

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ตารางข้อมูล



ผลการเสริมน้ำพืชสมุนไพรในอาหารต่อการรอดตายและเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม
โดยการใช้ น้ำพืชสมุนไพร 5 ชนิด สกัดด้วยน้ำเสริมอาหารกุ้ง เพื่อหา

1. การเจริญเติบโต การใช้อาหารและอัตราการรอดตาย ของกุ้งขาวแวนนาไม
2. คุณภาพน้ำในถังทดลอง
3. ปริมาณแบคทีเรีย วิบริโอโคโลนีสีเหลืองและสีเขียวในถังทดลอง



ตารางที่ ก 1 ตารางการให้อาหารลูกกุ้งจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

สัปดาห์	น้ำหนักลูกกุ้ง	ลูกกุ้งรอด	%การให้อาหาร	จำนวนอาหาร/มือ	มือ	เบอร์อาหาร	ปริมาณอาหาร7วัน (จำนวนอาหาร/มือ/วัน/ซ้ำ)
0	0.004	18	100%	0.09	2	เบอร์1เสริม Flask 4:1	$0.09 \times 2 \times 7 \times 4 = 5.04$
1	0.02	17	100%	0.09	2	เบอร์901	$0.09 \times 2 \times 7 \times 4 = 5.04$
2	0.09	17	20%	0.10	3	เบอร์901	$0.10 \times 3 \times 7 \times 4 = 8.40$
3	0.21	17	15%	0.18	3	เบอร์901เสริมเบอร์902 4:1	$0.18 \times 3 \times 7 \times 4 = 15.12$
4	0.40	17	15%	0.34	2 - 3	เบอร์1เสริมเบอร์902 1:4	$0.34 \times 3 \times 7 \times 4 = 28.56 - 0.34 \times 6 \times 4 (8.16)$ $= 20.40$
5	0.68	17	15%	0.43	2 - 3	เบอร์902	$0.86 \div 2 = 0.43 \times 2 \times 7 \times 4 = 24.08 + 0.43 \times 3 \times 4$ $(5.16) = 29.24$
6	1.02	17	12%	0.69	3	เบอร์902	$0.69 \times 3 \times 7 \times 4 = 57.96$
7	1.79	17	11%	1.12	1 - 2	เบอร์902	$1.12 \times 1 \times 7 \times 4 = 31.36 + 1.12 \times 5 \times 4 (22.40)$ $= 53.76$
8	2.48	17	10%	2.11	2	เบอร์902เสริมเบอร์903 4:1	$2.11 \times 2 \times 5 \times 4 = 84.40$
9	3.49	17	10%	1.48	2	เบอร์902เสริมเบอร์903 1:4	$1.48 \times 11 \times 4 = 65.12$
10	4.22	17	10%				

ตารางที่ ก 2 การเจริญเติบโต การใช้อาหารและอัตราการรอดตาย

ข้อมูลการศึกษา	พรีตเมนต์ทดลอง						p-value
	กลุ่มควบคุม	ครอบจักรวาล	คีโตมอร์ฟ	หญ้าเหี่ยวหมู	ต้นนมราชสีห์	ต้นลูกใต้ใบ	
ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)	70	70	70	70	70	70	
น้ำหนักเริ่มต้น (กรัมต่อตัว)	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.56
น้ำหนักตัวเพิ่ม (กรัม/ตัว)	4.222	4.225	4.131	4.176	4.426	4.197	0.55
อาหารที่ใช้ (กรัม/ตัว)	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06	1.00
อัตราการแลกเนื้อ	1.20	1.20	1.22	1.21	1.14	1.21	0.62
ตัวเริ่มต้นทดลอง	18	18	18	18	18	18	1.00
ตัวกึ่งเมื่อสิ้นสุด	17.00	15.50	15.75	15.00	16.25	16.75	0.55
อัตราการรอดตาย (%)	94.44	86.11	87.50	83.33	90.28	93.06	0.55

