



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาพิษเฉียบพลัน ผลต่อภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของ
สารลิกนิน (Lignin) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

Acute Toxicity, Immune Stimulation and Antiviral Activity of Lignin in Pacific White
Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

นามผู้วิจัย นายสุวินัย ปานขาว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์เชษฐ พิษิตกุล, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาพิษเฉียบพลัน ผลต่อภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของสารลิกนิน
(Lignin) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

Acute Toxicity, Immune Stimulation and Antiviral Activity of Lignin in Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

โดย

นายสุวินัย ปานขาว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2553

สุวินัย ปานขาว 2553: การศึกษาพิษเฉียบพลัน ผลต่อภูมิคุ้มกันและความสามารถในการ
ต้านทานเชื้อไวรัสของสารลิกนิน (Lignin) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone,
1931) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D. 117 หน้า

การศึกษาพิษเฉียบพลันของลิกนินที่ทำให้กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ขนาด
 13.13 ± 1.69 กรัม ตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 96 ชั่วโมง (96-hrs LD₅₀) พบว่ามีค่าเท่ากับ 220
มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการศึกษาผลของลิกนินต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยการผสม
ลิกนินในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 14
วัน พบว่าการเสริมลิกนินในอาหารในทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง
ขาวมีความสามารถในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม โดยพิจารณาจากค่า Percent Phagocytosis และ
ค่า Phagocytic index โดยเฉพาะในวันที่ 14 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
แต่ไม่มีผลต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total haemocyte count) ในกุ้งแต่ละกลุ่มแต่
อย่างใด นอกจากนี้ การศึกษาผลของลิกนินต่อการต้านทานไวรัสหัวเหลืองภายหลังจากได้รับ
อาหารผสมลิกนินเป็นเวลา 14 วัน พบว่าความเข้มข้นของสารลิกนินทุกความเข้มข้นไม่สามารถทำ
ให้กุ้งทดลองต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้เลย อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาประสิทธิภาพ
ของลิกนินในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีด
ไวรัสหัวเหลืองร่วมกับลิกนินความเข้มข้น 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการตายสะสม
ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 20 ของการทดลอง โดยมีค่า
เป็น 26.7 ± 15.3 , 13.3 ± 15.3 และ 23.3 ± 11.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุมผลบวกมีค่า
เป็น 100 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์

Suwinai Pankao 2010: Acute Toxicity, Immune Stimulation and Antiviral Activity of Lignin in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoome, Ph.D. 117 pages.

The study on 50% lethal dosage acute toxicity at 96 hours (96 – hrs LD₅₀) of lignin in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, 13.13±1.69 g) showed the 96 – hrs LD₅₀ of 220 mg/l. Effect of lignin on immune stimulation was carried out by feeding shrimp with diets contained lignin at 0, 1, 3, 5 and 10 g/kg for 14 days. There were significant differences of percent phagocytosis (PP) and phagocytic index (PI) among shrimp groups ($P<0.05$), because shrimp fed with 1-10 g lignin/kg diet were found to express significantly higher of PP and PI at day 14 after feeding than that of control. However, there was no significant difference of total haemocyte count among shrimp groups ($P>0.05$). Effect of lignin as feed supplement on yellow-head virus (YHV) resistance of shrimp was conducted. No significant difference of cumulative mortality after intramuscular injection with YHV was observed at the end of the experiment. However, antiviral activity of lignin against YHV in *L. vannamei* was found by *in vitro* study. Shrimp injected with lethal dose of YHV preincubated with 5 to 20 mg/l of lignin exhibited cumulative mortality significantly lower than control ($P<0.05$), during day 5 to 20 after viral injection. At the end of the trial, cumulative mortality was 100±0.0% in control group, while lower mortality; 26.7±15.3, 13.3±15.3 and 23.3±11.5% was recorded in shrimp injected with YHV mixing 5, 10 and 20 mg/l of lignin, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบพระคุณอาจารย์ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก ที่คอยให้คำแนะนำ คอยกระตุ้น คอยช่วยเหลือตลอดจนการให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไข
ข้อบกพร่องต่าง ๆ งานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ
รศ.ดร.นนทวิทย์ อารีรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.วราห์ เทพาหุดี ประธานการ
สอบวิทยานิพนธ์ และรศ.สพ.ญ.ดร.เจนนุช ว่องวัชชัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษา
แนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณที่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำและ
พันธุศาสตร์สัตว์น้ำทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ด้วยดีมาตลอด
โดยเฉพาะ ผศ.วิกรม รังสินธุ์ นายณัฐพงษ์ ปานขาว และนางสาวพรพิมล ทิวแพ

และที่สำคัญที่สุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่ให้การ
สนับสนุน ส่งเสริมและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

สุวินัย ปานขาว
กันยายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	32
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	47
ผลการทดลอง	47
วิจารณ์ผลการทดลอง	71
สรุปและข้อเสนอแนะ	82
สรุป	82
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	105
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	117

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)	41
2	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} และ 10^{-10} ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	56
ตารางผนวกที่		
1	การตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดสารละลายลิคินินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลองเบื้องต้น	109
2	การตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดสารละลายลิคินินที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถฆ่ากุ้งขาวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง	109
3	การวิเคราะห์ค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)	110
4	ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิคินินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน (Mean±S.D.)	111
5	เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิคินินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน (Mean±S.D.)	112
6	Phagocytic Index ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิคินินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน (Mean±S.D.)	
7	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทหลังจากกินอาหารที่ผสมสารลิคินินในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 และ 148 ชั่วโมง ตามลำดับ (Mean±S.D.)	113 114
8	เปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวเมื่อได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับสารลิคินินในหลอดทดลอง (<i>in vitro</i>) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 20 วัน	115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i> Boone)	6
2	ภาพรวมของระบบ Prophenoloxidase (proPO) ในสัตว์กลุ่ม Arthropod	20
3	องค์ประกอบต่าง ๆ ของเนื้อไม้และปริมาณลิกนินที่พบในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน	22
4	โครงสร้างหลัก 3 รูปแบบของลิกนินที่พบในพืชตามธรรมชาติ	23
5	ลักษณะโครงสร้างลิกนินของต้นสน	24
6	โครงสร้างของเนื้อไม้ บริเวณเนื้อเยื่อต่อลำเลียง (ซ้าย) ภาพตัดขวางของผนังเซลล์ (กลาง) และ ภาพความสัมพันธ์ของลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสใน secondary wall (ขวา) (S1-S3 คือ Secondary wall layer; P คือ Primary wall และ M.L. คือ Middle lamella)	25
7	โครงสร้างของลิกนินซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส	25
8	ลักษณะกุ้งขาวที่ตายหลังการฉีดลิกนิน	48
9	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน	50
10	อัตราการเกิด Phagocytosis ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวภายหลังจากการได้รับอาหารผสมสารลิกนินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน	52
11	Phagocytosis Index ของเม็ดเลือดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน	54
12	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองภายหลังได้รับอาหารผสมลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน	58
13	การแสดงออกของยีน β -actin และการปนเปื้อนเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเหงือกกุ้งขาว	59
14	จุลพยาธิของเหงือกกุ้งขาว	61
15	จุลพยาธิสภาพของ Lymphoid organ ในกุ้งขาว	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับลิณินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	64
17	การแสดงออกของยีน β -actin ในตัวอย่างเหงือกกุ้งขาวที่ทำการศึกษาทุกชุดการทดลองหลังจากสิ้นสุดการทดลอง	66
18	การแสดงการปนเปื้อนไวรัสหัวเหลืองของตัวอย่างเหงือกกุ้งขาวโดยใช้เทคนิค RT-PCR หลังจากสิ้นสุดการทดลอง	67
19	จุลพยาธิของเหงือกกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับสารละลายลิณินความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร	69
20	จุลพยาธิของ Lymphoid organ ของกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับสารละลายลิณินความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร	70

การศึกษาพิษเฉียบพลัน ผลต่อภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของ สารลิกนิน (Lignin) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

Acute Toxicity, Immune Stimulation and Antiviral Activity of Lignin in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

คำนำ

การเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*; Boone, 1931) ในประเทศไทยมีการเลี้ยงมากขึ้น นับตั้งแต่กรมประมงอนุญาตให้มีการนำเข้ากุ้งปลอดเชื้อในปี พ.ศ. 2545 โดยมีส่วนแบ่งของพื้นที่ การเลี้ยงกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่การเลี้ยงกุ้งทะเลทั้งหมด มีผลผลิต 508,500 ตัน คิดเป็นมูลค่า 46,939 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2550 (กรมประมง, 2550) ทั้งนี้เนื่องจากในระยะที่ผ่านมาการเลี้ยงกุ้ง กูลด้าประสบปัญหาหลายประการจนทำให้เกษตรกรจำนวนมากขาดทุน เกษตรกรบางส่วนจึงหัน มาเลี้ยงกุ้งขาวแทน เพราะกุ้งชนิดนี้เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตเร็ว รวมทั้งให้ผลผลิตต่อไร่ใน ปริมาณสูงจนทำให้กุ้งชนิดนี้กลายเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจแทนกุ้งกูลด้า แต่ทั้งนี้เนื่องจากสภาพการ เลี้ยงที่หนาแน่นมากจนเกินไป จึงทำให้การเลี้ยงกุ้งขาวประสบปัญหาการเลี้ยงต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็น จะเป็นปัญหาการเกิดโรคระบาดต่าง ๆ เช่น white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus (YHV), monodon baculovirus (MBV), hepatopancreatic parvovirus (HPV), Taura syndrome virus (TSV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) และโรคที่เกิดจากเชื้อ แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* อีกหลายชนิด (จิรพร, 2547)

จากปัญหาการเกิดโรคที่ยังรุนแรงเพิ่มขึ้นทุกวัน เกษตรกรจึงแก้ปัญหาโดยใช้ยาและ สารเคมี ซึ่งอาจส่งผลให้มีการตกค้างของยาและสารเคมีในกุ้งและสิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อผู้บริโภค และมีผลกระทบต่อ การส่งออกจากมาตรการควบคุมสารตกค้างในกุ้งของต่างประเทศได้ภายหลัง จึงได้มีแนวคิดที่จะนำเอาสารสกัดจากพืชชนิดใหม่ ที่มีความปลอดภัยทั้งต่อกุ้งเองและผู้บริโภคมา ใช้ในการป้องกันโรค ซึ่งลิกนินเป็นสารประกอบที่มีอยู่มากในพืชโดยทั่วไปรองลงมาจากเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสพบอยู่ในผนังชั้นที่สองของผนังเซลล์ และใน middle lamella ห่อหุ้มเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสของพืช มีหน้าที่ช่วยให้ผนังเซลล์ของพืชแข็งแรง ลดการระเหยของน้ำที่อยู่ ระหว่างเนื้อเยื่อไซเลมและผนังเซลล์ และป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อของพืชโดยจุลินทรีย์ (Crowford, 1976) และจากข้อมูลทางวิชาการในปัจจุบันพบว่าลิกนินเป็นสารอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีคุณสมบัติในการ

ที่จะนำมาใช้เป็นสารยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Antitumor activity), ยับยั้งการทำงานของไวรัส (Antiviral activity), ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity), ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inactivation) และการกระตุ้นเซลล์ในกลุ่ม myeloperoxidase-positive cells (monocyte, neutrophil, HL-60) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการศึกษาผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกลุ่ม ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อธุรกิจการเลี้ยงกุ้งของไทยในอนาคต



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ของลิกนิน (lignin) ต่อกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
2. เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวภายหลังจากที่ได้รับอาหารที่ผสมลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาผลของการเสริมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งขาว
4. เพื่อศึกษาผลของลิกนินต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ในกุ้งขาว

การตรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของกุ้งขาว

กุ้งขาว (Pacific white shrimp) เป็นกุ้งสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในทวีปอเมริกา ในธรรมชาติพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งทะเลของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส และมีความเค็มประมาณ 35 ppt

Pérez-Farfante and Kensley (1997) ได้จัดลำดับอนุกรมวิธานกุ้งขาวแปซิฟิกไว้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Superclass Crustacea Pennant, 1777

Class Malacostraca Latreille, 1806

Subclass Eumalacostraca Grobbee, 1892

Superorder Eucarida

Order Decapoda Latreille, 1803

Suborder Dendrobranchiaie Bate, 1888

Infraorder Penaeoidea Rafinesque-Schmaltz, 1815

Superfamily Penaeoidea Rafinesque-Schmaltz, 1815

Family Penaeidae Rafinesques, 1815

Genus *Penaeus*

Subgenus *Litopenaeus*

Litopenaeus vannamei Boone, 1931

กุ้งขาวมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น White leg shrimp (อังกฤษ), Crevette pattes blanches (ฝรั่งเศส), Camarón patiblanco (สเปน), Camarón blanco (เม็กซิโก) และ White shrimp (นิการากัว), Camarón blanco (คอสตาริกา), Camarón blanco (ปานามา), Camarón blanco และ Camarón patiblanco (โคลัมเบีย), Camarón blanco และ Camarón café (เอกวาดอร์), Camarón blanco (เปรู), Camarón blanco และ Langostino (กัวเตมาลา), Camarón blanco, Western coast white shrimp (สหรัฐอเมริกา) (Holthuis, 1980), กุ้งขาวแปซิฟิก (ไทย) (ภิญโญ, 2545)

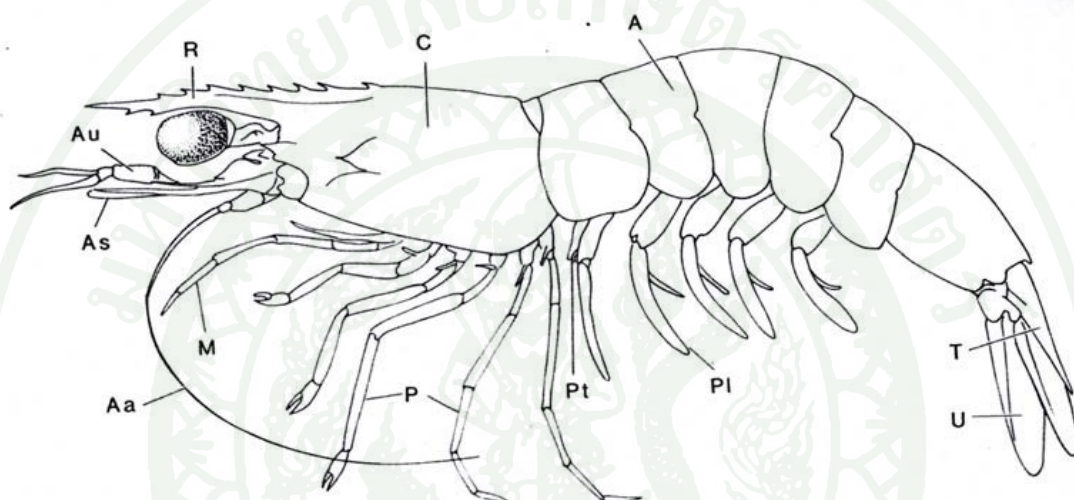
1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของกุ้งขาว

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว ที่สำคัญคือ มีลำตัวขาวใส ขาสีขาวใส หางมีสีแดง ลักษณะของกริยาวตรง (ประจวบ, 2543; ภิญโญ, 2545) โดยกริยาวตรงมีความยาวปานกลาง มีพินกรีด้านล่าง 2-4 อันและมีพินกรีด้านบน 8-9 อัน ในวัยอ่อนกริยาวตรงจะมีความยาวโดย Antennular peduncle และเมื่อโตขึ้นจะพบว่ามีขนาดสั้นลง บางครั้งอาจมีความยาวถึงครึ่งหนึ่งของปล้องที่ 2 ของหนวดคู่ที่ 1 (Antennular) บริเวณ Carapace พบ Hepatic spine ชัดเจน แต่ไม่พบ Orbital spine และ Pterygostomian spine และไม่มี Postocular sulcus ขนาดของ Postrostral carina มีหลายขนาด ในบางครั้งอาจพบที่มีความยาวถึงขอบด้านหลังของเปลือกคลุมหัว ไม่มี Branchiocardiac carina, Longitudinal sutres และ Transverse sutures ที่บริเวณลำตัวปล้องที่ 6 จะมีสันเรียงตัวตามขวางของลำตัวด้านบน (Cicatrices) จำนวน 3 อัน ร่องแนวยาวด้านในลำตัวด้านบน (Dorsolateral sulcus) แคบมากหรืออาจไม่มี ส่วนหาง (Telson) เรียบ สำหรับหนวดคู่ที่ 1 (Antennule) พบว่าไม่มี Parapenaeid spine ในขณะที่มี Antennular flagella สั้นกว่าส่วน Carapace มาก แผ่นยางค้ำของ Maxilla คู่ที่ 1 ยาว มีปล้องจำนวน 3-4 ปล้อง (Perez-Farfante and Kensley, 1997; จิรพร, 2547) กุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำ ตื่นตกใจง่าย มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว เลี้ยงง่าย โดยตัวเต็มวัยเมื่อสมบูรณ์เต็มที่ กุ้งชนิดนี้จะมีขนาดยาวทั้งหมด (Total length) ประมาณ 230 มิลลิเมตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ลักษณะที่พิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35 ppt แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ในแผ่นดินที่เป็นเขตพื้นที่ความเค็มต่ำ (ปิยะบุตร, 2546ก)

1.2 ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

โดยทั่วไปแล้วกุ้งขาวจะอาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่ง บริเวณที่เป็นพื้นโคลน ลงไปจนถึงระดับความลึก ประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต ทั้งนี้เนื่องจากกุ้งชนิดนี้เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่อาศัยอยู่ในแถบชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกบริเวณอเมริกาใต้และกลาง (Rosenberry, 1997) สามารถพบได้ในทางตอนเหนือของเม็กซิโกไปจนกระทั่งถึงทางตอนเหนือของประเทศเปรู ที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 องศาเซลเซียส (Holthuis, 1980) ได้แก่ บาจา แคลิฟอร์เนียของเม็กซิโก กัวเตมาลา เอลซัลวาดอร์ ฮอนดูรัส นิการากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์และเปรู (Tseng, 1987) เป็นกุ้งที่อาศัยบริเวณพื้นที่ตื้นน้ำหรือตามแนวที่เป็นโคลนหรือโคลนปนทราย ตั้งแต่บริเวณชายฝั่ง

จนถึงระดับความลึก 72 เมตร (Dore and Frimodt, 1987) โดยในระยะวัยรุ่น (Juveniles) และตัวเต็มวัย (Adults) จะเริ่มอพยพจากชายฝั่งสู่น้ำลึกที่ซึ่งมีคุณภาพน้ำค่อนข้างคงที่ เพื่อพัฒนาระบบสืบพันธุ์ จนถึงขั้นสมบูรณ์ หลังจากนั้นก็จะผสมพันธุ์และวางไข่บริเวณนอกฝั่ง และอาศัยกระแสน้ำพัดพาไข่และตัวอ่อนเข้ามาสู่ชายฝั่งและปากแม่น้ำ ซึ่งเป็นแหล่งที่มีอาหารสมบูรณ์ โดยลูกกุ้งวัยอ่อนก็จะดำรงชีพและพัฒนาตัวเองบริเวณชายฝั่งเป็นหลัก (Whetstone *et al.*, 2002)



A. Abdomen

Aa. Antenna

As. Antennal scale

Au. Antennule

C. Carapace

M. Third maxilliped

P. Pereiopod

Pl. Pleopod

Pt. Petasma

R. Rostrum

T. Telson

U. Uropod

ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone)

ที่มา: Grey *et al.* (1983)

