \text{conc. below} + \left| \frac{50 - \text{mortality below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \left| \frac{\log \text{conc above } 50 \% - \log \text{conc below } 50 \%}{\text{mortality above } 50 \% - \text{mortality below } 50 \%} \right| \\ &= 8.14 + \left| \frac{50 - 29.41}{64.71 - 29.41} \right| \times (8.20 - 8.14) \\ &= 8.17 \\ &= \text{Antilog } 8.17 \\ &= 1.49 \times 10^8 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น LD₅₀ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.49x10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อและสารเคมีต่าง ๆ

การเตรียมสารเคมี

1. Modified Davidson Fixative หรือ HCl Davidson Fixative

-50 % HCl (V/V)	115	มิลลิลิตร
-95 % Ethyl alcohol	330	มิลลิลิตร
-100 % Formalin (Formaldehyde 37-39 %)	220	มิลลิลิตร
-น้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง	335	มิลลิลิตร

2. สี Haematoxylin crystals

-Haematoxylin crystals	1.0	กรัม
-Sodium iodate	0.8	กรัม
-Potassium aluminium sulfate	200.0	กรัม
-Citric acid	1.0	กรัม
-Chloral hydrate	200.0	กรัม
- น้ำกลั่น	2,000.0	มิลลิลิตร

ละลาย alum ในน้ำแล้วเติม Haematoxylin ที่ละลายแล้วลงไปผสมให้เข้ากันแล้วเติม sodium iodate citric acid และ chloral hydrate ตามลำดับ เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วจะได้สีม่วงอมแดง ควรเก็บไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้

3. สี Eosin 0.3 %

-Eosin Y	0.9	กรัม
-35 % ethy alcohol	300.0	มิลลิลิตร
-glacial acetic acid	1.5	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อ

1. ทำการคงตัวอย่าง (Fixation) โดยตัวอย่างจะถูกคงในน้ำยา Davidson's fixative โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ แช่ตัวอย่างในน้ำยาคงประมาณ 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะย้ายไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเตรียมตัวอย่างขั้นต่อไป

2. ตัดชิ้นเนื้อกึ่งกลาดเฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษาได้แก่บริเวณตับและตับอ่อนและบริเวณลำไส้ นำชิ้นส่วนที่ต้องการศึกษาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) ดังนี้

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

3. นำชิ้นเนื้อมาวางในพิมพ์ (molds) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (Parafin embedding) แล้วนำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วซ้อนด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์แล้ว นำมาซ่อมสีตามขั้นตอนดังนี้

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

7. ทำการ permount

ผล: นิเวศวิทย ดิคส์น้ำเงิน

ไซโตพลาสซึม เป็นสีชมพูถึงแดง