ตารางที่ 3 คุณภาพน้ำในถังทดลอง

คุณภาพน้ำเฉลี่ยที่ตรวจวัด	พรีตเมนต์ทดลอง						p-value
	กลุ่มควบคุม	ครอบจักรวาล	กลีโคมอร์ฟ	หญ้าเหี่ยวหมู	ต้นนมราชสีห์	ต้นลูกใต้ใบ	
อุณหภูมิ °C							
เริ่มต้น	27.07	27.07	27.07	27.07	27.07	27.07	1.00
สิ้นสุด	25.13	25.12	25.11	25.11	25.11	25.11	0.17
O ₂ ละลายน้ำ (ml/l)							
เริ่มต้น	5.15	5.15	5.15	5.15	5.15	5.15	1.00
สิ้นสุด	7.39	7.44	7.44	7.47	7.49	7.44	0.16
แอมโมเนียรวม (ml/l)							
เริ่มต้น	0	0	0	0	0	0	1.00
สิ้นสุด	0.38	0.41	0.42	0.39	0.36	0.38	0.50
ความเป็นด่าง (ml/l)							
เริ่มต้น	137.70	137.70	137.70	137.70	137.70	137.70	1.00
สิ้นสุด	136.75	137.70	136.43	136.85	137.28	136.00	0.002
กรดค้าง (ml/l)							
เริ่มต้น	7.97	7.97	7.97	7.97	7.97	7.97	1.00
สิ้นสุด	8.00	8.00	8.00	7.97	8.00	8.00	0.002
ความเค็ม (PPT)							
เริ่มต้น	25.40	25.40	25.40	25.40	25.40	25.40	1.00
สิ้นสุด	25.40	25.40	25.40	25.40	25.40	25.40	1.00

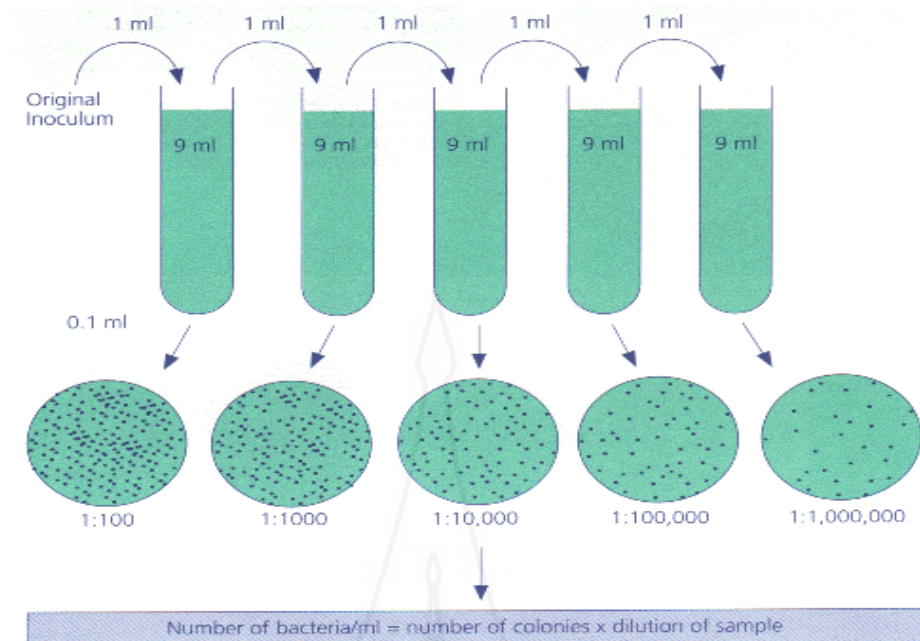
การเตรียมอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ ใช้อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อไวรัส TCBS ยี่ห้อ Difco ซึ่งอาหารวุ้น 89 กรัมลงในน้ำเค็ม 1 ลิตร (น้ำเค็มความเค็ม 25 PPT ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 ของ Whatman และฆ่าเชื้อ ด้วยการนึ่ง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที) รอจนเย็น นำไปต้มที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส ใส่อาหารวุ้นที่ชั่งไว้ ลงในน้ำที่ต้มไว้ กวนให้เข้ากันตลอดเวลา ใช้เวลาประมาณ 1 นาที และนำไปใช้ <http://www.medtechzone.com/data/bac/TCBS.php>

1. ใช้กระบอกแก้วนิตยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ขนาด 50 มิลลิลิตร ตูดอาหารวุ้น 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 84 จานเลี้ยงเชื้อ Petri dishes ทิ้งไว้จนเย็นกว่า Petri dishes ไว้ในห้องปลอดเชื้อ