1.3 อาหารและการกินอาหาร

กุ้งขาวเป็นกุ้งทะเลที่สามารถกินได้ทั้งพืช สัตว์และซากของสิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณกลางน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถกินได้ทั้งสิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณผิวน้ำดินและซากของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอีกด้วย (Wassenberg and Hill, 1987; Iversen and Hale, 1992) พฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งชนิดนี้คือ หากกินทุกระดับน้ำ แต่ชอบกินอาหารบริเวณกลางน้ำเป็นส่วนใหญ่ สำหรับอาหารที่ตกลงไปอยู่บริเวณพื้นบ่อแล้ว กุ้งจะโฉบลงไปจับขึ้นมาแทะกินในกรณีที่เม็ดอาหารยังไม่แตกตัว ส่วนกรณีที่อาหารแตกตัวแล้วกุ้งจะลงไปโฉบหรือคลานเก็บกินตามพื้นบ่อ (นิพนธ์, 2522) โดยที่การกินอาหารของกุ้งนั้นจะแตกต่างกันไปตามอายุ ได้แก่ ระยะเวลา Nauplius ลูกกุ้งระยะนี้จะไม่กินอาหารจากภายนอก เนื่องจากมีไข่แดง (Yolk) ติดอยู่ ส่วนในระยะ Protozoa ซึ่งเป็นกุ้งวัยอ่อนจะเริ่มกินพืชและแพลงก์ตอนพืชขนาดเล็กเป็นอาหาร ช่วงปลายของวัยอ่อนระยะนี้ จะเริ่มกินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหารด้วย สำหรับในระยะ Mysis นั้นจะกินอาหารทั้งที่เป็นแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ และในระยะ Postlarva ส่วนมากจะกินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร และเริ่มกินสัตว์ที่ตายแล้ว เนื่องจากลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะนี้เตรียมที่จะปรับตัวอาศัยบริเวณผิวดิน ส่วนในระยะ Juvenile ซึ่งเป็นกุ้งระยะวัยรุ่น มักจะกินสัตว์และพืชที่ตายแล้วเป็นอาหาร สามารถกินอาหารได้ทุกชนิดและมักเป็นพวกหากินเวลากลางคืน (พรรณิภา, 2547)

2. โรคที่เกิดกับกุ้งขาว

2.1 โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่

2.1.1 โรคที่เกิดจาก Taura Syndrome Virus (TSV)

สำหรับเชื้อไวรัส Taura syndrome virus (TSV) นั้นพบว่ามีการระบาดในทวีปเอเชียเป็นครั้งแรกที่ประเทศไต้หวันในปี ค.ศ. 1999 (Tu *et al.*, 1999) และต่อมาพบการระบาดในประเทศจีนและหลายประเทศในภูมิภาคเอเชีย สำหรับประเทศไทยพบการระบาดในช่วงปลายปี ค.ศ. 2002 (Flegel *et al.*, 2003) โดยเฉพาะในพื้นที่เลี้ยงกุ้งจังหวัดนครปฐมและฉะเชิงเทรา (Limsuwan, 2003) โดย Yu and Lin (2002) ได้รายงานว่าเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค Taura Syndrome นั้น เกิดจากเชื้อ Taura syndrome virus ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA แบบสายเดี่ยว (single stranded RNA) (Mari *et al.*, 1998) อนุภาคไวรัสมีขนาดประมาณ 32 นาโนเมตร มีความ

หนาแน่น 1.338 กรัมต่อมิลลิลิตร (Hasson *et al.*, 1995) ซึ่งเชื้อไวรัสดังกล่าวสามารถทำให้เกิดการตายของกุ้งขาวแอฟริกาที่เลี้ยงและจากธรรมชาติในบริเวณแม่น้ำ Taura ในประเทศเอกวาดอร์ ประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ (Brock *et al.*, 1995; Overstreet *et al.*, 1997) ทั้งนี้ Garza *et al.* (1997) ได้รายงานว่าเชื้อไวรัส TSV นั้นสามารถแพร่กระจายได้โดยมีนกเป็นพาหะทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเชื้อสามารถถ่ายทอดไปยังสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่เป็นพาหะได้โดยการอยู่ร่วมกันหรือกินกันเอง (Lotz, 1997)

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส TSV นั้นจะพบการติดเชื้อในเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจากชั้น Ectoderm และ Mesoderm ซึ่งเนื้อเยื่อ Cuticular epithelium จะเป็นส่วนที่มีการติดเชื้อรุนแรงที่สุด ในระยะการตายแบบเฉียบพลันจะพบการตายบริเวณ Cuticular epithelium cell ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้น Subcuticle และเส้นใยของกล้ามเนื้อลาย ทั้งนี้ Cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อจะติดสีย้อม Eosin และเกิด Pyknosis หรือเกิด Karyorrhexis ของนิวเคลียส นอกจากนี้สามารถพบเศษของ Cytoplasm ของเซลล์ที่ตายเป็นจำนวนมาก โดยจะมีลักษณะเป็นก้อนกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-20 ไมโครเมตร และติดสี Eosin หรือ Hematoxylin อ่อน ๆ ทั้งนี้ลักษณะเหล่านี้จะพบเฉพาะในระยะการตายแบบเฉียบพลันของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะที่เรียกว่า “Peppered” หรือ “Buckshot-riddled” และไม่พบการเกิด Hemocytic infiltration หรือการตอบสนองในลักษณะอักเสบของเนื้อเยื่อ (Lightner, 1996) ในช่วงรอยต่อของการตายแบบเฉียบพลันกับการตายแบบเรื้อรังนั้น จะพบความผิดปกติในชั้น Cuticle น้อยลง แต่จะเกิด Hemocytic infiltration และการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดในบริเวณที่ติดเชื้อแทน ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของเมลานินเกิดเป็นจุดดำขึ้น ซึ่งเป็นอาการเฉพาะของการติดเชื้อในระยะนี้ ส่วนในระยะของการติดเชื้อแบบเรื้อรัง จะพบการเกิด Lymphoid organ spheroid (LOS) ซึ่งเป็นการรวมกลุ่มของเซลล์ในลักษณะที่เป็นก้อนกลมบริเวณ Intertubular space ของ Lymphoid organ (Jimenez *et al.*, 2000)

2.1.2 โรคที่เกิดจาก White Spot Syndrome Virus (WSSV)

โรคดวงขาวในกุ้งทะเลนั้น มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส WSSV ซึ่งพบว่ามีการระบาดของโรคดวงขาวในประเทศไทยในกุ้งกุลาดำก่อนในช่วงปลายปี ค.ศ. 1994 บริเวณภาคตะวันตก ภาคใต้ฝั่งตะวันออกและตะวันตก ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก โดยความรุนแรงและความสูญเสียเทียบเท่ากับการเกิดโรคหัวเหลือง ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Yellow head virus ที่เคยระบาดในกุ้งกุลาดำเช่นเดียวกัน (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

White spot virus (WSV) เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ (dsDNA) (Mayo, 2002) โดยมีรูปร่างเป็นแท่ง มีความยาวประมาณ 270-290 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 110-120 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อมีการระบาดของเชื้อไวรัส WSSV จะส่งผลทำให้เกิดการตายของกุ้งอย่างรวดเร็ว โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะไม่กินอาหารและเฉื่อยชา เกิดจุดขาวบริเวณเปลือกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของจุดประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร นอกจากนี้กุ้งที่ใกล้ตายอาจเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดง (Chou *et al.*, 1995; Bondad *et al.*, 2001) สำหรับกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) นั้น พบว่าโรคดวงขาวเป็นโรคที่มีความรุนแรงสูงมากเช่นกัน สามารถทำให้เกิดการตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับเชื้อ

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่เป็นโรคค่อนข้างมีความจำเพาะ ซึ่งสามารถใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคได้ โดยเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น Ectoderm และ Mesoderm ของกุ้งใกล้ตายจะพบเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้นและมี Basophilic central inclusion ล้อมรอบด้วย Marginated chromatin โดยจะเริ่มต้นด้วยการเกิด Eosinophilic Cowdry type A inclusion แต่จะสิ้นสุดด้วยการเกิด Basophilic inclusion บริเวณนิวเคลียส ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถสังเกตได้ในเนื้อเยื่อของเหงือกหรือเนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก (Sub-cuticular epithelium) โดยไม่พบการอักเสบของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (Flegel *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามในการวินิจฉัยโรค นอกจากจะใช้วิธีทางพยาธิวิทยาแล้วยังสามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) (Nunan and Lightner, 1997) และเทคนิค *In situ* DNA hybridization ในการตรวจสอบได้เช่นกัน (Durand *et al.*, 1996; Wongteerasupaya *et al.*, 1996)

2.1.3 โรคที่เกิดจากเชื้อ Yellow head virus (YHV)

กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกุ้งหัวเหลือง ทั้งนี้เชื้อไวรัส YHV นั้นมีสารพันธุกรรมเป็น RNA แบบสายเดี่ยว (ssRNA) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) โดยมีรูปร่างเป็นแบบท่อน มีความยาวประมาณ 150-200 นาโนเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 40-50 นาโนเมตร (Chantanachookin *et al.*, 1993; Boonyaratpalin *et al.*, 1993) ซึ่งเหตุของการเรียกว่าโรคหัวเหลืองนั้น เรียกชื่อตามลักษณะของกุ้งป่วย ซึ่งมักอยู่ตามริมขอบบ่อ ลำตัวสีซีดมองเห็นส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจาก Cephalothorax มีสีซีด สำหรับกุ้งทะเลในกลุ่ม Penaeid ที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองจะมีอายุตั้งแต่ 25 วันขึ้นไปจนถึงประมาณ 70 วันโดยถ้าเกิดกับกุ้งกุลาดำอายุ 25-30 วัน จะมีลักษณะคล้ายกับโรคตายเดือนหรือโรคติดเชื้อแบคทีเรียแต่จะมีความรุนแรงมากกว่า แต่ถ้าเกิดกับกุ้งอายุประมาณ 50-70 วัน จะพบวก่อนที่จะเริ่มมีกุ้งตายกุ้งในบ่อจะ

กินอาหารในปริมาณมากผิดปกติ จากนั้นจะหยุดกินอาหารและเริ่มมีการตายสูงขึ้นจนกระทั่งหมดบ่อ โดยอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 วัน กุ้งจะตายหมดบ่อ เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคที่ทำความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกชนิดพบว่าโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายเร็วและรุนแรงที่สุด ซึ่งการแพร่กระจายในพื้นที่การเลี้ยงแต่ละแหล่งจะรวดเร็วมาก (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) สำหรับกุ้งขาวแปซิฟิกนั้น พบว่ากุ้งที่ได้รับเชื้อ YHV จะมีการตอบสนองและการเคลื่อนไหวช้าลง เมื่อตายบริเวณปลายหางและขาว่ายน้ำจะมีสีแดง อย่างไรก็ตาม พบว่าการตายของกุ้งที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวเริ่มลดลงตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 เนื่องจากมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งจากระบบเปิดมาเป็นระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อยลงหรือมีการพัฒนามาใช้ระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน แต่การแพร่ระบาดของไวรัสก็ยังคงมีอยู่และก่อให้เกิดความเสียหายกับการเลี้ยงกุ้งในเอเชียอยู่จนถึงปัจจุบัน (Lightner *et al.*, 1997)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลือง จะพบความผิดปกติในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น Ectoderm และ Mesoderm ได้แก่บริเวณเหงือก เส้นประสาท ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ลำไส้ส่วนกลาง ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อโคนขาและก้านตา ซึ่งในบริเวณเหงือกและต่อมน้ำเหลืองจะมีความเด่นชัดมาก โดยจะเกิด Basophilic cytoplasmic inclusion โดยจะติดสีน้ำเงินจากการย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) (Lu *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณที่มีการตายของเซลล์จะมีการเกิด Casophilic cytoplasmic inclusion ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตรหรือเล็กกว่าเป็นจำนวนมาก และเมื่อดูดเลือดกุ้งมาทำ Blood smear จะพบการตายของเซลล์เม็ดเลือดในระยะต่าง ๆ เช่น การเกิด Pyknosis และ Karyorrhexis ของนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือด (Nash *et al.*, 1995)

2.1.4 โรคที่เกิดจากเชื้อ Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)

โรคที่เกิดจากเชื้อ IHHNV นี้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายเดี่ยว (ssDNA) มีรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม ไม่มีผนังหุ้ม (Non-enveloped) มีขนาดเล็ก โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22-23 นาโนเมตร (Mari *et al.*, 1993) กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส IHHNV จะป่วยเป็นโรคแกระแกร็น (Runt-deformity syndrome; RDS) ซึ่งเป็นลักษณะของการติดเชื้อแบบเรื้อรัง โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะมีกริบิดเบี้ยวหรือคดงอ หนวดคู่ที่ 2 พับไปมา เปลือกขรุขระหรือผิดปกติรูปร่าง

มากกว่าที่จะทำให้กุ้งตาย ลักษณะดังที่กล่าวมาจะสังเกตได้หลังจากปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อประมาณ 30 วัน กุ้งที่มีการติดเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก

กุ้งตัวเต็มวัยที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการของโรคแต่สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งตัวอื่น ๆ ในโรงเพาะฟักได้โดยติดต่อผ่านทางพ่อแม่พันธุ์ไปสู่ลูก และผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงและการกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดังกล่าวได้ (Bell and Lightner, 1984; Brock and Main, 1994)

จากการศึกษาของ Emmerik *et al.* (2003) ซึ่งได้ทำการศึกษากุ้งที่ติดเชื้อไวรัส IHNV ผ่านทางพ่อแม่พันธุ์ไปสู่ลูก โดยทดลองผสมพันธุ์พ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ติดเชื้อ IHNV พบว่าในกุ้งเพศเมียจะพบเชื้อไวรัส IHNV ในรังไข่ (Ovary) ในขณะที่ไม่พบเชื้อไวรัส IHNV ในอสุจิ (Sperm) ของกุ้งเพศผู้ที่ติดเชื้อไวรัสดังกล่าวแต่อย่างใด ส่วนการศึกษาของจิรพร (2547) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของเชื้อไวรัส IHNV ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งขาวแฉะฟัก พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อ IHNV จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากุ้งปกติสอดคล้องกับการศึกษาของ Lightner (1996) ที่รายงานว่ากุ้งระยะ Juvenile ที่มีอาการ RDS จะมีขนาดแตกต่างกันมากภายในบ่อเดียวกัน โดยจะมีค่าความแปรปรวนของขนาดตัวกุ้งมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งปกติมีความแปรปรวนของขนาดตัวกุ้งประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

สำหรับลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่เป็นโรค IHNV จะพบว่าการเกิด Inclusion body โดยมีการเกิดลักษณะของ Cowdry type A ที่ล้อมติดสีชมพูของ Eosin ร่วมด้วยโดยพบว่าเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น Ectoderm และ Mesoderm จะมีขนาดของนิวเคลียสใหญ่ขึ้น (Bell and Lightner, 1984) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิค *In situ* hybridization ร่วมกับการใช้ Probe ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ IHNV ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ IHNV ในระยะแรก ๆ ของกุ้งที่ติดเชื้อ IHNV ได้ ซึ่งสามารถใช้แยกเชื้อไวรัส IHNV ออกจากเชื้อ WSSV ได้ด้วย (Lightner, 1993; Lightner and Redman, 1998) หรืออาจใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบการติดเชื้อ IHNV ได้ด้วย (Tang and Lightner, 2001)

2.1.5 โรคที่เกิดจากเชื้อ Baculovirus penaei (BP)

เชื้อไวรัส BP เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ (dsDNA) (Francki *et al.*, 1991) โดยอนุภาคของเชื้อไวรัสจะมีขนาดขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ (Lightner, 1996; Durand *et al.*, 1998) สำหรับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส BP จะส่งผลทำให้มีการกินอาหารน้อยลงเจริญเติบโตช้า และอาจ

สังเกตพบว่าทางเดินอาหารของกิ้งมั่งจะมีสีขาว (Lightner, 1983) เนื่องจากเชื้อไวรัส BP ได้เข้าไปทำลายเซลล์บริเวณ Epithelium ของ Hepatopancreas และ Midgut ส่งผลทำให้เซลล์บริเวณนั้นมีการหลุดลอกออกมาผ่านทางลำไส้และจะถูกขับออกมากับอุจจาระ (Couch, 1991) สอดคล้องกับการทดลองของ Stuck and Overstreet (1994) ที่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของเชื้อ Baculovirus ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกิ้งขาวระยะวัยอ่อน ซึ่งพบว่ากิ้งที่ได้รับเชื้อ Baculovirus จะมีการติดเชื้ออย่างรุนแรงและตายในที่สุด ส่วนกิ้งที่รอดชีวิตจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเทียบกับกิ้งปกติ

ส่วนการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ป่วยพบว่า Tubular epithelial cell บริเวณ Hepatopancreas และเนื้อเยื่อ Epithelial cell ของ Midgut พบการเกิด Occlusion body ที่มีลักษณะรูปทรงปิรามิดเกิดขึ้นในนิวเคลียส โดยพบว่ามีความยาวของ Occlusion body น้อยกว่า 0.1 ไมโครเมตร จนถึง 20 ไมโครเมตร ตั้งแต่ฐานถึงยอดและมีความยาว 8-10 ไมโครเมตร (Lightner, 1996)

2.1.6 โรคที่เกิดจากเชื้อ Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) และ Monodon baculovirus (MBV)

เชื้อไวรัส HPV มีการศึกษาพบครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ (Chong and Loh, 1984) เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA แบบสายเดี่ยว (ssDNA) ในครอบครัว Parvoviridae มีรูปร่างหลายแบบไม่มีผนังหุ้มสารพันธุกรรม (Sukhumsirichart *et al.*, 1999)

จากการศึกษาของ Flegel *et al.* (1997) พบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัส HPV กับอาการโตช้าของกิ้งกุลาค่าที่เลี้ยงในฟาร์ม โดยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า ความรุนแรงจะมากขึ้นถ้ามีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อไวรัส MBV กับ HPV ต่อมา Flegel *et al.* (2003) ได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเชื้อไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทย พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิดร่วมกันคือ HPV และ MBV ในอัตราค่อนข้างสูง ซึ่งกิ้งที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดดังกล่าวจะมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตชะงักและกิ้งมีอาการแคระแกร็น ทั้งนี้การติดเชื้อไวรัส HPV มีผลต่อกิ่งมากกว่าเชื้อไวรัส MBV และจากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดดังกล่าวด้วยเทคนิค PCR พบว่า 94 เปอร์เซ็นต์ ของกิ้งกุลาค่าที่ตรวจมีการติดเชื้อจากไวรัสชนิดเดียว และ 79 เปอร์เซ็นต์ เป็นกิ้งที่มีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด

สำหรับกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเมื่อตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพพบว่าเซลล์ Hepatopancreas ที่ติดเชื้อไวรัสจะส่งผลทำให้นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นและพบการเกิด Inclusion body ที่ย้อมติดสีน้ำเงินของ Hematoxylin (Lightner, 1996) ซึ่งกุ้งที่ติดเชืชนิดนี้จะทำให้โตช้าเนื่องจาก Hepatopancreas ถูกทำลาย ทำให้ไม่สามารถผลิตน้ำย่อยและสะสมอาหารได้ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ส่วนการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส MBV นั้นมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1981 (Lightner and Redman, 1981) โดยเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA แบบสายคู่ (dsDNA) ในกลุ่ม Occluded baculovirus และเมื่อตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพพบว่าเซลล์ Hepatopancreas ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส MBV จะมีการเกิด Occlusion body ขึ้นเป็นจำนวนมาก (Lightner, 1996)

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่

2.2.1 โรค Vibriosis

โรค Vibriosis มีสาเหตุจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีลักษณะเป็นแท่งสั้น (Short rod) สำหรับเชื้อ *Vibrio* ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแปซิฟิก ได้แก่ *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* และ *Vibrio* sp. (Mohney *et al.*, 1994; Lightner, 1996; Gomez-Gil *et al.*, 1998) โรค Vibriosis เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในโรงเพาะฟัก เมื่อเกิดการระบาดของเชื้อ *Vibrio* จะทำให้ลูกกุ้งมักจะติดเชื้อเกือบทั้งหมด (Brock and Main, 1994; Hu and Tao, 2000) ซึ่งโดยปกติเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในการเลี้ยงกุ้งสามารถพบได้ทั้งในทางเดินอาหาร Hepatopancreas และน้ำเลือดของกุ้งปกติ (Gomez-Gill *et al.*, 1998; Moss *et al.*, 2000) แต่จะก่อโรคเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมแล้วมีการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งสาเหตุที่ทำให้กุ้งติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากความเครียดอันเนื่องมาจากระบบการเลี้ยงที่หนาแน่นจนเกินไป และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เนื่องจากกุ้งที่อยู่ในสภาวะเครียดจะมีภูมิคุ้มกันต่ำทำให้มีโอกาสติดเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น (Burrell *et al.*, 1991; Nash *et al.*, 1992; Mohney *et al.*, 1994; Mikulski *et al.*, 2000; Labric, 2001) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกายเชื้อจะเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อหรือแพร่กระจายเข้าไปในระบบต่าง ๆ ทั่วร่างกาย โดยถ้ามีการติดเชืบริเวณเปลือกจะส่งผลทำให้เกิดเป็นแผลสีดำหรือน้ำตาลที่บริเวณดังกล่าวเรียกการเกิดความผิดปกติใน