2. แบ่งวุ้นออกเป็น 7 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 4 ซ้ำ และ 3 ความเข้มข้น Dilution (กลุ่มละ 12 Petri dishes)

- 1) กลุ่มวุ้นไม่ใส่อะไรเลยต้องการทดสอบความสะอาดของขั้นตอนการทดลอง
- 2) กลุ่มอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดื่บกิ่งกินอาหารกึ่งไม่เสริมน้ำตาลมนไพรชุดควบคุม
- 3) กลุ่มอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดื่บกิ่งกินอาหารกึ่งเสริมน้ำตาลนครอบจักรวาล
- 4) กลุ่มอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดื่บกิ่งกินอาหารกึ่งเสริมน้ำตาลห่วยคิโตมอร์ฟ
- 5) กลุ่มอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดื่บกิ่งกินอาหารกึ่งเสริมน้ำตาลหญ้าเหวหมู
- 6) กลุ่มอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดื่บกิ่งกินอาหารกึ่งเสริมน้ำตาลน่านมราชสีห์
- 7) กลุ่มอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อดื่บกิ่งกินอาหารกึ่งเสริมน้ำตาลลูกใต้ใบ



Dilution method www.sigmaaldrich.com

การเลี้ยงเชื้อในตลับกึ่งทดลอง

เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเพื่อหาปริมาณเชื้อไวรัสในตลับกึ่งทดลอง แต่ไม่สามารถทราบได้ว่า เชื้อไวรัสในตลับกึ่งทดลองมีปริมาณมากน้อยเพียงใด นับจำนวนโคโลนีได้หรือไม่ จึงใช้วิธีการเจือจาง Dilution method www.sigmaaldrich.com

1) จับกึ่งโดยการสุ่มทุกทริตเมนต์ รวม 6 ทริตเมนต์ ใส่ถุงพลาสติกที่บรรจุน้ำให้อากาศ นามาล้างด้วยน้ำประปาผ่านการกรอง ใช้ปากกิบกรีดบริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกกรอบหั่ว กับ ลำตัว ใช้ไม้จิ้มกึ่งบริเวณกึ่งกลาง จะเห็นฟุ้ง ค่อยๆใช้ปากกิบหนีบส่วนที่เป็นตัวใส่ถุงพลาสติกที่ ชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณ 1 กรัม

2) บดตัวให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว เติมน้ำเค็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งด้วย autoclave จนเย็นที่เตรียมไว้ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ใส่ในถุง

3) นำถุงที่บรรจุตัวบดละเอียด 1 กรัม เติมน้ำให้เข้ากัน จะได้สารละลายดับ 1:10 หรือ 0.1 (10^{-1}) ใช้กระบอกฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตรดูดสารละลาย ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่ อาหารวุ้น TCBS ที่เตรียมไว้ 0.1 มิลลิลิตร 4 จานต่อ 1 ทริตเมนต์ รวม 24 จาน ทำการ Streak Plate (นงลักษณ์และปรีชา 2541) http://www.micro.vet.chula.ac.th/index.php/doc/doc_download/63--bacterial-culture ในจาน คัดรหัสเก็บควาไว้ในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศา 18 ชั่วโมง และ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำลงในหลอดทดลองหลอดที่ 1

4) หลอดทดลองที่ 1 (หลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร) ผ่านการฆ่าเชื้อและบรรจุ น้ำเต็ม 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายยับรวม 10 มิลลิลิตร 1:100 หรือ $0.10 (10^{-2})$ เขย่าให้เข้ากัน ดูด สารละลายในหลอดที่ 1 ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่อาหารวุ้น TCBS ที่เตรียมไว้ 0.1 มิลลิลิตรต่อจาน จำนวน 4 จานต่อ 1 ทริตเมนต์ ทำการ Streak Plate ในจาน ดิครหัสเก็บไว้ในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศา 18 ชั่วโมง และ 1 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดทดลองหลอดที่ 2

5) หลอดทดลองที่ 2 (หลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร) ผ่านการฆ่าเชื้อและบรรจุ น้ำเต็ม 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายยับรวม 10 มิลลิลิตร 1:100 หรือ $0.10 (10^{-2})$ เขย่าให้เข้ากัน ดูด สารละลายในหลอดที่ 2 ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่อาหารวุ้น TCBS ที่เตรียมไว้ 0.1 มิลลิลิตรต่อจาน จำนวน 4 จาน ต่อ 1 ทริตเมนต์รวม 24 จาน ทำการ Streak Plate

6) ปั่นในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงและนับจำนวน โคโลนีสีเขียว และเหลืองในแต่ละจานหาค่าเฉลี่ย

ตารางที่ ก 4 ปริมาณแบคทีเรีย Vibrio ไอสีเหลืองและสีเขียวในระดับกึ่งทดลอง

ปริมาณ แบคทีเรีย Vibrio	ทริตเมนต์ทดลอง						p- value
	กลุ่ม	กรอบ	ติโดมอร์	หญ้า	ต้นนม	ต้น	
	ควบคุม	จักรวาล	ฟ้า	เหี่ยวหมู	ราชสีห์	ลูกใต้ใบ	
สีเหลือง 10^4 cfu/g	2.62	5.17	4.11	2.92	2.37	5.47	0.29
สีเขียว 10^2 cfu/g	1.75	1.50	1.25	0.00	0.00	4.75	0.43