ลักษณะนี้ว่า โรคจุดดำหรือน้ำตาล (Black or brown spot disease) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้ามีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. อย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดการตายของกุ้งสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ได้

จากการศึกษาของ Lightner (1996) พบว่ากุ้งกุลาดำในบ่อดินที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. จะมีการเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการตายสูงเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ สำหรับกุ้งขาวแปซิฟิกที่เป็นโรค Vibriosis พบว่าอาการของโรคมียังที่เป็นแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยกุ้งจะเริ่มแสดงลักษณะและพฤติกรรมภายนอกที่ผิดปกติก่อน ได้แก่ การเบื่ออาหาร ว่ายน้ำไร้ทิศทาง และมักขึ้นมามีขนบริเวณอยู่บริเวณผิวหนังและขอบบ่อ เนื่องจากปริมาณออกซิเจนในเลือดต่ำ (Hypoxia) (Robertson *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณเปลือก ระบายและเหงือกอาจเกิดการอักเสบ กล้ามเนื้อมีสีขุ่นเนื่องจากกล้ามเนื้อตายและยังพบอาการรังแคครวบรวมอยู่ด้วย (Takahashi *et al.*, 1985; Sindermann, 1990; Brock and Main, 1994)

สำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งทำให้เกิดโรคเรืองแสง ส่งผลให้ลูกกุ้งในโรงเพาะฟักมีอัตราการตายสูงมากและทำให้กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงเสียหายเป็นจำนวนมากเช่นกัน โดยเฉพาะในช่วงที่น้ำมีความเค็มสูง (ชลอ, 2543)

2.2.2 โรค Gill disease

โรค Gill disease หรือเรียกว่าโรคเหงือกดำ มักเกิดในกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อที่น้ำมีสีเข้ม หรือมีเลนกระจายอยู่ทั่วบ่อ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการที่มีสารอินทรีย์สะสมอยู่ที่บริเวณพื้นบ่อเป็นจำนวนมาก จึงส่งผลทำให้กุ้งมีอาการอ่อนแอและมีการสะสมของตะกอนดินหรือสารอินทรีย์ดังกล่าวบริเวณเหงือกได้ โดยก่อนที่กุ้งจะแสดงอาการป่วยหรือเริ่มตายนั้น มักพบว่ากุ้งเริ่มมีเหงือกสีดำ ถ้าแก้ปัญหาบริเวณเหงือกไม่ทัน กุ้งก็จะตาย ซึ่งการแก้ปัญหาโรคเหงือกดำนั้นสามารถทำได้ง่าย โดยเมื่อพบว่าเหงือกของกุ้งบางตัวเริ่มมีสีเข้ม ควรลดการให้อาหารลง หรืออาจมีการเพิ่มเครื่องให้อากาศให้มากขึ้น และเมื่อสภาพในบ่อดีขึ้น กุ้งก็จะสามารถปรับตัวหายไปได้เอง ภายหลังจากการลอกคราบ 2-3 ครั้ง เหงือกสีดำก็จะหายไปเอง (ฉัตรชนน, 2549)

2.2.3 โรค Necrotizing hepatopancreatitis (NHP), Texas necrotizing hepatopancreatitis (TNHP), Texas pond mortality syndrome หรือ Peru necrotizing hepatopancreatitis (PNHP)

โรค NHP พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 ในมลรัฐเท็กซัส (Johnson, 1989) เชื่อกันว่ามีสาเหตุมาจาก Alpha proteobacteria (Frelie *et al.*, 1994) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีขนาดเล็ก ในวัฏจักรชีวิตของแบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างของเซลล์ 2 แบบ คือ มีรูปร่างเป็นแท่งคล้าย Rickettsia ขนาด 0.3×9 ไมโครเมตร ไม่มี Flagella ส่วนอีกรูปแบบเป็นแบบเกลียว มีขนาด $0.2 \times 2.6-2.9$ ไมโครเมตร มี Flagella 8 เส้นอยู่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (Lightner *et al.*, 1992) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์เยื่อหุ้มของตับและตับอ่อน โรคนี้ก่อให้เกิดการตายอย่างมากในกุ้งขาว อาจเรียกลักษณะการตายแบบนี้ว่า “Granulomatous hepatopancreatitis and the Texas pond mortality syndrome” (Frelie *et al.*, 1993) สำหรับอาการที่พบ Lightner and Redman (1994) รายงานว่า กุ้งจะกินอาหารลดลงเนื่องจาก เกิดภาวะเบื่ออาหารทำให้ ลำไส้ไม่มีอาหาร อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำลง อัตราการเจริญเติบโตลดลง เปลือกและลำตัวนูน เหงือกดำ มีการกระจายตัวของเม็ดสี จนทำให้ปลายยางค์และหางมีสีเข้มขึ้น กุ้งอ่อนแอจนทำให้ตัวสกปรกมีปรสิตเกาะตามตัวเป็นจำนวนมาก อาจมีอาการของการติดเชื้อแบคทีเรียบริเวณเปลือกทั่วตัว และยังพบว่ากุ้งที่ป่วยจะว่ายน้ำช้าลง อาจพบอาการตับฝ่อและมีสีซีดลง หรือบางครั้งพบว่า Hepatopancreas อาจนูนและมีอาการบวมน้ำเกิดขึ้น นอกจากนี้อาจพบการเกิดกระบวนการสร้าง Melanin ในท่อภายใน Hepatopancreas ร่วมด้วย (จิราพร, 2547)

การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อใน Hepatopancreas พบว่าเซลล์ในท่อ Hepatopancreas จะฝ่อและมีลักษณะการเกิดเนื้องอกเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้เซลล์เยื่อหุ้มของท่อ Hepatopancreas จะมีขนาดเล็กลง และมีรูปร่างเปลี่ยนจากที่เป็นแบบ Simple columnar เป็นลักษณะของเซลล์แบบ Cuboidal สำหรับลักษณะเซลล์ของเนื้องอกที่พบจะเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปกติ (Hypertrophy) ซึ่งย้อมติดสีน้ำเงินของ Hematoxylin (Lightner and Redman, 1992)

3. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

สำหรับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม Crustaceans นั้นไม่มีภูมิคุ้มกันโรคแบบจำเพาะเจาะจง (Specific immunity) แต่มีการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immune response) หรือในแบบที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่งส่วนใหญ่อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายเป็นหลัก (Söderhäll and Cerenius, 1992) ทั้งนี้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ซึ่งรวมถึงกุ้งด้วยนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยการทำงานของเซลล์ (Cellular defenses) และระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยสารน้ำที่หมุนเวียนอยู่ภายในกระแสเลือด (Humoral defenses) (Ratcliffe *et al.*, 1985) ซึ่งทั้ง 2 ระบบมีลักษณะสำคัญ ดังนี้

3.1 การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ (Cellular immune response)

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในระบบนี้ จะอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ เป็นสำคัญ ซึ่งโดยทั่วไปสามารถแบ่งเซลล์เม็ดเลือดกุ้งออกได้เป็น 3 ชนิด (Martin and Graves, 1985; Hose *et al.*, 1990; Vargas-Albores, 1995) ตามการมีหรือไม่มีและจำนวนของเม็ด Granules ขนาดของเซลล์ ลักษณะการติดสีและโครงสร้างของเม็ด Granules ใน Cytoplasm ซึ่งได้แก่

(1) เซลล์เม็ดเลือดชนิด Hyaline cell (Hyalinocyte หรือ Non-granular cell)

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด มีรูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ ไม่มีเม็ด Granules อยู่ภายในเซลล์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีขอบเขตของไซโตพลาสซึมน้อย เป็นเม็ดเลือดที่มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยอาศัยกระบวนการ Phagocytosis ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Söderhäll and Smith, 1986) ทั้งนี้เนื่องจากภายใน Cytoplasm มีการเก็บสะสมโปรตีนจำพวก Lysozymes รวมถึง Proteolytic enzyme หลาย ๆ ชนิด ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินและทำลายเชื้อโรคโดยการย่อยภายในเซลล์ (Söderhäll and Cerenius, 1992) นอกจากนี้ยังมีการสร้าง Superoxide anion ซึ่งสามารถทำให้เกิดการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมอีกหลายชนิดตามมาได้ (Bauchau, 1981; Söderhäll and Cerenius, 1992)

(2) เซลล์เม็ดเลือดชนิด Semi-granular cells (Semigranulocyte)

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง Hyaline cell และ Granular cell มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน ยาว 9.0-14.2 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543) นิวเคลียสมีขนาดเล็กอยู่ตรงกลางเซลล์หรือขอบเซลล์ ภายใน Cytoplasm มี Granules ขนาดเล็กลักษณะเซลล์ไม่แน่นอน เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่รับรู้และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยการสร้าง Nodule formation และ Encapsulation รวมทั้งมีความสำคัญต่อการเกิดกระบวนการ Phenoloxidase activating system ซึ่งมีความสำคัญในการสร้าง Melanin นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดอีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1998; Söderhäll *et al.*, 1994; Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000; Sung *et al.*, 1996; Perazzolo and Barracco, 1997)

(3) เซลล์เม็ดเลือดชนิด Granular cell (Granulocyte)

เซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ มีนิวเคลียสขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 8-10 ไมครอน กว้าง 7.2-7.8 ไมครอน ยาว 12.2-14.6 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543) ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับ Semigranulocyte (Baucha, 1981) มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการทำงานของระบบ Phenoloxidase activating system (Söderhäll and Cerenius, 1992)

สำหรับกระบวนการในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดนั้น ได้แก่กระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

3.1.1 กระบวนการ Phagocytosis

เป็นกระบวนการในการที่ใช้ทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่บุกรุกหรือเข้าไปในตัวกุ้ง โดยเมื่อสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกาย เม็ดเลือดชนิด Hyalinocytes จะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอมนั้น (Fontaine and Lightner, 1975) แล้วจึงเกิดการยึดเกาะกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นผิวของเซลล์เม็ดเลือดเกิดการเว้าเข้าไปเกิดเป็น Phagosome จะสัมผัสและรวมกับ Lysosome เกิดเป็น Phagolysosome ซึ่ง Lysosome นั้นมีเอนไซม์หลายชนิดที่เรียกว่า Acid hydrolases ทำหน้าที่ย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้

เป็นหน่วยย่อยเล็ก ๆ และมีการแตกตัวของออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวส์เป็น Superoxide anion ด้วย NADPH oxidase หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น Hydrogen peroxide โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วย Superoxide dismutase กระบวนการนี้จึงถือเป็นขั้นตอน ๆ หนึ่งที่มีความสำคัญมากในการกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Klein, 1982)

3.1.2 กระบวนการ Nodule formation และ Encapsulation

การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้ เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่และจำนวนมากเข้าสู่ร่างกาย จนทำให้เซลล์เม็ดเลือดใช้กระบวนการ Phagocytosis กำจัดออกได้ไม่ทัน ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดจะอาศัยกระบวนการ Nodule formation ในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาเป็นจำนวนมาก เพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายไปทั่วร่างกาย ส่วนการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น พยาธิ เชื้อรา ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ จะอาศัยกระบวนการ Encapsulation ในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว (พชรวดี, 2549; จิตวัฒนา, 2550) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดชนิด Semi-granulocyte และ Large granulocyte นอกจากเกิดกระบวนการในการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวแล้ว ยังมีกลไกของการห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้าย Capsule (Persson and Söderhäll, 1987) จากนั้นจะอาศัยกระบวนการอันเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ Prophenoloxidase ในการสร้าง Melanin เพื่อกำจัดหรือยับยั้งเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวในขั้นตอนต่อไป (Ratcliffe *et al.*, 1985)

3.2 การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยการอาศัยสารน้ำที่อยู่ภายในเซลล์ (Humoral immune response)

สำหรับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในระบบนี้ จะอาศัยการทำงานของสารประกอบในน้ำเลือด ซึ่งส่วนใหญ่ถูกหลั่งมาจาก Granules ที่อยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียหรือทำให้เกิดการแตกของเซลล์ (Smith and Söderhäll, 1983) โดยอาศัยกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

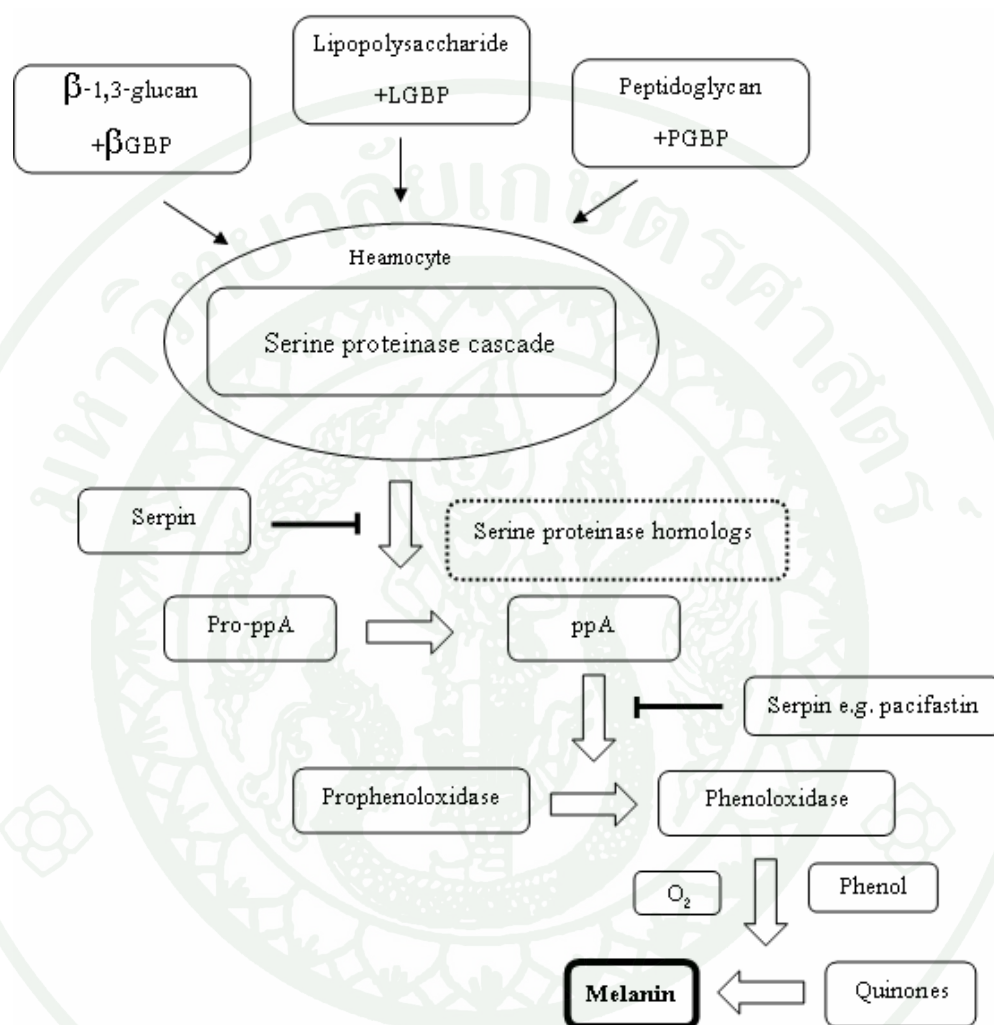
3.2.1 กระบวนการ Phenoloxidase activating system

การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในระบบ Phenoloxidase activation นี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ Prophenoloxidase ซึ่งอยู่ภายในเม็ด Granules ของเซลล์เม็ดเลือดทั้งชนิด Granulocyte และ Semi-granulocyte เป็นสำคัญ (Söderhäll and Smith, 1986; Sung *et al.*, 1996) โดยกระบวนการดังกล่าวนี้จะเกิดขึ้นโดยอาศัย Pattern recognition proteins (PRPs) โดย PRPs จะจับกับองค์ประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ของจุลชีพ ได้แก่ Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PG) และ β -1,3 glucan (BG) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า “ LPS-LPS-Binding protein complex (LPS-BP), PG-PG-binding protein complex (PG-BP) และ β -glucan- β -1,3 glucan binding protein complex (BG-BP) ” ตามลำดับ จากนั้นองค์ประกอบร่วมดังกล่าวจะจับกับ Receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือด แล้วจึงส่งผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ Degranulation ทำให้เม็ด Granules แตกออกสู่ภายนอกเซลล์เม็ดเลือด ส่งผลทำให้ Prophenoloxidase (proPO) ซึ่งอยู่ในรูปของ Inactive form เปลี่ยนไปเป็น Phenoloxidase (PO) ที่อยู่ในรูป Active form และสามารถยึดจับกับผิวของจุลชีพได้ โดยขั้นตอนนี้จะอาศัยเอนไซม์ที่เรียกว่า proPO-activating enzyme (PPAE) และ Serine proteinase homologues (SPHs) cofactor ที่ถูกปล่อยออกมาพร้อมกับ Prophenoloxidase ซึ่ง PPAEs และ SPHs สามารถเรียกรวมกันได้ว่า proPO-activating factor (PPAFs) หลังจากนั้น Phenoloxidase จะเร่งปฏิกิริยา Hydroxylation เพื่อเปลี่ยน Tyrosinase ให้เป็น Dihydroxylation และเกิดการ Oxidize สาร Dihydroxyphenylalanine (DOPA) ให้เป็นสารประกอบ Quinone จากนั้นจึงจะเกิดกระบวนการสร้าง Melanin ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของจุลชีพได้ในที่สุด โดย Melanin จะช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992) (ภาพที่ 2)

3.2.2 การแข็งตัวของเลือด (Hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังได้รับบาดเจ็บ เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการติดเชื้อโรคผ่านทางบาดแผลเข้ามาในร่างกาย โดยอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิด Semi-granular cell และ Large granular cell ซึ่งมี Granules อยู่ภายในและเมื่อ Granules แตกออก สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ Coagulogen ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน จากข้อมูลในปัจจุบันพบว่าในบางกรณีการที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้นั้น อาจเกิดจากที่เม็ดเลือดมีปริมาณลดลงเนื่องจากการติดเชื้อโรคบางชนิด (Martin *et al.*, 1993)

และพบว่า การแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (Melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบ Phenoloxidase (Johansson and Söderhäll, 1985)



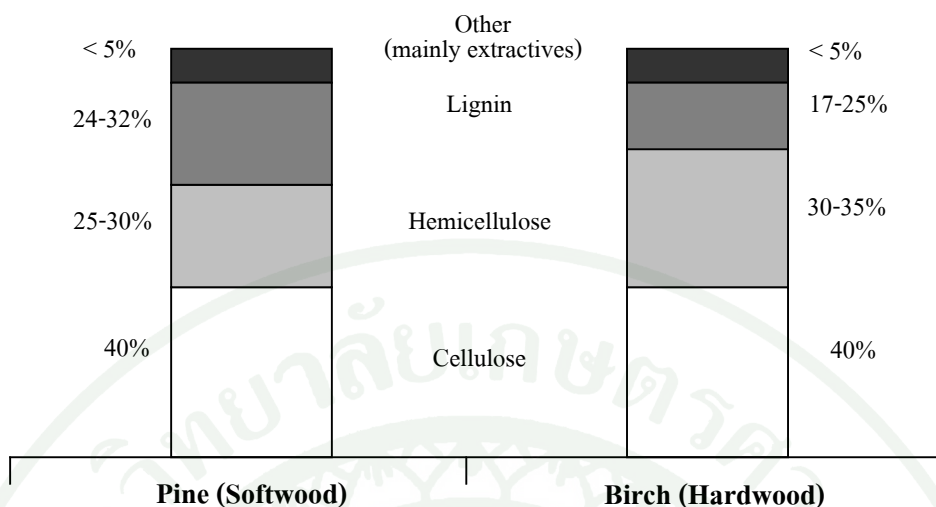
ภาพที่ 2 ภาพรวมของระบบ Prophenoloxidase (proPO) ในสัตว์กลุ่ม Arthropod

ที่มา: Cerenius and Söderhäll (2004)