ภาคผนวก ข

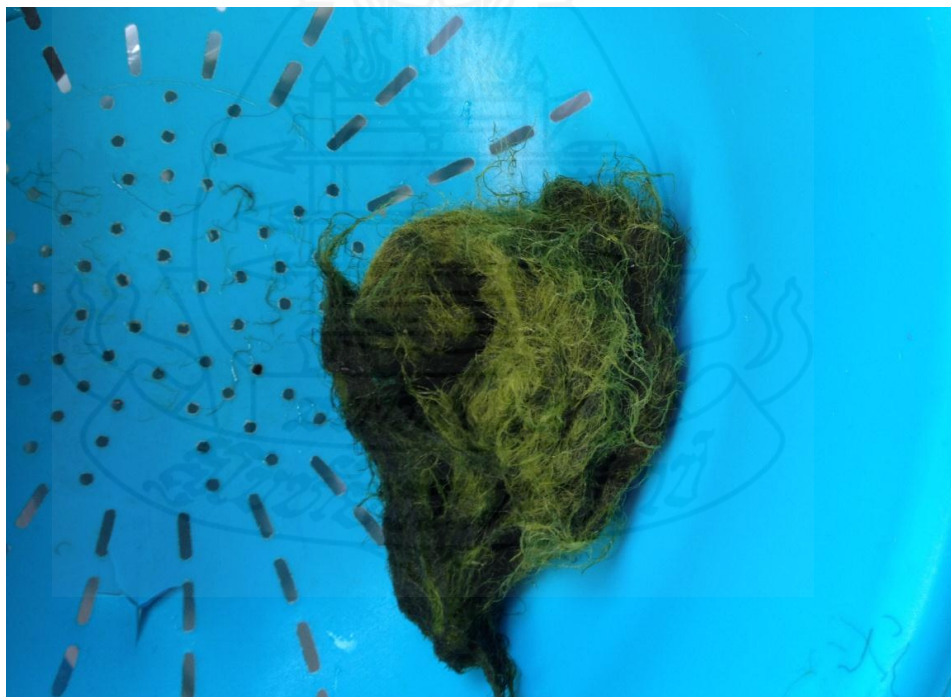
ภาพสมุนไพรรทคลองและสถานที่





ภาพที่ ข 1 ต้นครอบจักรวาล *Abutilon indicum*

ที่มา : สายชล 2557



ภาพที่ ข 2 ต้นสาหร่ายคีโตมอร์ฟา *Chaetomorpha sp*

ที่มา : สายชล 2557



ภาพที่ ข 3 ต้นหญ้าแห้วหมู *Cyperus rotundus*

ที่มา : สายชล 2557



ภาพที่ ข 4 แสดงต้นน้ำนมราชสีห์ *Euphorbia hirta*

ที่มา : สายชล 2557



ภาพที่ ข 5 ต้นลูกใต้ใบ *Phallanthus amarus*

ที่มา : สายชล 2557



ภาพที่ ข 6 การวางถังทดลอง

ที่มา : สายชล 2557

ใบรับรองมาตรฐานฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
กรมประมง

เลขที่ 1501-01-55-01315

ให้ไว้เพื่อแสดงว่า	นายสายชล เพ็ญจิตต์ (สายลมฟาร์ม)
สถานที่ตั้งฟาร์ม	13/3 หมู่ 3 ตำบลกุยเหนือ อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
ทะเบียนฟาร์มเลขที่	7702000447
เป็นผู้ดำเนินการ	โรงเพาะพันธุ์และอนุบาล
ขอขยายชนิดสัตว์น้ำ	กุ้งทะเล
ตามมาตรฐาน	การปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดีสำหรับการผลิตสัตว์น้ำ (จี เอ ที) พ.ศ. 2553 กรมประมง
ออกให้ ณ วันที่	11 เมษายน 2555
วันที่หมดอายุ	10 เมษายน 2557
วันที่ออกครั้งแรก	11 เมษายน 2546



นางฉวีพร จงพิริยธร ผู้รับรอง
(นางธนัญญา จงพิริยธร)
ผู้อำนวยการศูนย์พัฒนาระบบและรับรอง
มาตรฐานฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ



โทร 01-22-07401-77000447-201
GAP
กรมประมง
อาคาร ศรฟ. กรมประมง เขตคลองเตย จตุจักร กรุงเทพฯ 1000 โทร/โทรสาร 0 2081 4679 และ 0 2079 8000



ศูนย์พัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
Aquaculture Development and Certification Centre