4. ลิกนิน

4.1 คุณลักษณะทั่วไปของลิกนิน

ลิกนินเป็นสาร โมเลกุลขนาดใหญ่ที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืช พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส พบในกลุ่มของพืชที่มีท่อลำเลียง ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่พืช ทำให้พืชต้านทานต่อแรงกดดันและการบุกรุกของจุลินทรีย์ได้ (Brown, 1985) สามารถพบลิกนินได้ใน Ferns และ Club mosses แต่ไม่พบในพืชกลุ่ม Bryophyta (True mosses) รวมทั้งพืชชั้นต่ำ สำหรับพืชชั้นสูงที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบได้แก่พืชในกลุ่ม Angiosperms, Gymnosperms และ Monocotyledons ซึ่งเป็นกลุ่มพืชที่สำคัญและมีจำนวนมากที่สุดบนพื้นโลก ลำต้นของเนื้อไม้ Angiosperms จะประกอบด้วยลิกนิน ร้อยละ 18-25 ของเนื้อเยื่อแห้ง ส่วนใน Gymnosperms และ Monocotyledons ประกอบด้วยลิกนินร้อยละ 25-35 และร้อยละ 10-15 ของเนื้อเยื่อแห้ง ตามลำดับ (Cowling and Kirk, 1976) ดังนั้นลิกนินจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญของพืชซึ่งเป็นผลจากการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงอยู่ได้ในสภาพที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน โดยในไม้เนื้อแข็งจะมีสัดส่วนของลิกนินอยู่ประมาณร้อยละ 17-25 ส่วนในไม้เนื้ออ่อนจะมีสัดส่วนของลิกนินประมาณร้อยละ 24-32 ในเส้นใยเปลือกลำต้น (Bast fibres) เช่น ป่านลินิน ป่านมนิลา และปอ จะมีองค์ประกอบของลิกนินอยู่เล็กน้อยและแทบจะไม่มีเลยในเส้นใยฝ้าย (ภาพที่ 3)



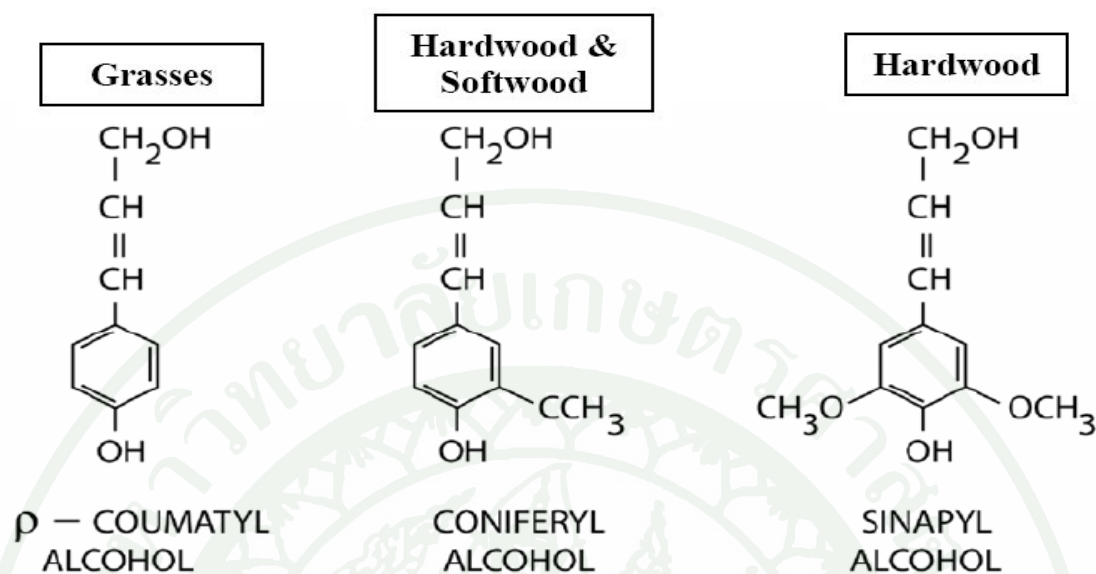
ภาพที่ 3 องค์ประกอบต่าง ๆ ของเนื้อไม้และปริมาณลิกนินที่พบในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน

ที่มา: ปรีชา (2528)

ลิกนินเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไม่มีรูปผลึก จะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน และมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย โครงสร้างพื้นฐานของลิกนินคือ Phenylpropane หรือสารประกอบ Hydrocarbon ที่มี Carbon 9 อะตอม ประมาณร้อยละ 65-67

4.2 โครงสร้างของลิกนิน

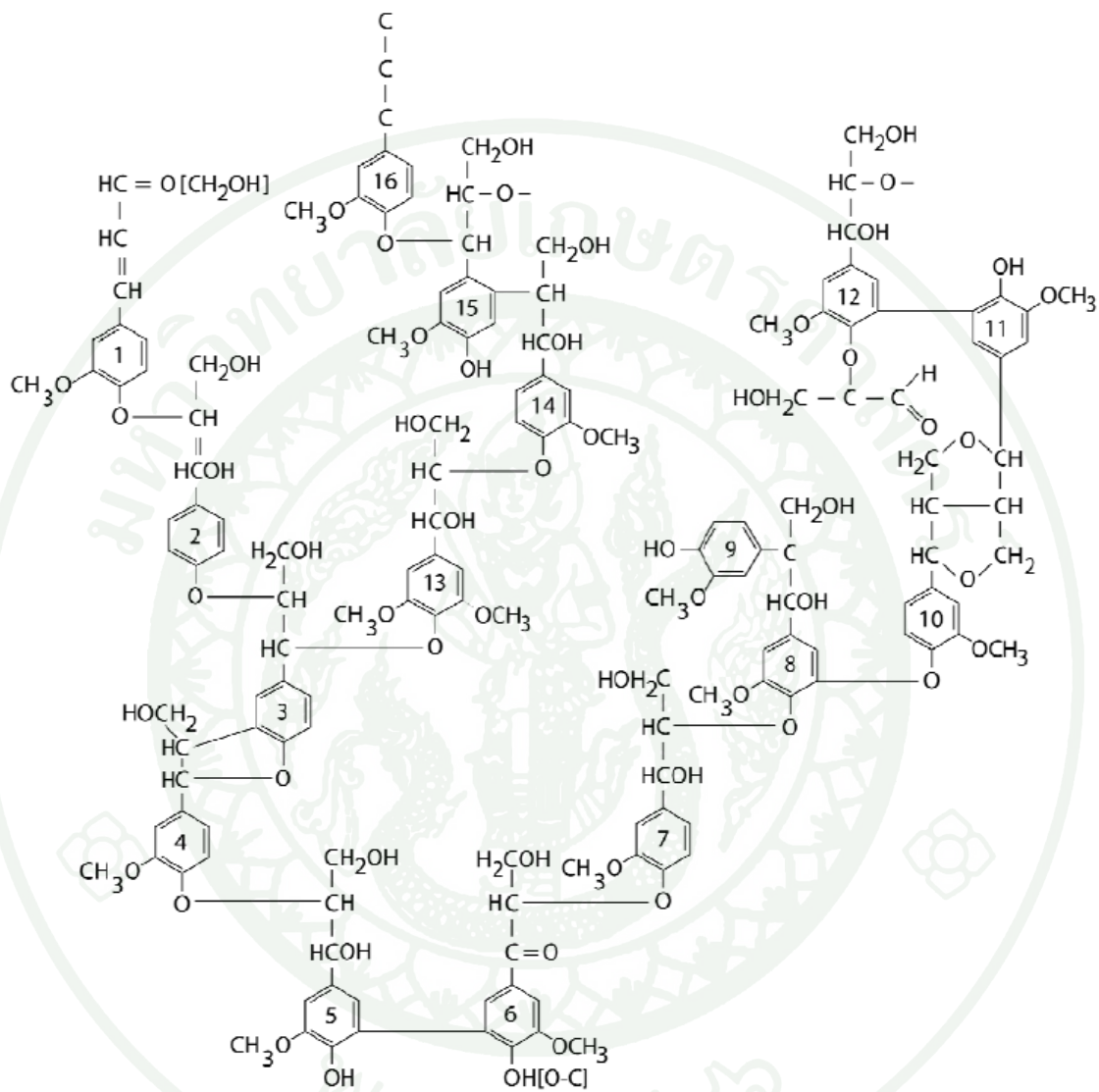
ลิกนินจัดเป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างได้หลายรูปแบบและมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ตั้งแต่ 10 ถึง 1,000 kDa หรือมากกว่า (Eggeling, 1983) เป็นสาร โมเลกุลขนาดใหญ่ที่สังเคราะห์ขึ้นจากหน่วยย่อย Phenylpropanoid 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ *p*-coumaroyl alcohol, Coniferyl alcohol และ Sinapyl alcohol (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครงสร้างหลัก 3 รูปแบบของลิกนินที่พบในพืชตามธรรมชาติ

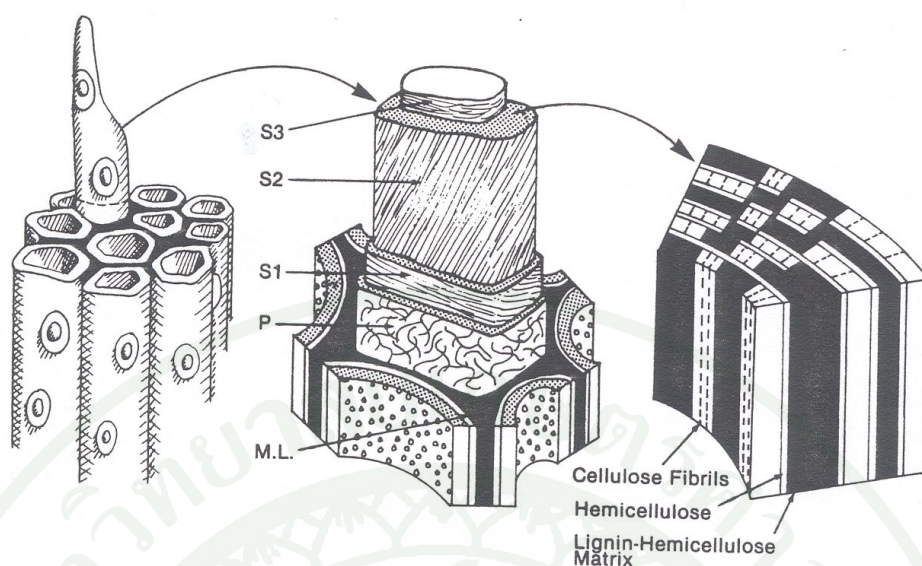
ที่มา: คัดแปลงจากปรีชา (2528)

โดยหน่วยย่อยทั้ง 3 ชนิดนี้ มีปริมาณหรือสัดส่วนในเนื้อไม้ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Bisaria and Chose, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวกันเป็นโครงสร้างสามมิติ โดยการสร้างพันธะอีเธอร์ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่สี่ของวงแหวนฟีนอลกับคาร์บอนที่ตำแหน่ง β ของ Side chain โดย Side chain ของลิกนินจะประกอบด้วย Cinnamyl alcohol, Aldehyde และ Hydroxylated การจับกันด้วยพันธะอีเธอร์และการสร้างเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้โมเลกุลของลิกนินมีความแข็งแรงและทนต่อการย่อยสลายมาก (Evans, 1987) (ภาพที่ 5) โดยทั่วไปแล้วในพืชสามารถพบลิกนินได้ในชั้น Middle lamella (Norkrans, 1967; Cowling and Kirk, 1976) (ภาพที่ 6) ซึ่งจะทำหน้าที่สำคัญในการห่อหุ้มชั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (ภาพที่ 7)



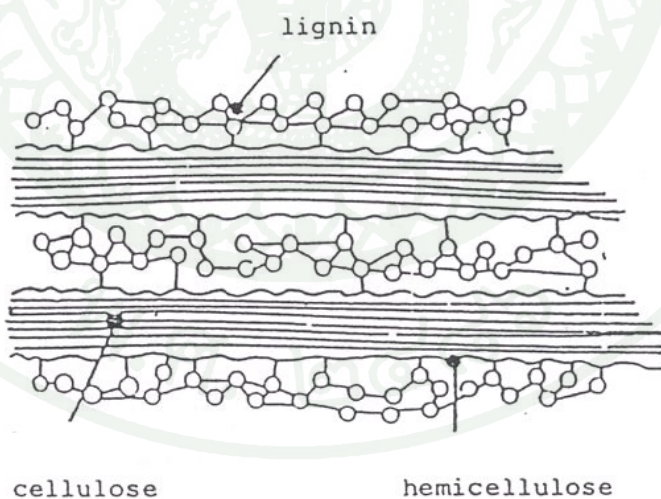
ภาพที่ 5 ลักษณะโครงสร้างลิกนินของต้นสน

ที่มา: Evans (1987)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของเนื้อไม้ บริเวณเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (ซ้าย) ภาพตัดขวางของผนังเซลล์ (กลาง) และ ภาพความสัมพันธ์ของลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสใน Secondary wall (ขวา) (S1-S3 คือ Secondary wall layer; P คือ Primary wall และ M.L. คือ Middle lamella)

ที่มา: Kirk and Cullen (1988)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของลิกนินซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Norkrans (1967)

4.3 คุณสมบัติและประโยชน์ทางอุตสาหกรรมของสารลิกนิน

จากการรายงานของชิตี (2552) พบว่าสารลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินนั้น มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น

ในอุตสาหกรรมกระดาษ สารลิกนินและอนุพันธ์ของสารลิกนินจะใช้เป็นสารยึดติด (Adhesives) เช่น สารกั้นซึม (Sizes), สารเชื่อมติด (Binders) และสารเคลือบ (Coatings)

ส่วนในอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์การเกษตร (Agricultural chemicals) จะใช้สารลิกนินและอนุพันธ์ของสารลิกนินในการเป็นเคมีภัณฑ์สำหรับปรับปรุงดิน เคมีภัณฑ์ควบคุมฝูง น้บูย ยามาแมลง ยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จะใช้สารลิกนินและอนุพันธ์ของสารลิกนินในกระบวนการหมักและเป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์

อุตสาหกรรมการผลิตซีเมนต์ โดยการใช้สารลิกนินและอนุพันธ์ของสารลิกนินผสมในซีเมนต์เพื่อเพิ่มคุณสมบัติต่าง ๆ ของซีเมนต์ให้ดีขึ้น เช่น ช่วยให้การแข็งตัวของซีเมนต์ดีขึ้น และเพิ่มความแข็งแรงคงทนของซีเมนต์ เป็นต้น

อุตสาหกรรมการขุดเจาะน้ำมัน เช่น ใช้เป็น Drilling fluids และ Oil well sealants

อุตสาหกรรมยาง สารลิกนินและอนุพันธ์ของสารลิกนินจะใช้เป็นสารเติมแต่ง สารเร่งปฏิกิริยา สารช่วยให้มีการยืด (Elastomer) และยังทำหน้าที่เป็นสารช่วยให้เกิดความเป็นพลาสติกดีขึ้น (Plasticizer)

นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารลิกนินและอนุพันธ์ของสารลิกนินในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น ใช้เป็นสารช่วยกระจาย (Dispersing agent) มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายอย่างเช่น การกำจัดหมึกในอุตสาหกรรมกระดาษ การชุบเคลือบและอุตสาหกรรมสิ่งทอ ได้แก่ การฟอกย้อม เป็นต้น รวมไปถึงยังใช้ทำเคมีภัณฑ์สำหรับผลิตน้ำให้บริสุทธิ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ได้แก่ สารพวก Ion exchange และยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังและอุตสาหกรรมแบตเตอรี่ เป็นต้น ได้อีกด้วย

4.4 คุณสมบัติและประโยชน์ของสารลิกนินทางการแพทย์

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารลิกนิน รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารลิกนินนั้นมีคุณสมบัติที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของไวรัสชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น

จากการศึกษาของ Suzuki *et al.* (1989a) พบว่า Lignosulfonate ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของสารลิกนิน มีฤทธิ์ป้องกันการแข็งตัวของเลือดคล้ายกับ Heparin (Anticoagulant), ยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Antitumor activity) ได้หลายชนิด, กระตุ้น Macrophages ซึ่งจะมีคุณสมบัติสำคัญในการนำเสนอ Antigen ในกระบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันและเพิ่มจำนวนประชากรของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วยและยังมีคุณสมบัติเป็นสาร Polyelectrolytic ที่สามารถทำให้ Lymphocyte มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Mitogen) อีกด้วย

นอกจากนี้ Suzuki *et al.* (1989c) ยังพบว่าการใช้ลิกนินที่ความเข้มข้น $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเกิด Cytopathic effect (CPE) ซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำของไวรัส HIV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาจเป็นผลมาจากที่ลิกนินจะเข้าจับอนุภาคของไวรัสทำให้ไม่สามารถจับกับ Receptor ของเซลล์ Host ได้ นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากที่ลิกนินสามารถจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้

จากรายงานของ Sorimachi *et al.* (1990a) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับอนุพันธ์ของลิกนิน EP3 และ Lignosulfonate (LS) พบว่าอนุพันธ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเกิด Cytopathic effect ของ Herpes virus (type 1 และ type2) ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Suzuki *et al.* (1990) ซึ่งรายงานว่า EP3 สามารถยับยั้งการเกิด CPE ของโรคไวรัสเอดส์ใน *in vitro* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เขายังแสดงให้เห็นว่า Lignosulfonate (LS) เป็นตัวกระตุ้นกระบวนการ Glycolysis ในเซลล์ Macrophages ของหนูและส่งผลต่อเนื่องทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ในไขกระดูก รวมทั้งยังมีฤทธิ์ในการต้านไวรัสชนิดดังกล่าวได้อีกด้วย

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Zhang *et al.* (2007) พบว่า Lignin-polysaccharide complex ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของลิกนินมีฤทธิ์ต้าน Herpes simplex virus (HSV) ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการจับของไวรัสและการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และยังพบว่าลิกนินในรูปแบบของอนุพันธ์ Lignophenol ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันโรคความเสื่อมของระบบประสาทจากการเกิด oxidative stress และการอักเสบอีกด้วย (Akao *et al.*, 2004)

จากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวจึงเป็นที่น่าสนใจว่าควรมีการนำเอาสารลิกนินหรืออนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโรคในกลุ่มของไวรัส มาทดสอบกับเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคร้ายแรงในกึ่ง รวมทั้งควรมีการศึกษาความเป็นพิษของสารดังกล่าวต่อกึ่งทดลอง เพื่อที่จะทำให้การประยุกต์ใช้สารในกลุ่มนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสูงสุด ข้อมูลพื้นฐานจากการศึกษาในครั้งนี้จึงถือได้ว่ามีความสำคัญต่อการนำเอาสารเคมีชนิดใหม่ ๆ มาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกึ่งในปัจจุบันเพื่อส่งเสริมให้การเลี้ยงกึ่งของประเทศไทยเป็นการเลี้ยงที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อผู้บริโภคสามารถดำเนินต่อไปเป็นอาชีพที่มีความยั่งยืนในอนาคต



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและเครื่องมือต่าง ๆ

- 1.1 กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร
- 1.2 เข็มฉีดยาขนาด 24G x 1.5 นิ้ว
- 1.3 เครื่องชั่ง Mettler PJ 400
- 1.4 Autoclave (Hirayama)
- 1.5 Automatic micropipette ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Bio-Rad)
- 1.6 Centrifuge DYNAC II (Centrifuge Clay Adams)
- 1.7 Centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 1.8 Cylinder ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.9 Electrophoresis machine, MyRun (Bioactive)
- 1.10 Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.11 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 1.12 Gel documentation System (Syngene)
- 1.13 Gel star (Cambrex)
- 1.14 Glass/Teflon potter homogenizers
- 1.15 Hot air oven (Memmert)
- 1.16 Incubator 37 °C (Memmert)
- 1.17 Microwave oven (Sanyo Electric)
- 1.18 Microcentrifuge MIKRO 200R (Herrich)
- 1.19 Minicentrifuge (Profuge 6K, Korea)
- 1.20 Pipette tips ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Costar)
- 1.21 Pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 1.22 Plastic box สำหรับเก็บ Centrifuge tube ขนาด 1.5/2.0 มิลลิลิตร
- 1.23 PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Costar)
- 1.24 Powersupply power PAC 200 (Bio-Rad)