ภาพที่ ข 7 ใบรับรองมาตรฐานฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

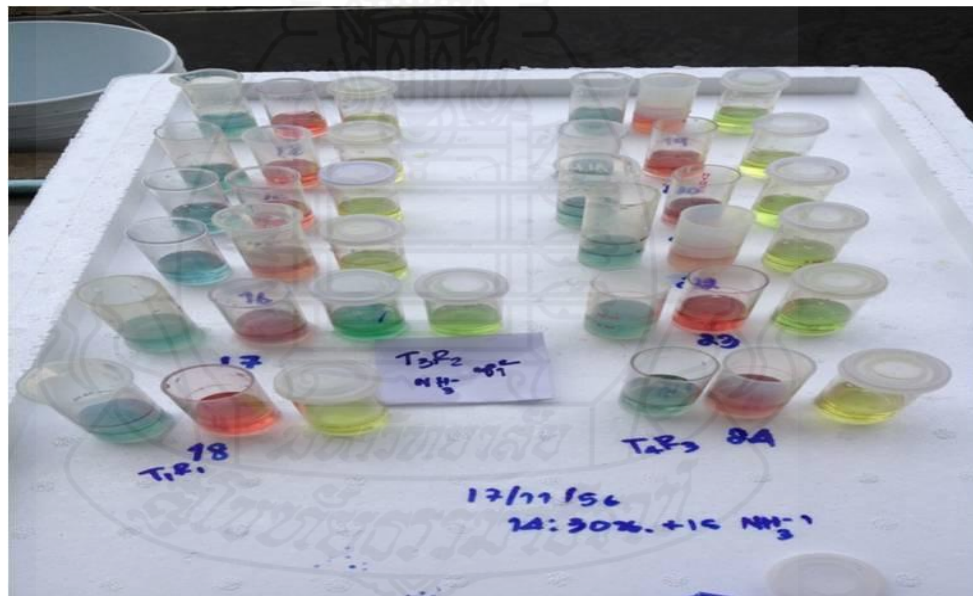
ภาคผนวก ค

ภาพข้อมูลการทดลอง

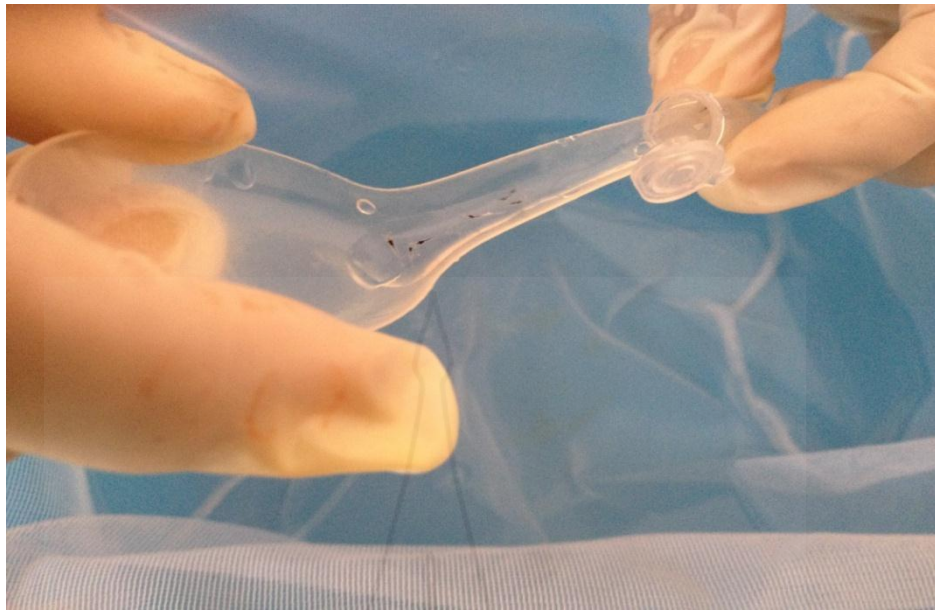




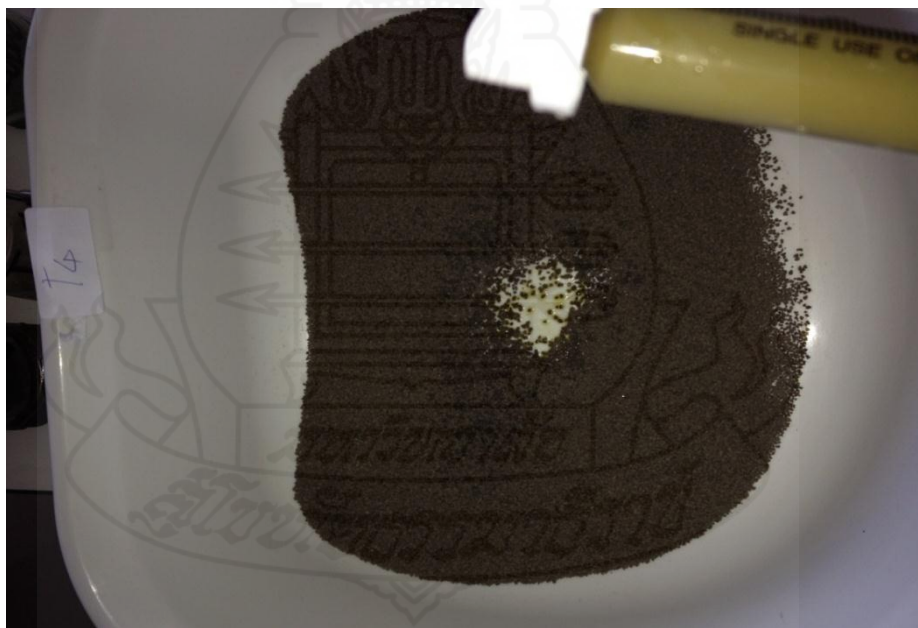
ภาพที่ ค 1 อุปกรณ์วัดคุณภาพน้ำสำหรับทดลอง