- 1.25 Spectrophotometer, Spectronic 401 (Milton Roy)
- 1.26 Spectrophotometer, Spectronic 2000 (Bausch&Lomb)
- 1.27 Takara thermal cycler (Takara)
- 1.28 Vortex-2 Genic (Scientific Industries, USA)
- 1.29 Waterbath shaker GFL 1083
- 1.30 -20 °C freezer (Mirage)
- 1.31 -80 °C ULT Freezer (Thermo Forma)

2. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการศึกษา Phagocytotic activity

- 2.1 ยีสต์ (Greater pharma LTD., Thailand)
- 2.2 Sodium chloride; NaCl (Merck)
- 2.3 Magnesium Chloride Hexahydrate; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (APS Finechem)
- 2.4 Magnesium Sulphate; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (APS Finechem)
- 2.5 Calcium chloride anhydrous; $CaCl_2 \cdot H_2O$ (APS Finechem)
- 2.6 Potassium chloride; KCl (APS Finechem)
- 2.7 D-Glucose anhydrous (APS Finechem)
- 2.8 Hepes (Fluka)
- 2.9 RPMI Medium (Merck)
- 2.10 Sodium citrate; $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Merck)
- 2.11 สไลด์ (Slide) และแผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)
- 2.15 ชุดย้อมเม็ดเลือด Wright and Giemsa (Bangkok science center)

3. สารเคมีสำหรับงานทางด้านอนุชีวโมเลกุลและการวินิจฉัยโรค Yellow head virus (YHV)

- 3.1 Absolute ethanol; C_2H_5OH (Merck)
- 3.2 Agarose (Conda)
- 3.3 Ampicillin sodium salt (Bio Basic Inc.)
- 3.4 Boric acid; H_3BO_3 (Merck)
- 3.5 Chloroform; $CHCl_3$ (Merck)
- 3.6 Diethyl pyrocarbonate (DEPC); $C_6H_{10}O_5$ (Sigma)

- 3.7 Ethidium bromide; EtBr (Sigma)
- 3.8 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), disodium salt dehydrate (Fluka)
- 3.9 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 0.05 mg (Ward Medic)
- 3.10 Isopropanol (Merck)
- 3.11 Sodium chloride; NaCl (Merck)
- 3.12 Sterile distilled water; dH₂O
- 3.13 *Taq* DNA polymerase (Fermantas)
- 3.14 Trizol reagent (Molecular Research Center)
- 3.15 Tris-base; Tris (Hydroxymethyl aminomethane, Pacific science)
- 3.16 10X *Taq* buffer with (NH₄)₂SO₄ (Fermantas)
- 3.17 100 mM dNTP (Ward Medic)

4. สัตว์ทดลองและวัสดุอุปกรณ์อื่น ๆ

- 4.1 กุ้งขาว ขนาดน้ำหนักประมาณ 12-15 กรัม จำนวน 1,000 ตัว จากฟาร์มเอกชน จังหวัดปทุมธานี
- 4.2 ตู้กระจกขนาด 80 ลิตรและเครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
- 4.3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวเบอร์ 3
- 4.4 น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์
- 4.5 น้ำมันปลาหมึก
- 4.6 สารประกอบลิกนินในรูปแบบผงของ Lignosulfonate (CAS NO.: 69011-61-6) ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตเชื้อกระดาก
- 4.7 น้ำเค็มสำหรับใช้เลี้ยงกุ้งขาว ความเค็ม 20 ppt
- 4.8 เครื่องวัดความเค็ม (Refractosalinometer)

วิธีการ

1. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารลิกนินที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายใน 96 ชั่วโมง (Medial lethal dosage at 96 hours; 96-hours LD₅₀)

ทำการทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารลิกนินที่ทำให้กุ้งขาวตายครึ่งหนึ่งภายในเวลาที่กำหนดที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-15 กรัม จากฟาร์มเอกชน จังหวัดปทุมธานี จำนวน 1,000 ตัว มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 3 ถัง เพื่อปรับสภาพให้สัตว์ทดลองคุ้นเคยก่อนเริ่มการทดลอง ในน้ำเค็ม 20 ppt โดยทำการให้อาหารกุ้งขาวสำเร็จรูปปกติ 2 ครั้งต่อวัน และให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งขาวมาแบ่งใส่ตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร ที่บรรจุน้ำความเค็ม 20 ppt ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 21 ตู้ จากนั้นทำการเลี้ยงปรับสภาพกุ้งในตู้ทดลองอีกครั้งเป็นเวลา 5 วัน จึงเริ่มทำการทดลอง

1.2 การเตรียมสารละลายลิกนิน

นำสารลิกนินในรูปของ Lignosulfonate มาละลายในเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ลำดับ

1.3 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารลิกนินที่สามารถฆ่ากุ้งขาวที่ 0 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้ ที่ 96 ชั่วโมง

ทำการหาความเข้มข้นของสารลิกนินต่ำสุดที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของสารลิกนินสูงสุดที่ไม่ให้กุ้งขาวตายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยแบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ตามระดับความเข้มข้นของสารลิกนินที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่ตัวกุ้ง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 นีคาน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซนต์

ชุดการทดลองที่ 2 นีคสารลิกนินเข้าสู่ตัวกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 นีคสารลิกนินเข้าสู่ตัวกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 นีคสารลิกนินเข้าสู่ตัวกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 นีคสารลิกนินเข้าสู่ตัวกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 6 นีคสารลิกนินเข้าสู่ตัวกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 7 นีคสารลิกนินเข้าสู่ตัวกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

นีสสารละลายในแต่ละชุดการทดลองเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่ 3 ของกุ้งขาวที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 ปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ชุดการทดลองละ 10 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ และนีสกุ้งขาวในชุดควบคุมด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำการสังเกตอาการและบันทึกผลการตายสะสมของกุ้งขาวตั้งแต่ชั่วโมงแรกจนถึง 96 ชั่วโมง หลังการนีสสารลิกนิน

1.4 การทดลองเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารลิกนินที่สามารถฆ่ากุ้งขาวได้ครึ่งหนึ่งที่ 96 ชั่วโมง

นำผลของการหาระดับความเข้มข้นของสารลิกนินที่สามารถฆ่ากุ้งขาวที่ 0 เปอร์เซนต์ และ 100 เปอร์เซนต์ ที่ 96 ชั่วโมงในข้อ 1.3 มาหาระดับความเข้มข้นของสารลิกนินที่สามารถฆ่ากุ้งขาวได้ครึ่งหนึ่งที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมงใหม่อีกครั้ง โดยนำค่าระดับความเข้มข้นของสารลิกนินที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซนต์ และความเข้มข้นของสารลิกนินสูงสุดที่ไม่ทำให้กุ้งตายเลย ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ตามสัดส่วน Logarithm โดยทำการแบ่งความเข้มข้นของสารลิกนินออกเป็น 5 ระดับ ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) ตามสูตรดังนี้

$$\log \text{ ระยะห่างของความเข้มข้นในแต่ละระดับ} = [(\log A) - (\log B)] / (n-1)$$

A คือ ความเข้มข้นของสารละลายลิกนินที่ทำให้กุ้งตาย 100 เปอร์เซนต์

B คือ ความเข้มข้นของสารละลายลิกนินที่ทำให้กุ้งตาย 0 เปอร์เซนต์

n คือ จำนวนระดับความเข้มข้นที่ต้องการ

นำกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-15 กรัม จากฟาร์มเอกชน จังหวัดปทุมธานี ที่ปรับสภาพคุ้นเคยแล้วมาแบ่งใส่ตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร ที่บรรจุน้ำความเค็ม 20 ppt ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 18 ตู้ ทำการเลี้ยงปรับสภาพกุ้งในตู้ทดลองอีกครั้งเป็นเวลา 5 วัน จึงเริ่มทำการทดลอง

จากนั้นเตรียมฉีดความเข้มข้นของสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ ตามที่คำนวณได้ โดยเจือจางสารลิกนินด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารลิกนินมาฉีดกุ้งขาว บริเวณกล้ามเนื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ระดับความเข้มข้นละ 3 ชั่วโมง ละ 10 ตัว และฉีดกุ้งในชุดควบคุมด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปริมาตรเดียวกันแล้วบันทึกอัตราการตายสะสมของกุ้งที่ 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการฉีด หลังจากนั้นนำข้อมูลอัตราการตายสะสมที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์เพื่อหาค่า LD₅₀ ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) ตามสูตรดังนี้

$$LD_{50} = A + \left\{ \left[\frac{50 - B}{C - B} \right] \times [D - E] \right\}$$

A คือ log ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

B คือ เปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

C คือ เปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

D คือ log ความเข้มข้นของสารลิกนินที่เปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

E คือ log ความเข้มข้นของสารลิกนินที่เปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

2. การศึกษาผลของการผสมสารละลายลิกนินในอาหารต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) โดยมี 5 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ชั่วโมง โดยใช้กุ้งขาวที่มีน้ำหนักประมาณ 12-15 กรัม เลี้ยงในน้ำความเค็ม 20 ppt ในตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร จำนวน 20 ตู้ ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว โดยให้อาหารปกติวันละ 2 ครั้ง ให้อากาศตลอดเวลา เมื่อครบ 7 วัน จึงเริ่มทำการทดลอง

2.2 การเตรียมอาหารทดลองและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 จะเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมลิกนินในอาหาร ดังนั้นจะใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในการผสมอาหาร ส่วนชุดการทดลองที่ 2-5 เป็นชุดทดลองที่ผสมลิกนินที่น้ำหนักเท่ากับ 1, 3, 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ โดยนำสารลิกนินในแต่ละชุดการทดลองมาละลายในกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อละลายเข้ากันดีแล้วจึงนำสารละลายลิกนินในแต่ละชุดการทดลองดังกล่าวไปใส่ในกระบอกฉีดเพื่อฉีดพ่นลงบนอาหาร 1 กิโลกรัม นำอาหารที่ได้ไปฟีดลมให้แห้ง หลังจากนั้นเคลือบอาหารทดลองทุกกลุ่มด้วยน้ำมันปลาหมึกแล้วนำไปฟีดลมให้แห้งอีกครั้งแล้วจึงนำไปให้สัตว์ทดลองได้ โดยในอาหารทดลองจะมีปริมาณของสารลิกนินในอาหารในแต่ละชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมสารลิกนิน (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ให้อาหารทดลองในแต่ละชุดเพื่อให้กุ้งได้รับประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัววันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าและตอนเย็นทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

2.3 การศึกษาผลของการเสริมลิกนินในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละซ้ำ ๆ ละ 1 ตัวในแต่ละชุดการทดลองมาเจาะเลือดบริเวณแอ่งเลือด Ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุสารสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10 เปอร์เซ็นต์ Sodium citrate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI) ในวันที่ 0, 3, 7 และ 14 วัน ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง แล้วนำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันตามวิธีของกิจการและคณะ (2543) ซึ่งประกอบด้วยปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocyte Count) และกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Phagocytic activity) ซึ่งได้แก่ Percent Phagocytosis และ Phagocytosis Index ตามวิธีของนนทวิทย์และคณะ (2547) ดังนี้

2.3.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocyte Count) ของกุ้งขาวใน แต่ละชุดการทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งขาวจากบริเวณแอ่งเลือด (Ventral sinus) มาผสมกับสาร
ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant; 10% Sodium citrate ละลายใน RPMI medium) ใน
อัตราส่วน 1 ต่อ 2 แล้วจึงมานับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด
(Hemocytometer) และนำมาคำนวณหาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด โดยคิดเป็นจำนวนเซลล์/
มิลลิลิตร

2.3.2 การศึกษาขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) ตามวิธี ดัดแปลงจากการศึกษาของนนทวิทย์ และคณะ (2547)

เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งขาวแต่ละตัวมาแยกเซลล์เม็ดเลือด โดยหมุนเหวี่ยงที่
ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสด้านบนโดย
ใช้ Automatic micropipette ค่อย ๆ ดูดออกอย่าให้ตะกอนของเม็ดเลือดฟุ้ง นำเม็ดเลือดส่วนที่
ตกตะกอนไปนับและปรับเซลล์เม็ดเลือดด้วย RPMI medium ให้ได้จำนวนเซลล์ 2×10^6 เซลล์ต่อ
มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดเม็ดเลือด 0.2 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบน Cover slip โดย Spread ให้ทั่วทั้งไว้ 30
นาที ล้างเม็ดเลือดส่วนที่ไม่เกาะ Cover slip ด้วย Shrimp saline หยดสารละลาย Heat-killed yeast ที่
มีจำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไปปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้ 2
ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย Shrimp saline จำนวน 5 ครั้ง เสร็จแล้วจึงย้อมสีด้วยชุดย้อมสี Wright and
Giemsa แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น และตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน เมื่อแห้งแล้วจึงนำมาทำเป็นสไลด์ถาวร
ด้วยน้ำยา Permount

นับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งประมาณ 200 เซลล์ต่อตัวอย่างกุ้ง 1 ตัว โดยแยกเป็น
จำนวนเม็ดเลือดกุ้งที่จับกินยีสต์และจำนวนยีสต์ที่ถูกจับกินในเซลล์เม็ดเลือดแต่ละเซลล์ จากนั้นจึง
นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า Percent phagocytosis และ Phagocytic index ตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Percent phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์} \times 100}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

$$\text{Phagocytic index} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์} \times \text{จำนวนยีสต์ที่ถูกจับกินทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด} \quad \text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

3. การศึกษาผลของการผสมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus : YHV)

3.1 การหาระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ที่ใช้ในการฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งเพื่อทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลาที่เหมาะสม

3.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวที่มีน้ำหนักประมาณ 12-15 กรัม เลี้ยงในน้ำความเค็ม 20 ppt ในตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร จำนวน 10 ตู้ ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว โดยให้อาหารปกติวันละ 2 ครั้ง ให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อครบ 7 วัน จึงเริ่มทำการทดลอง

3.1.2 การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ทำการเจือจางเชื้อไวรัสหัวเหลืองจาก Stock solution ที่ได้มาจากหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่ากับ 10^{-1} ถึง 10^{-9} ของ Viral stock solution

3.1.3 การหาระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลือง

นำเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ทำการเจือจางแล้วไปฉีดให้กุ้งขาวที่มีน้ำหนักประมาณ 10-12 กรัม โดยทำการฉีดเข้าที่ตัวกุ้งบริเวณกล้ามเนื้อในปล้องที่ 3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/ตัว แล้วสังเกตอาการและบันทึกการตายสะสมของกุ้งขาวในระยะเวลา 144 ชั่วโมง ผลของระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมง จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อไป

3.2 การศึกษาผลของการเสริมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานเชื้อไวรัสหั่วเหลือง

ภายหลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารที่ผสมลิกนินในการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 14 วัน แล้ว จึงนำกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมาฉีดเชื้อไวรัสหั่วเหลือง ที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขาวขนาด 12-15 กรัมต่าย 100 เปอร์เซนต์ ในระยะเวลาที่เหมาะสม โดยทำการฉีด เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อในปล้องที่ 3 ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 การทดลองดังนี้ คือ

ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมสารลิกนิน (ชุดควบคุม) ฉีดเชื้อไวรัสหั่วเหลืองบริเวณกล้ามเนื้อตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ฉีดเชื้อไวรัสหั่วเหลืองบริเวณกล้ามเนื้อตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

ชุดการทดลองที่ 3 กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ฉีดเชื้อไวรัสหั่วเหลืองบริเวณกล้ามเนื้อตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

ชุดการทดลองที่ 4 กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ฉีดเชื้อไวรัสหั่วเหลือง บริเวณกล้ามเนื้อตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

ชุดการทดลองที่ 5 กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารลิกนิน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ฉีดเชื้อไวรัสหั่วเหลือง บริเวณกล้ามเนื้อตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว

จากนั้นจึงเลี้ยงกุ้งทดลองต่อไปโดยให้อาหารทดลองในแต่ละกลุ่ม ระหว่างนี้ทำการสังเกตความผิดปกติและบันทึกอัตราการตายสะสมทุกวัน จนกว่าจะสิ้นสุดการทดลอง กล่าวคือ ภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสหั่วเหลืองเป็นเวลา 7 วัน

3.3 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองในกุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม โดยเทคนิค RT-PCR

3.3.1 การเก็บตัวอย่างและการสกัด Total RNA

ทำการเก็บตัวอย่างเหงือกของกุ่มขาวที่แสดงอาการของโรคหรือใกล้ตายรวมทั้งกุ่มที่รอดตายภายหลังสิ้นสุดการทดลองในทุก ๆ กลุ่ม ประมาณ 0.1 กรัมในทุกชุดการทดลอง ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลาย Trizol reagent ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบดเหงือกของแต่ละตัวอย่างโดยใช้ที่บดเนื้อเพื่อให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกันกับ Trizol reagent ทั้งนี้ในการบดนั้นให้ทำการบดในถังบรรจุน้ำแข็ง จากนั้นจึงเติม Trizol reagent อีก 0.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตรดูดสารละลายดังกล่าวขึ้นลงแรง ๆ เพื่อเป็นการทำลาย Genomic DNA และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงพลิกหลอดไปมาเบา ๆ 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งนาน 3 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วจึงดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ให้ได้มากที่สุด เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นจึงดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เหลือไว้เฉพาะตะกอนของ Total RNA ที่บริเวณด้านล่างของหลอด เก็บตะกอนไว้ใน 75 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

วัดความเข้มข้นของ Total RNA ที่ได้โดยใช้สารละลาย Total RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมกับ DEPC water ปริมาตร 68 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโน-เมตร (A_{260}) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ Total RNA และตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA โดยการหาอัตราส่วนของ $A_{260}:A_{280}$ ถ้าค่าที่วัดได้มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่ามี DNA ปนอยู่ แต่ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าได้ RNA บริสุทธิ์และถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือสาร Phenol ปนอยู่ในตัวอย่างของ Total RNA ที่สกัดได้

ในการหาความเข้มข้นของ Total RNA ที่สกัดได้นั้น คำนวณได้ตามวิธีการของ Sambrook *et. al.* (1989) ดังนี้

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40^*$$

หมายเหตุ * = 1 หน่วยของ OD ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จะมีปริมาณของ RNA เท่ากับ 40 $\mu\text{g/ml}$

3.3.2 การสังเคราะห์ First strand cDNA ของตัวอย่างเหงือกกุ้งขาว

เมื่อทำการสกัด Total RNA ในเหงือกกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง จึงนำมาสังเคราะห์ First strand cDNA synthesis โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase Kit ทำตามวิธีการของชุดสำเร็จรูปของบริษัท (Fermentas, USA) โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการทำดังนี้

เติม Oligo (dT)₂₀ primer ลงในหลอด PCR หลังจากนั้นจึงเติมตัวอย่าง Total RNA และ Nuclease-free water ที่แปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของ RNA ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง Spectrophotometer โดยความเข้มข้น Total RNA ที่ใช้กำหนดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 μg (1,000 ng) ตามรายละเอียดดังนี้

Oligo (dT) ₁₈ primer	1.0	ไมโครลิตร
Total RNA (ความเข้มข้น 1 μg)	X	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	11-X	ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน โดยใช้ Vortex และทำการปั่นอย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่อง Centrifuge แล้วจึงนำไปป้อนในเครื่อง Thermal cycler machine ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แล้วจึงเติม 5X Reaction buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT], RiboLock™ RNase Inhibitor และ 10 mM dNTP Mix ตามรายละเอียดดังนี้

5X Reaction buffer	4.0	ไมโครลิตร
RiboLock™ RNase Inhibitor	1.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTP Mix	2.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากันโดยใช้ Vortex และ Centrifuge ตามลำดับอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำไปป้อนด้วยเครื่อง Thermal cycler machine ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจึงเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากันโดยใช้ Vortex และ Centrifuge ตามลำดับอย่างรวดเร็วอีกครั้ง แล้วจึงนำไปป้อนด้วยเครื่อง Thermal cycler machine ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นจึงเก็บ First strand cDNA Product ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.3.3 การทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ในการศึกษา RT-PCR นั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสหัดเหลือง โดยการใช้ไพรเมอร์ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสหัดเหลือง (Tang and Lightner, 1999) และยีน Beta-actin (β -actin) ของกิ้งขานำมาใช้เป็น Internal control (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Primer name	Nucleotide sequence 5'-----> 3'	Amplicon size (bp)	Reference and Accession number
YHV-F	CGTATTGCATCGAACGTCACCTG	964	AF148846
YHV-R	CAAGATCACTAATAACGCCTGATGC		(Tang and Lightner, 1999)
β -actin-F	GAGAAGATCTGGCATCACAC	836	AF300705
β -actin-R	TGATCCACATCTGCTGGAAG		

โดยสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย First stand cDNA, 10X *Taq* Buffer, 10 μ M Forward Primer, 10 μ M Reverse Primer, 2.5 mM dNTP, *Taq* DNA Polymerase, $MgCl_2$ และ Distilled water โดยมีรายละเอียดดังนี้

First stand cDNA	1.00	ไมโครลิตร
10X <i>Taq</i> Buffer	1.50	ไมโครลิตร
5 μ M Forward Primer	1.00	ไมโครลิตร
5 μ M Reverse Primer	1.00	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	1.25	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.10	ไมโครลิตร
$MgCl_2$	2.00	ไมโครลิตร
Distilled water	2.15	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10.00	ไมโครลิตร

ใส่ส่วนผสมของสารทั้งหมดในหลอด PCR จากนั้นจึงนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler machine เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายโดยกำหนดให้สถานะในการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้คือ

ช่วงแรก	อุณหภูมิ 94.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
ช่วงที่สอง (จำนวน 30 รอบ)	อุณหภูมิ 94.0 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
	อุณหภูมิ 56.3 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
	อุณหภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
และช่วงที่สาม	อุณหภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจสอบผลการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสหัดเหลืองและการแสดงออกของยีน Beta-actin ของกุ้งขาวด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นจึงตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตรวจสอบแถบ DNA และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยถ้าตัวอย่างใดมีแถบ DNA เกิดขึ้น แสดงว่าที่ตัวอย่างดังกล่าวมีการติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง ส่วนปริมาณการปนเปื้อนจะสังเกตได้จากระดับความหนาของแถบ DNA ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ ถ้ามีความหนาของแถบ DNA มาก ก็แสดงว่ามีการติดเชื้อ

ไวรัสหัวเหลืองมากด้วย ในทางกลับกันถ้ามีความหนาของแถบ DNA น้อย ก็แสดงว่าที่ตัวอย่างกึ่งดังกล่าวมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองน้อยตามไปด้วย ถ้าตัวอย่างไม่มีแถบ DNA เกิดขึ้นแสดงว่ากึ่งไม่มีการติดเชื้อไวรัสหรือถ้ามีการติดเชื้อก็เป็นการติดเชื้อที่น้อยมาก

3.4 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกึ่งขาวที่เป็นโรคหัวเหลือง

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งทำตามวิธีการของ Lightner (1996) โดยนำตัวอย่างกึ่งขาวในทุกชุดการทดลอง มาเก็บตอม่น้ำเหลืองและเหงือก ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยน้ำยา Davidson's fixative ประมาณ 12-24 ชั่วโมง โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ เมื่อครบกำหนดย้ายตัวอย่างไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตอม่น้ำเหลืองและเหงือกบรรจุใน Embedding cassette แล้วนำไปผ่าน ขั้นตอนการดึงน้ำออก (Dehydration) และ Infiltration ด้วยเครื่อง Automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) (ภาคผนวก) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (Embedding) ตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำไปย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (ภาคผนวก) จากนั้นทำเป็นสไลด์ถาวร แล้วนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

4. การศึกษาผลของสารลิกนินในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus: YHV) ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

4.1 การเตรียมสัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) โดยมี 6 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ โดยใช้กึ่งขาวที่มีน้ำหนักประมาณ 12-15 กรัม เลี้ยงในน้ำความเค็ม 20 ppt ในตู้ทดลองขนาด 80 ลิตร จำนวน 18 ตู้ ใส่กึ่งตู้ละ 10 ตัว โดยให้อาหารปกติวันละ 2 ครั้ง ให้อากาศอย่างเพียงพอ ทำการเลี้ยงปรับสภาพก่อนการทดลองเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มทำการทดลอง

4.2 การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ทำการเจือจางเชื้อไวรัสหัวเหลืองจาก Stock solution ที่ได้มาจากหน่วยวิจัยเพื่อความ เป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Shrimp Centex) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 2 เท่าที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่เหมาะสม

4.3 การเตรียมสารละลายลิกัน

นำสารลิกันมาละลายในเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 2, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4.4 การทดลองผลของสารลิกันในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองในหลอดทดลอง (*in vitro*)

นำสารลิกันที่ละลายกับน้ำเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.3 มา ผสมกับเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีระดับความเข้มข้น 2 เท่าของเชื้อที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่เหมาะสม ในปริมาณที่เท่ากัน (อัตราส่วน 1:1) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้สารลิกันออกฤทธิ์ หลังจากนั้นนำมาฉีดกุ้งขาวขนาด 12-15 กรัม โดยทำ การแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 กลุ่มการทดลองดังต่อไปนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อ ปริมาตร ตัวละ 0.1 มิลลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว (กลุ่มควบคุมผลลบ)

ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง บริเวณกล้ามเนื้อ ปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว (กลุ่มควบคุมผลบวก)

ชุดการทดลองที่ 3 ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองระดับความเข้มข้น 2 เท่าที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ผสมกับสารละลายลิกันความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว จะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ลิกนินเป็น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองระดับความเข้มข้น 2 เท่าที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ผสมกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว จะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ลิกนินเป็น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองระดับความเข้มข้น 2 เท่าที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ผสมกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว จะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ลิกนินเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 6 ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองระดับความเข้มข้น 2 เท่าที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ผสมกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว จะทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ลิกนินเป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

หลังจากนั้นทำการเลี้ยงกุ้งต่อไปเป็นเวลา 20 วัน โดยระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการ ของกุ้ง และจดบันทึกอัตราการตายสะสมจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

4.5 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยเทคนิค RT-PCR

โดยการเก็บเหงือกของกุ้งที่แสดงอาการไถ่ตายหรือฟุ้งตายมาสกัด Total RNA, ทำ การสังเคราะห์ First stand cDNA และทำการศึกษการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค RT-PCR ตามวิธีการในข้อ 3.3

4.6 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่เป็นโรคหัวเหลือง

โดยการเก็บต่อม Lymphoid (Oka's) organ และเหงือกของกุ้งที่แสดงอาการใกล้ตาย หรือเพิ่งตายด้วยน้ำยา Davison's fixative จากนั้นทำเป็นสไลด์ถาวรและอ่านผลตามวิธีการใน ข้อ 3.4

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocyte Count), กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Phagocytic activity) ในข้อ 2.3 อัตราการตายสะสมของกุ้งทดลองภายหลังที่ได้รับเชื้อไวรัสของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองในแต่ละวันในข้อ 3.2 และอัตราการตายสะสมของกุ้งทดลองภายหลังที่ได้รับสารลิกนินผสมกับเชื้อไวรัสในหลอดทดลองของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองในแต่ละวันในข้อ 4.4 โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตดังกล่าว โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (บุญอ้อม, 2550)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

1. การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารลิกนินที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 96 ชั่วโมง (Medial lethal dosage at 96 hours; 96-hours LD₅₀)

1.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารลิกนินที่ไม่ทำให้กุ้งขาวตาย และความเข้มข้นของสารลิกนินที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ภายหลังจากการฉีดสายละลายลิกนินในรูป Lignosulphonate ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เข้าสู่ตัวกุ้งขาวที่บริเวณกล้ามเนื้อลำตัว ปล้องที่ 3 พบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายลิกนินที่ไม่ทำให้กุ้งขาวตายเลยที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายลิกนินที่ทำให้กุ้งขาวตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางผนวกที่ 1)

1.2 การทดลองเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารลิกนินที่ทำให้กุ้งขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง

จากผลการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของสารลิกนินที่ไม่ทำให้กุ้งขาวตายเลย และความเข้มข้นของสารลิกนินที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง ในข้อ 1.1 ได้ถูกนำมาใช้เพื่อทำการทดลองขั้นละเอียด เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารลิกนินที่ทำให้กุ้งขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง โดยนำค่าระดับความเข้มข้นของสารลิกนินต่ำสุดที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของสารลิกนินสูงสุดที่ไม่ทำให้กุ้งขาวตายเลย ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 300 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ มาแบ่งสัดส่วน Logarithm ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) ออกเป็น 5 ระดับ ทำให้ได้ระดับความเข้มข้นของสารละลายลิกนินที่ใช้ทำการทดลองส่วนนี้มีค่าเท่ากับ 100, 130, 175, 230 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อนำค่าระดับความเข้มข้นของสารละลายลิกนินที่คำนวณได้ไปฉีดในตัวกุ้งขาวบริเวณกล้ามเนื้อลำตัวปล้องที่ 3 เพื่อศึกษาอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ระยะเวลา 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง (ตารางผนวกที่ 2)

โดยลักษณะของกุ้งขาวภายหลังการฉีดลิกนินและน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากุ้งที่ฉีดน้ำเกลือจะพบลักษณะกล้ามเนื้อขาวขุ่นบริเวณที่ฉีดและกลับมาเป็นปกติภายใน 12 ชั่วโมง ส่วนกุ้งที่ฉีดลิกนินที่ความเข้มข้น 175, 230 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับสารลิกนินโดยการฉีดทุกกลุ่มจะแสดงการตายให้เห็นภายใน 12 ชั่วโมงแรกของการทดลองเท่านั้น และจากการสังเกตกุ้งที่แสดงการตายจะพบว่าบริเวณเหงือก หัวใจและบริเวณกล้ามเนื้อในตำแหน่งที่ฉีดจะมีลักษณะขุ่นเป็นสีน้ำตาลอ่อนในบริเวณดังกล่าวอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 8)

หลังจากครบ 96 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed and Muench (1938) พบว่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารลิกนินที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายใน 96 ชั่วโมง (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางผนวกที่ 3)



ภาพที่ 8 ลักษณะกุ้งขาวที่ตายหลังการฉีดลิกนิน

2. ผลของการผสมสารละลายลิซีนในอาหารต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

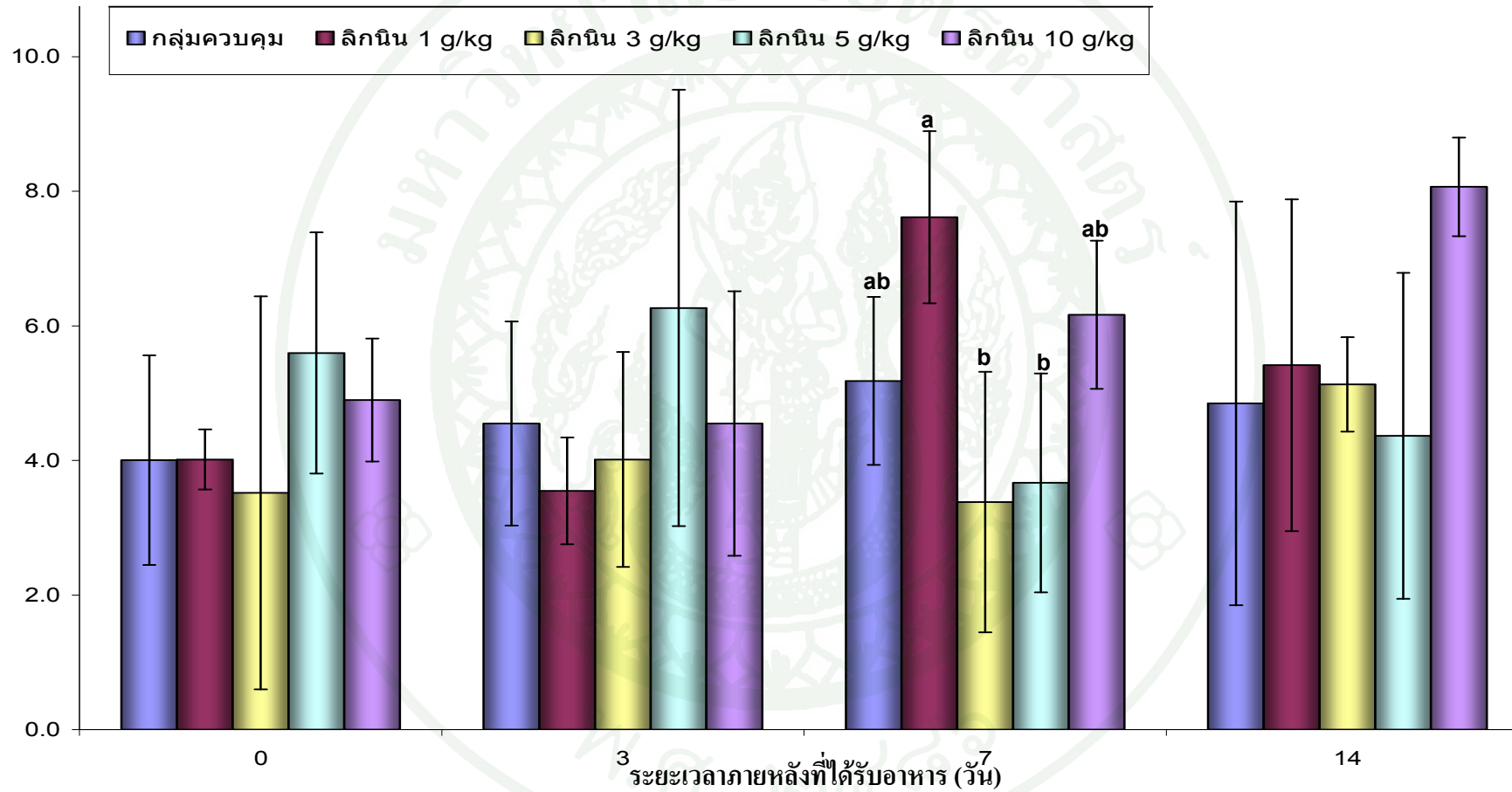
ภายหลังจากที่กุ้งทดลองได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมสารลิซีนในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 1, 3, 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมแล้ว จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งขาวของแต่ละชุดการทดลองที่ 0, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ เพื่อนำมาวิเคราะห์การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งพบว่าผลการทดลองที่ได้เป็นดังนี้

2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total haemocyte count) ของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

ภายหลังจากการให้อาหารที่ผสมสารลิซีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันให้กับกุ้งทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้อาหารที่ไม่ได้ผสมสารลิซีน พบว่าในวันที่ 7 ของการทดลอง ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งขาวในชุดการทดลองที่ให้อาหารลิซีนผสมในอาหารความเข้มข้น 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าน้อยกว่าและแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้อาหารลิซีนผสมในอาหารความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีค่าเท่ากับ 6.28 ± 5.99 , 4.91 ± 2.82 และ 7.21 ± 1.32 ตามลำดับแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ให้อาหารลิซีนผสมในอาหารความเข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.34 ± 2.52 และ 7.61 ± 3.03 ตามลำดับ (ภาพที่ 9 และ ตารางผนวกที่ 4)

ส่วนผลการทดลองในวันที่ 0, 3 และ 14 พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งในแต่ละชุดทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยอยู่ระหว่าง $2.83 \pm 2.76 \times 10^6$ ถึง $7.75 \pm 3.97 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในวันที่ 14 ของการทดลองกุ้งที่ได้รับสารลิซีนในอาหารในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดเป็น 8.07 ± 0.73 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ก็ไม่พบว่ามีแตกต่างกับชุดทดลองอื่นแต่อย่างใด ($P > 0.05$) (ภาพที่ 9 และ ตารางผนวกที่ 4)

ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ cells/ml)



ภาพที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกิ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน
 พญูชนะภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการทดลองแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

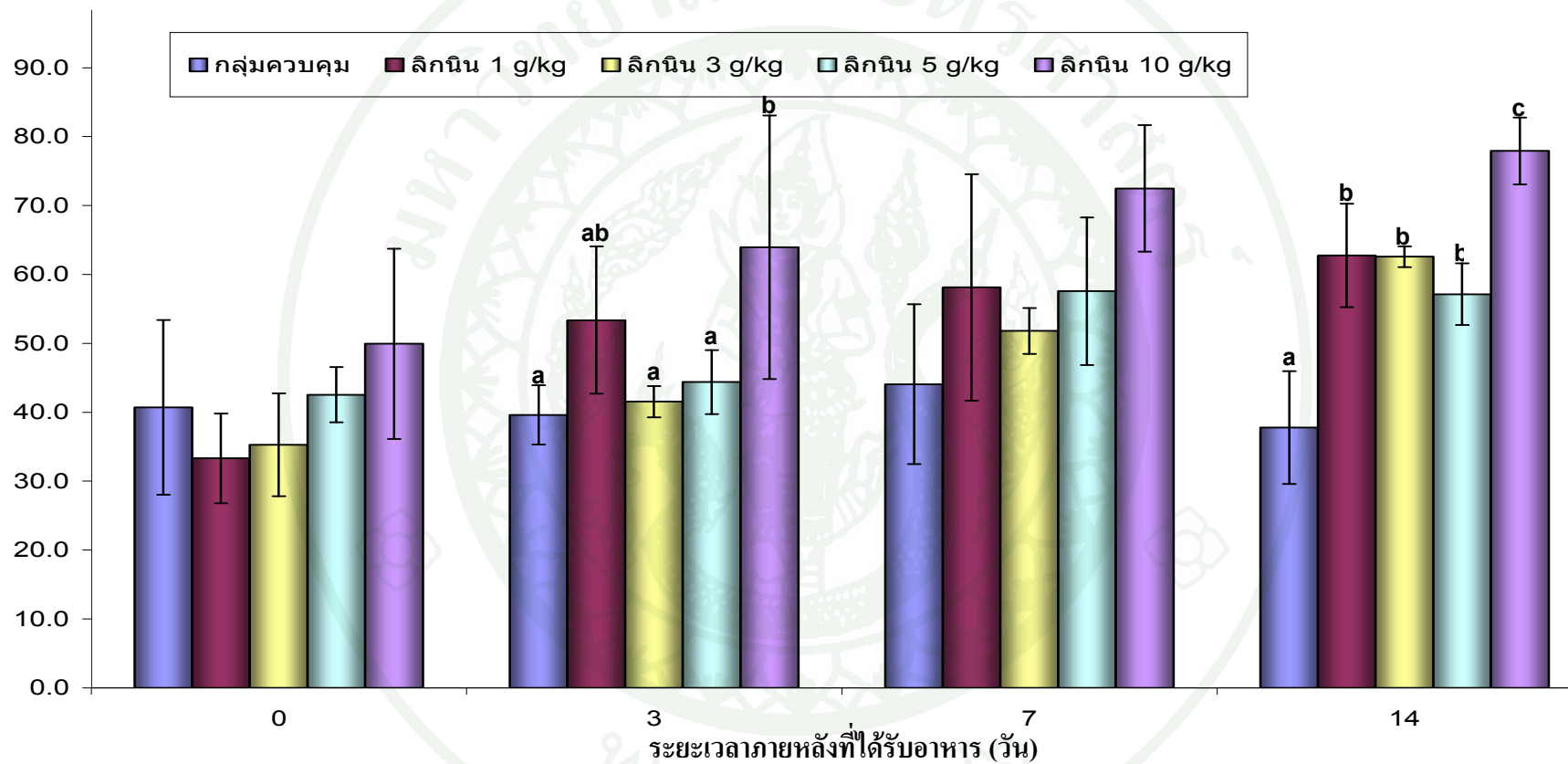
2.2 กระบวนการกลืนกลืนสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) ของเซลล์เม็ดเลือดของ กุ้งขาว

ผลการศึกษากระบวนการกลืนกลืนสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวในการทดลองส่วนนี้ พบว่ากิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวในการจับกินเซลล์ยีสต์ในกระบวนการ Phagocytosis ในวันเริ่มต้นการทดลองของทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ Phagocytosis อยู่ระหว่าง 33.33 ± 6.51 ถึง 49.93 ± 13.79 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10)

สำหรับในวันที่ 3 ของการทดลอง พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารลิกนินระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเปอร์เซ็นต์ Phagocytosis สูงกว่ากุ้งขาวในกลุ่มควบคุมและกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้น 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเป็น 63.95 ± 19.15 , 39.62 ± 4.29 , 41.53 ± 2.25 และ 44.37 ± 4.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งกลุ่มที่ได้รับลิกนินในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีค่าเป็น 53.37 ± 10.67 เปอร์เซ็นต์