ภาพที่ ค 2 วัดคุณภาพน้ำความเป็นกรดเป็นด่าง, ด่าง, แอมโมเนีย



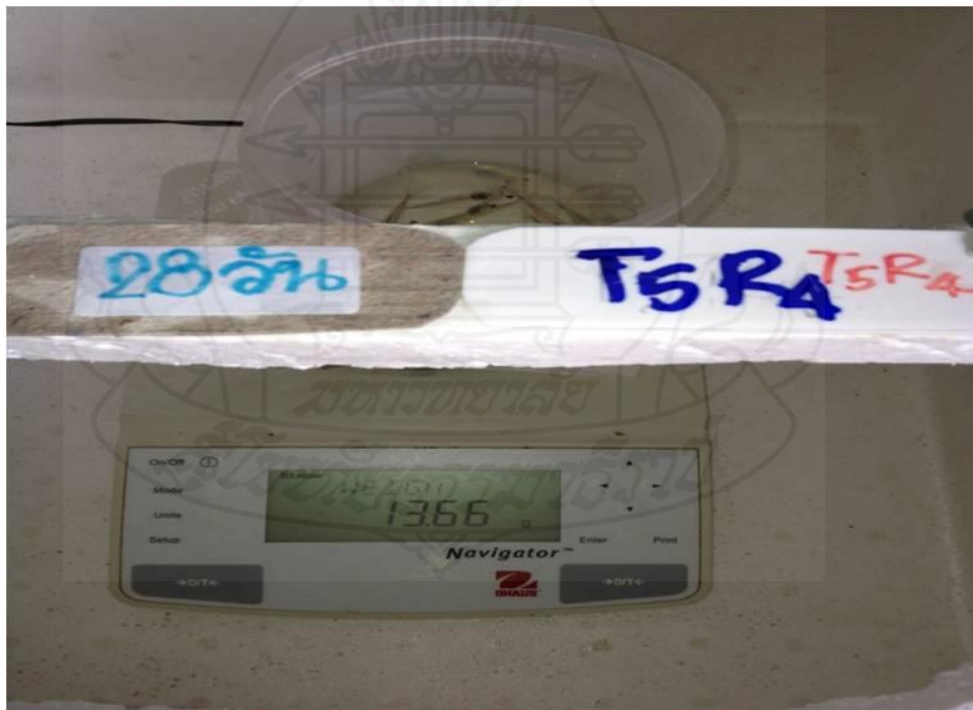
ภาพที่ ค 3 ลูกกิ้งโพงด้ลาว่าที่ 12 (กึ่งเริ่มต้นการทดลอง)



ภาพที่ ค 4 วิธีใช้น้ำพิษสมุนไพรเสริมในอาหาร



ภาพที่ ค 5 กุ้งเมื่อให้อาหาร



ภาพที่ ค 6 การชั่งน้ำหนักกุ้ง



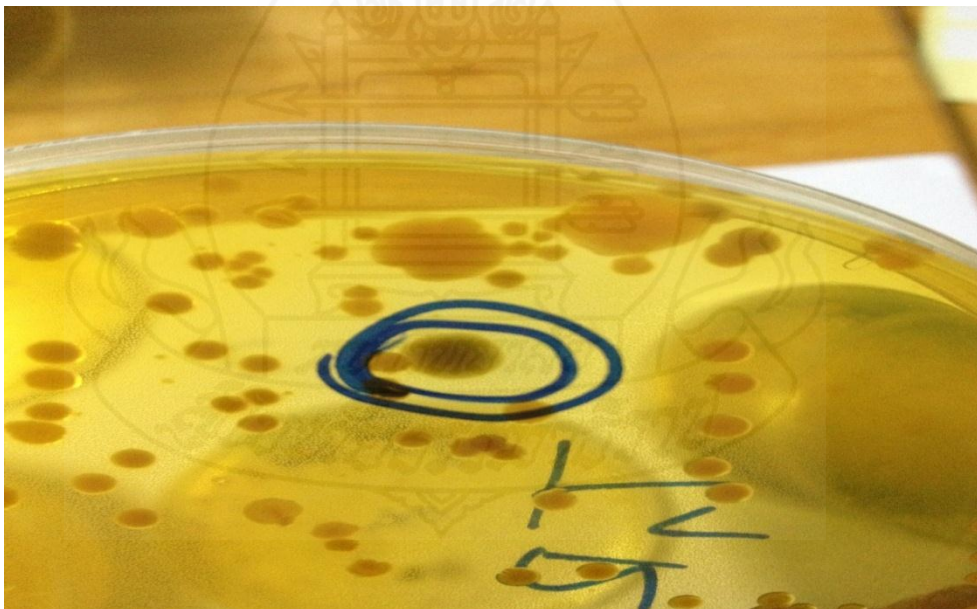
ภาพที่ ค 7 กุ้งขาวแวนนาไมเมื่ออายุ 56 วัน



ภาพที่ ค 8 ตั๊กกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ ค 9 อุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ ค 10 โคโลนีแบคทีเรียไวรัสโอสีเหลืองและสีเขียวบนวุ้น TCBS