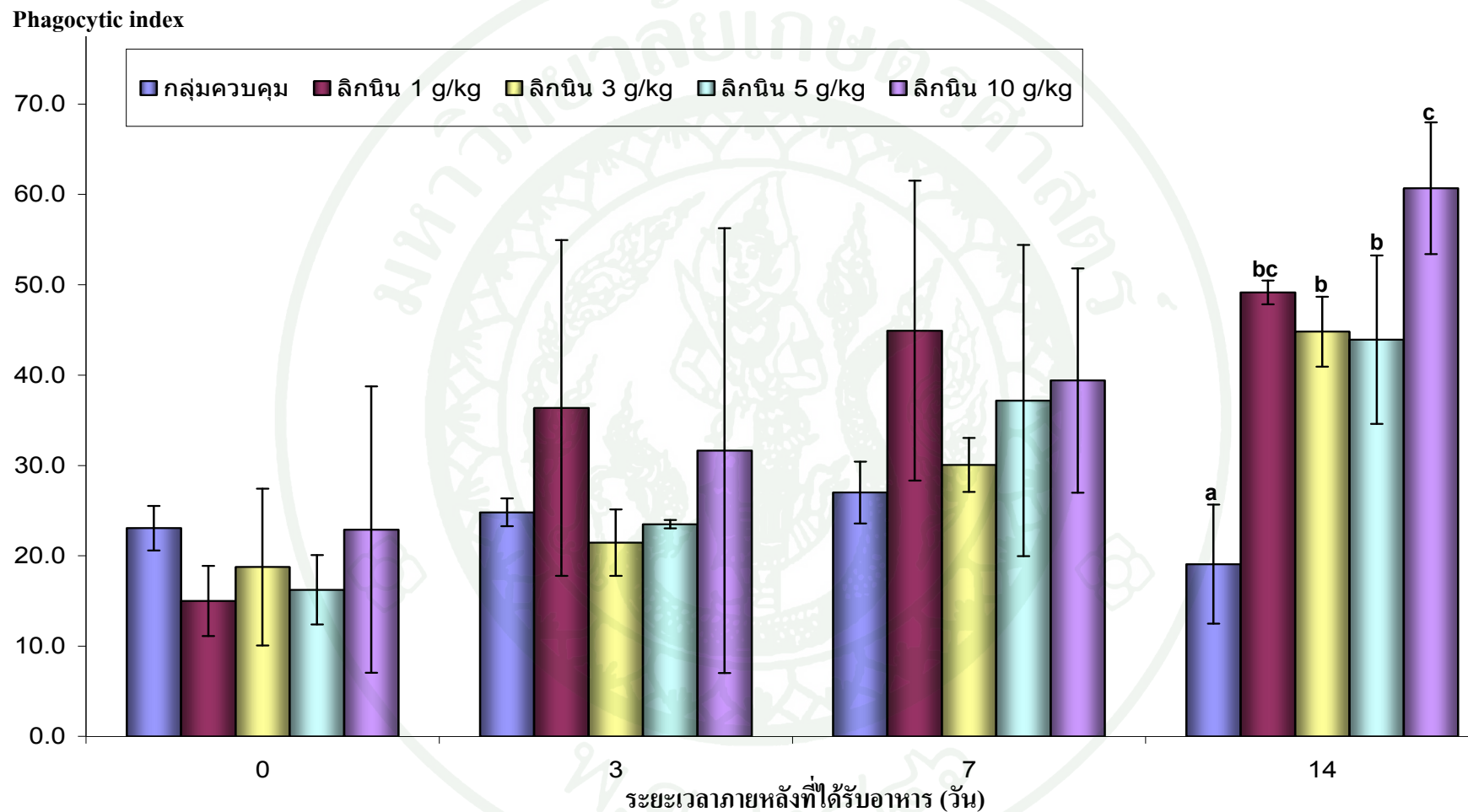
นอกจากนี้ในวันที่ 14 ของการทดลอง ยังพบว่ากุ้งทุกกลุ่มที่ได้รับสารลิกนินในอาหาร มีค่า เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม ($P<0.05$) โดยเฉพาะกุ้งกลุ่มที่ได้รับสารลิกนินในอาหาร 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis สูงกว่ากุ้งกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเท่ากับ 77.91 ± 4.87 ขณะที่ กุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารลิกนินในอาหารในอัตรา 1, 3, และ 5 มีค่า เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis เป็น 37.78 ± 8.18 , 62.74 ± 7.50 , 62.58 ± 1.51 และ 57.13 ± 4.49 ตามลำดับ (ภาพที่ 10 และ ตารางผนวกที่ 5)

Phagocytosis (%)



ภาพที่ 10 อัตราการเกิด Phagocytosis ในเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งขาวภายหลังจากการได้รับอาหารผสมสารลิคินินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน พญชนะภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการทดลองแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงค่า Phagocytic Index ซึ่งเป็นดัชนีที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเซลล์ที่เกิดกระบวนการ Phagocytosis ในการจับกินยีสต์ พบว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และภายหลังได้รับอาหารทดลองแล้วในวันที่ 3 และ 7 ของการทดลองกึ่งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารในระดับต่าง ๆ และกลุ่มควบคุมจะมีค่า Phagocytic Index ไม่แตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามในวันที่ 14 ภายหลังจากการได้รับอาหารทดลอง เป็นที่น่าสนใจว่า กึ่งในกลุ่มที่ได้รับสารลิกนินในอาหารในอัตรา 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความสามารถในการจับและนำเอาเซลล์ของยีสต์เข้าไปในเซลล์เม็ดเลือดสูงที่สุด คือ 60.67 ± 7.29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับกึ่งกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่กึ่งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารอัตรา 1, 3, และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า Phagocytosis Index ไม่แตกต่างกันแต่จะแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีค่าเป็น 49.15 ± 1.33 , 44.81 ± 3.87 , 43.92 ± 9.33 และ 19.06 ± 6.59 ตามลำดับ (ภาพที่ 11 และ ตารางผนวกที่ 6)



ภาพที่ 11 Phagocytic Index ของเม็ดเลือดของกึ่งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน
 พญัญชนะภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการทดลองแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

3. ผลของการผสมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus: YHV)

3.1 การหาระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งแล้วทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์

ผลของการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจาก Stock solution ที่เจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่ากับ 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} และ 10^{-10} แล้วนำไปฉีดกุ้งขาว และทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวในแต่ละระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0, 24, 48, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง เพื่อนำไปหาค่าระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8} เป็นระดับความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) ขณะที่ความเข้มข้นของไวรัสตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-6} จะทำให้กุ้งทดลองตายอย่างรวดเร็วในเวลา 48 ชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้น 10^{-10} นั้นต้องใช้เวลาราว 144 ชั่วโมง จึงจะทำให้กุ้งทดลองตายหมด ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าความเข้มข้นของไวรัสที่ 10^{-8} เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการฉีดกุ้งเพื่อทดสอบการเกิดโรคเนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวนี้จะไม่ทำให้กุ้งทดลองตายเร็วหรือช้าจนเกินไป

ตารางที่ 2 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} และ 10^{-10} ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้น ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาว (%)						
	เริ่มต้น การทดลอง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง	144 ชั่วโมง
10^{-2}	0	50	100	100	100	100	100
10^{-4}	0	0	100	100	100	100	100
10^{-6}	0	0	100	100	100	100	100
10^{-8}	0	0	0	100	100	100	100
10^{-10}	0	0	0	20	20	50	100

3.2 ผลของการเสริมสารลิกนินในอาหารต่อการต้านทานเชื้อไวรัสหัดเหลืองในกิ้งขาว

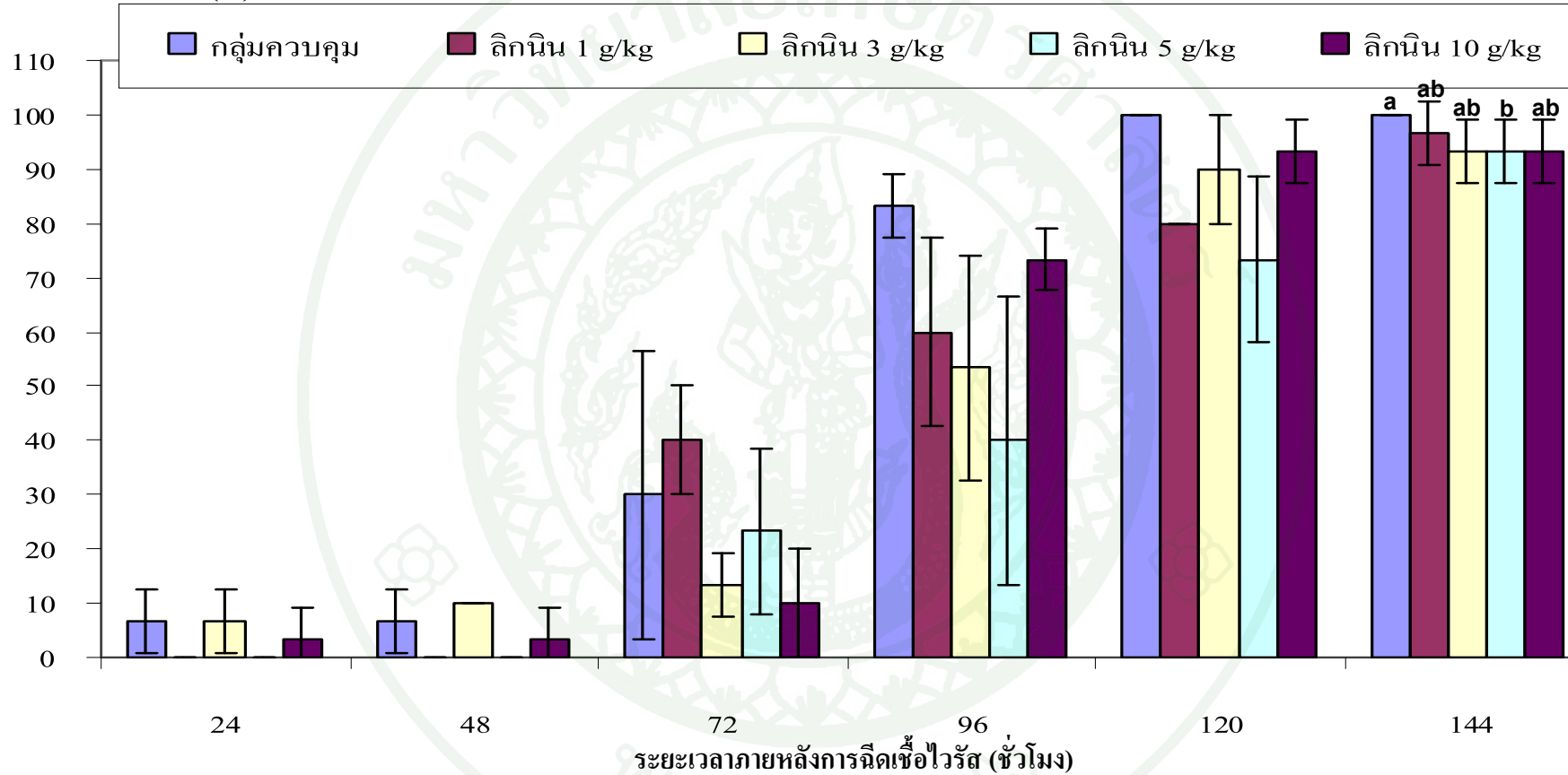
3.2.1 การศึกษาอัตราการตายสะสมของกิ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

ภายหลังจากการเลี้ยงกิ้งขาวด้วยอาหารที่ผสมสารลิกนินในการทดลองในข้อ 2 เป็นเวลา 14 วัน จึงนำกิ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบความสามารถในการต้านทานไวรัสหัดเหลือง โดยการฉีดเชื้อไวรัสหัดเหลืองที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8} เท่า ตามผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 พบว่ากิ้งขาวในทุกชุดการทดลองมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากการได้รับเชื้อไวรัสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทั้งนี้พบว่ากิ้งขาวในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารลิกนินในอัตรา 3 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากิ้งขาวในชุดการทดลองอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 12 และตารางภาคผนวกที่ 7)

เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองกิ้งขาวทุกกลุ่มจะมีอัตราการตายสะสมสูงสุดมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกกลุ่มโดยมีอัตราการตายสะสมทั้งกลุ่มควบคุมและกิ้งขาวที่ได้รับสารลิกนินในอาหารตั้งแต่ 1, 3, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็น 100 ± 0.00 , 96.67 ± 5.77 , 93.33 ± 5.77 , 93.33 ± 5.77 และ 93.33 ± 5.77 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (ภาพที่ 12 และตารางภาคผนวกที่ 7)

เมื่อพิจารณาอัตราการของกิ้งระหว่างการศึกษาพบว่าในช่วงเวลาที่ 120 ของการทดลองเท่านั้น ที่กิ้งในกลุ่มที่ได้รับลิกนินในอาหารอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากิ้งขาวในทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 144 ชั่วโมง กับพบว่าอัตราการตายของกิ้งขาวในแต่ละกลุ่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกันและไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติแต่อย่างใด (ภาพที่ 12 และตารางภาคผนวกที่ 7)

อัตราการตายสะสม (%)

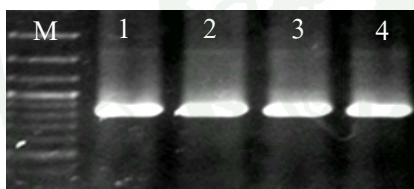


ภาพที่ 12 อัตราการตายสะสมของกึ่งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองภายหลังได้รับอาหารผสมลิคินินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน
 พญญชนะภาษาอังกฤษที่กำกับบนแท่งกราฟที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการทดลองแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

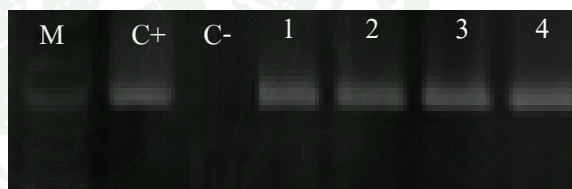
3.2.2 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองในกึ่งขาทดลองโดยใช้เทคนิค

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การทดลองในส่วนนี้เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันว่ากึ่งขาทดลองที่แสดงอาการของโรคมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสหัดเหลืองที่ฉีดเข้าตัวกึ่ง จากการสุ่มกึ่งที่แสดงอาการของโรคหัดเหลืองมาทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโดยใช้ส่วนของหางกึ่งขาที่ได้รับการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองโดยใช้เทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin ซึ่งจัดเป็น House keeping gene ชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นยีนเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนอื่น ๆ (Internal control) เพื่อยืนยันว่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อของกึ่งขาระหว่างทำการศึกษายังมีชีวิตและยังมีกิจกรรมของเซลล์อยู่ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าในทุกตัวอย่างที่สุ่มมาตรวจสอบมีการแสดงออกของยีน β -actin ที่ใกล้เคียงกันมาก โดยมีขนาดแถบ DNA ของ PCR products เท่ากับ 836 bp แสดงว่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อของกึ่งขาที่ทำการสุ่มมายังมีชีวิตและยังมีกิจกรรมของเซลล์อยู่ และมีการแสดงการปนเปื้อนเชื้อไวรัสหัดเหลืองที่ใกล้เคียงกันมากเช่นกัน โดยมีขนาดแถบ DNA ของ PCR products เท่ากับ 964 bp แสดงให้เห็นว่ากึ่งที่แสดงการตายหรือแสดงอาการของโรคมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสหัดเหลืองที่ได้ฉีดให้กับกึ่งจริง (ภาพที่ 13)



(a)



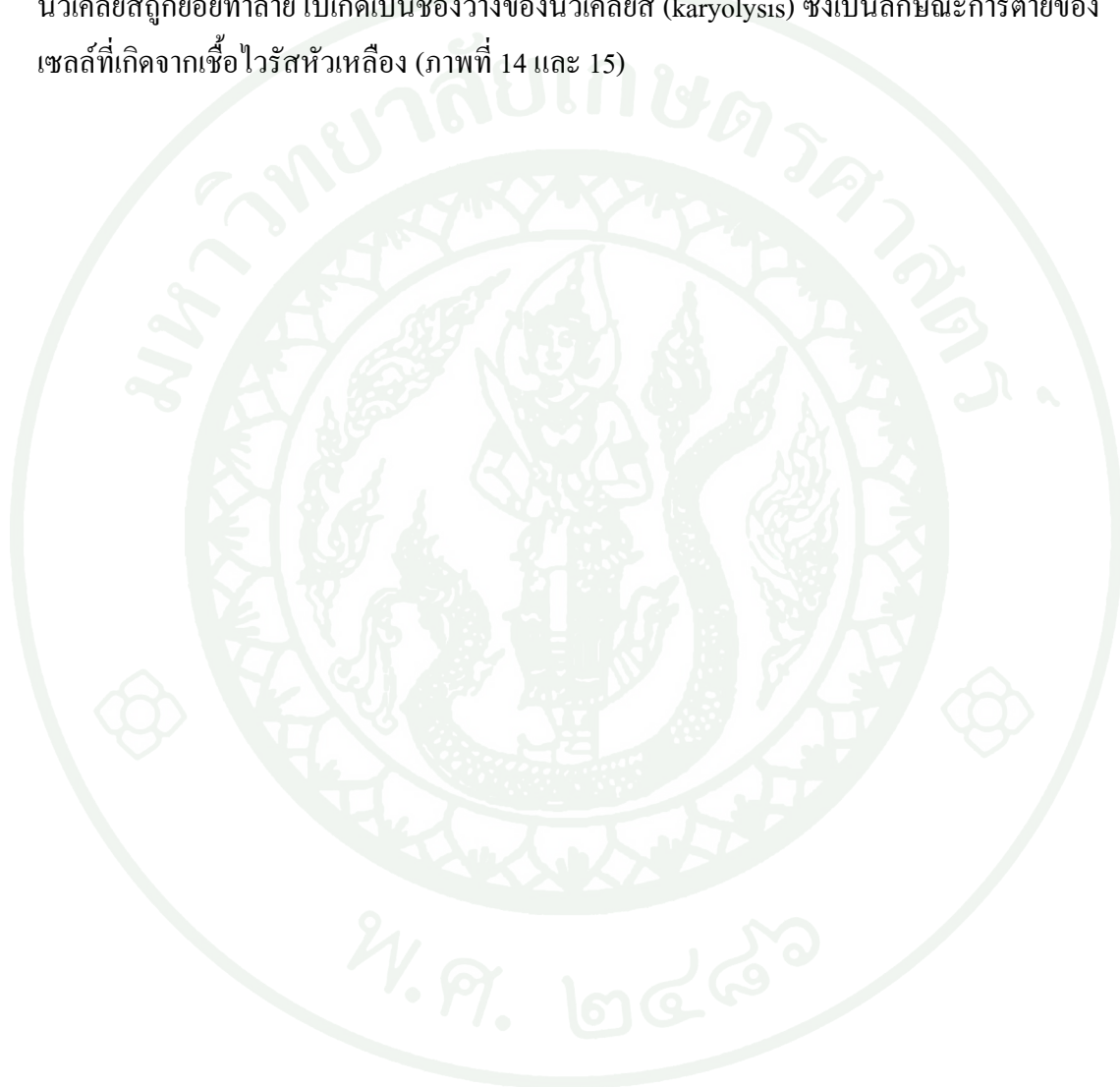
(b)

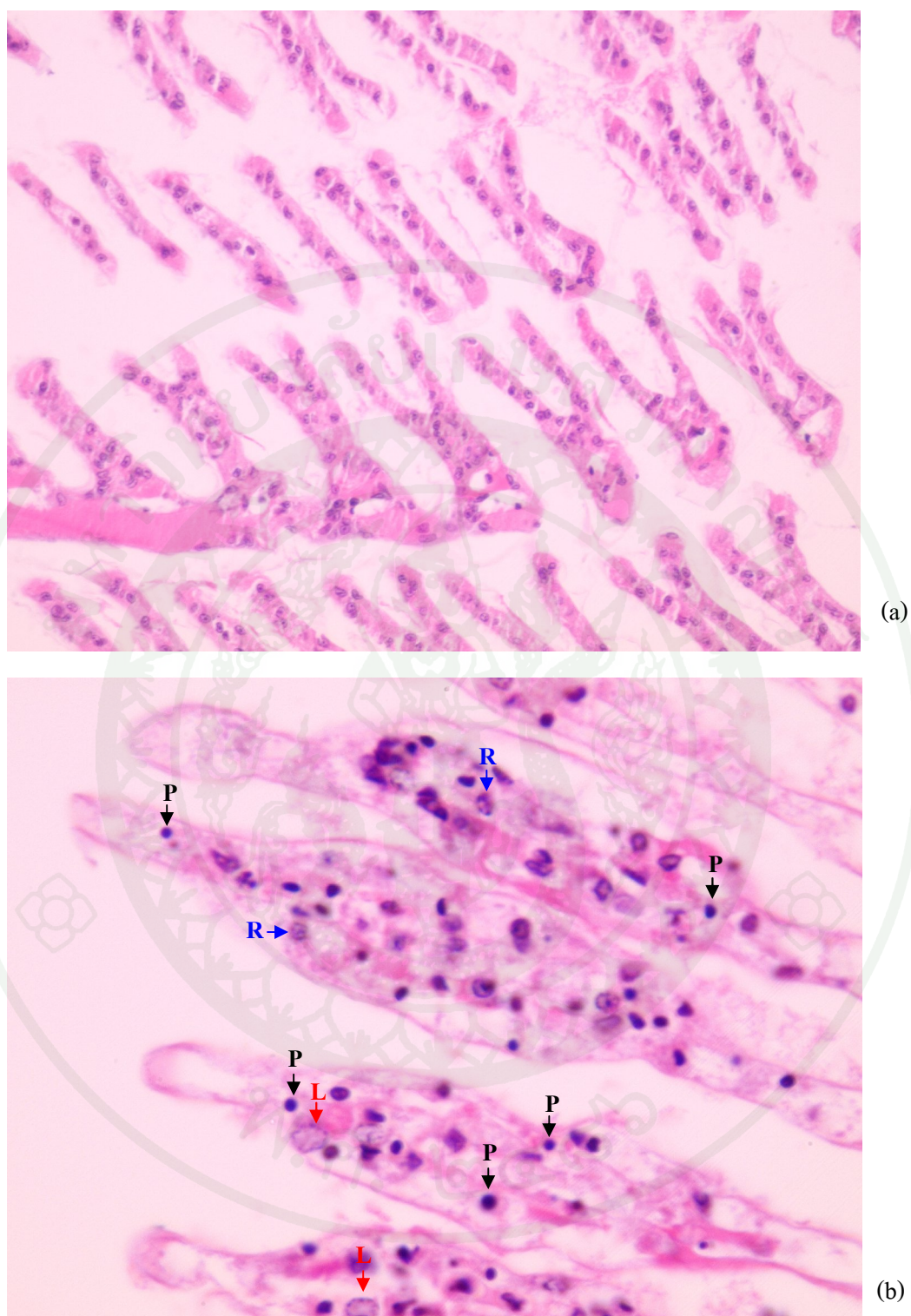
ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีน β -actin และการปนเปื้อนเชื้อไวรัสหัดเหลืองของหางกึ่งขา โดยที่ (a) คือ การแสดงออกของยีน β -actin (b) คือ การแสดงการปนเปื้อนไวรัสหัดเหลือง M คือ 100 bp Marker, C+ คือ ปฏิกริยาควบคุมผลบวก, C- คือ ปฏิกริยาควบคุมผลลบ, 1 ถึง 4 คือ กึ่งที่สุ่มตรวจ

3.2.3 การศึกษาจุลพยาธิของเนื้อเยื่อของกึ่งขา

การศึกษากุณพยาธิของเนื้อเยื่อของกึ่งขามีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันผลการติดเชื้อควบคู่กับการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองในกึ่งขาโดยใช้เทคนิค RT-PCR ว่ากึ่งที่แสดงอาการของโรคและใกล้เคียงมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสหัดเหลืองที่ฉีดเข้าตัวกึ่ง จากการทดสอบการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองระหว่างการทดลองโดยการเก็บตัวอย่างกึ่งทดลองที่แสดงอาการใกล้เคียง

ในการศึกษาผลของการเสริมสารลิกนินในอาหารต่อประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวพบว่าในเนื้อเยื่อ Lymphoid (Oka's) organ และเหงือก ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายของไวรัสที่ก่อโรคหัวเหลืองพบว่าการตายของเซลล์ (necrosis) กระจายอยู่ทั่วไป โดยสังเกตเห็นเซลล์นิวเคลียสหดตัวเล็กลงและ โครมาติครวมตัวเป็นก้อน (Pyknotic nuclei), เกิดการแยกออกเป็นชิ้น ๆ ของนิวเคลียสกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (karyorrhexis) และพบลักษณะที่โครมาตินในนิวเคลียสถูกย่อยทำลายไปเกิดเป็นช่องว่างของนิวเคลียส (karyolysis) ซึ่งเป็นลักษณะการตายของเซลล์ที่เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ภาพที่ 14 และ 15)

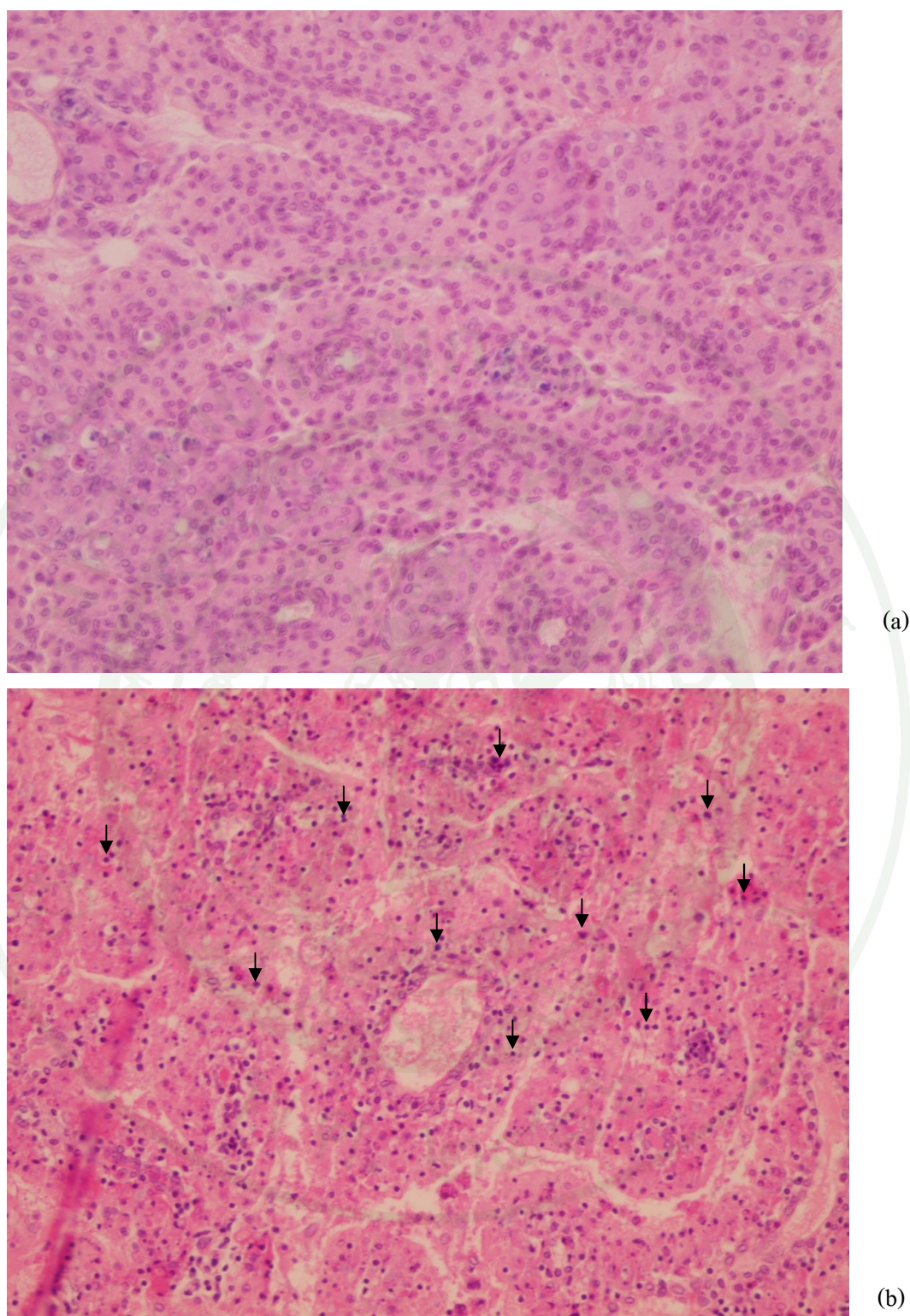




ภาพที่ 14 จุลพยาธิของเหงือกกุ้งขาว โดยที่

(a) คือ เหงือกกุ้งขาวปกติ

(b) คือ เหงือกกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่ง P, R และ L แสดงถึงลักษณะของการเกิด Pyknotic nuclei (Nuclear pyknosis), Karyorrhexis และ Karyolysis ตามลำดับ



ภาพที่ 15 จุลพยาธิของ Lymphoid organ ในกึ่งขาว โดยที่

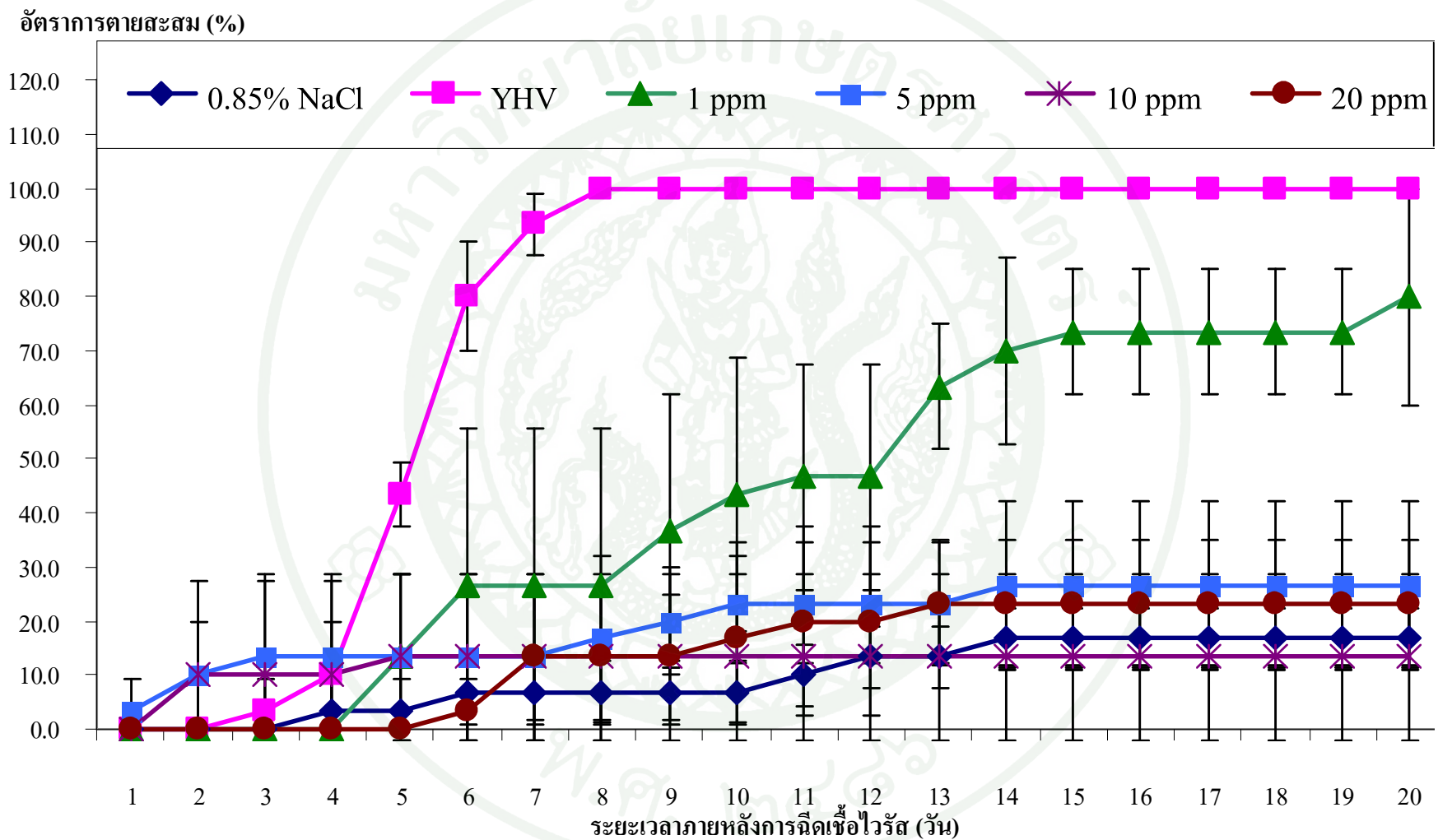
(a) คือ Lymphoid organ ของกึ่งขาวปกติ

(b) คือ Lymphoid organ ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง (ลูกศรชี้ แสดงถึงลักษณะของการเกิด Pyknotic nuclei)

4. ผลของสารลิกนินในการยับยั้งเชื้อไวรัสห้วเหลืองในหลอดทดลอง (*in vitro*)

4.1 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

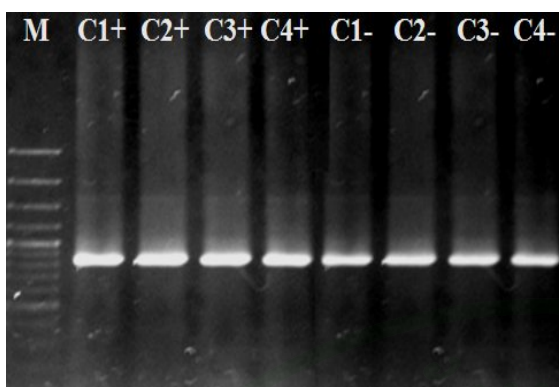
จากการทดลองพบว่าในวันที่ 1-4 ภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัส ไม่พบว่าอัตราการตายของกุ้งทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ขณะที่ในวันที่ 5-8 ภายหลังจากการฉีดพบว่าในชุดที่ฉีดเชื้อไวรัสที่เป็นกลุ่มควบคุมผลบวกจะมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จาก 43.3 ± 5.8 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 เป็น 100 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 8 ขณะที่กุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อผสมสารลิกนินในอัตรา 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการตายเป็น 26.7 ± 25.2 , 16.7 ± 15.3 , 13.3 ± 13.5 และ 13.3 ± 11.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมผลบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในช่วงวันที่ 13-19 ภายหลังจากการฉีด พบว่าชุดการทดลองที่ฉีดไวรัสผสมลิกนินในอัตรา 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการตายที่ค่อนข้างคงที่และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่กลุ่มทดลองที่ได้รับลิกนินในอัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 63.3 ± 11.5 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็น 73.3 ± 11.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมผลบวกที่มีค่าเท่ากับ 100 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดไวรัสร่วมกับลิกนินในอัตราตั้งแต่ 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีอัตราการตายเป็น 26.7 ± 25.2 , 16.7 ± 15.3 และ 13.3 ± 13.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามวันที่ 20 ของการทดลองพบว่าชุดควบคุมผลลบที่ฉีดด้วยน้ำเกลือกับชุดที่ฉีดสารลิกนินในอัตรา 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการตายของกุ้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเป็น 16.7 ± 5.8 , 26.7 ± 25.2 , 16.7 ± 15.3 และ 13.3 ± 13.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะมีค่าน้อยกว่ากุ้งในชุดควบคุมผลบวกและกุ้งที่ได้รับการฉีด YHV ผสมลิกนินในอัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่าเป็น 100 ± 0.0 และ 80 ± 20.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่ากุ้งในสองกลุ่มหลังนี้จะมีอัตราการตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่อย่างใด (ภาพที่ 16 และตารางผนวกที่ 8)



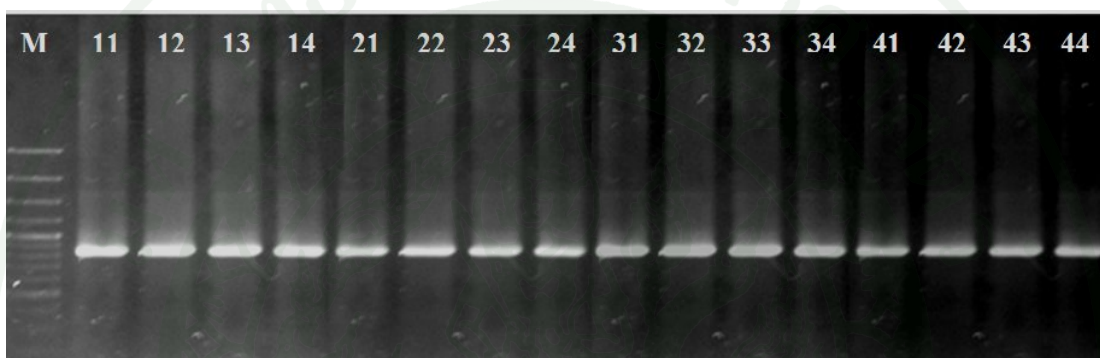
ภาพที่ 16 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.2 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองในกึ่งขาวทดลองโดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการตรวจสอบเพื่อให้ทราบว่ากึ่งขาวที่เหลืรอดจากการติดเชื้อไวรัสผสมลิกนินมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสห้วเหลืองหรือไม่ โดยภายหลังสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 20 วัน ได้ทำการสุ่มกึ่งที่เหลืจากการทดลองมาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสห้วเหลืองทุกชุดการทดลองชุดการทดลองละ 10 ตัว คือ กลุ่มควบคุมผลบวกที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลือง เพื่อยืนยันว่ากึ่งขาวที่ตายมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสห้วเหลือง โดยได้ทำการเก็บกึ่งที่มีอาการร่อแร่ (moribund) ในวันที่ 5-7 ภายหลังการได้รับเชื้อไวรัส กลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยืนยันว่ากึ่งที่นำมาทดลองไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสห้วเหลือง กลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสห้วเหลืองกับสารละลายลิกนินทุกความเข้มข้น โดยใช้เทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin ผลจากการทดสอบพบว่าในกึ่งทุกตัวอย่างที่สุ่มมาทุกตัวมีการแสดงออกของยีน β -actin ที่ใกล้เคียงกันมาก โดยมีขนาดแถบ DNA ของ PCR products เท่ากับ 836 bp (ภาพที่ 17) ส่วนการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสห้วเหลืองพบว่าการแสดงการปนเปื้อนไวรัสห้วเหลืองในกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองเท่านั้น ซึ่งให้ผลของ RT-PCR เป็นบวกทุกตัว โดยมีขนาดแถบ DNA ของ PCR products เท่ากับ 964 bp ส่วนกึ่งกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือและกึ่งกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสห้วเหลืองกับสารละลายลิกนินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ไม่พบการปนเปื้อนไวรัสห้วเหลือง แสดงว่ากึ่งไม่มีการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ (ภาพที่ 18)



(a)



(b)

ภาพที่ 17 การแสดงออกของยีน β -actin ในตัวอย่างเหงือกผู้ป่วยที่ทำการศึกษาทุกชุดการทดลอง หลังจากสิ้นสุดการทดลอง โดยที่

M คือ 100 bp Marker

C1+ ถึง C4+ คือ ตัวอย่างเหงือกในกลุ่มควบคุมที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ตัวอย่างที่ 1-4

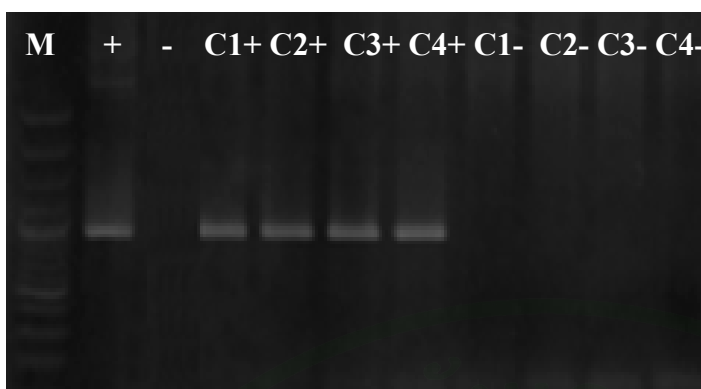
C1- ถึง C4- คือ ตัวอย่างเหงือกในกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างที่ 1-4

11 ถึง 14 คือ ตัวอย่างเหงือกกลุ่มในที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิควินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

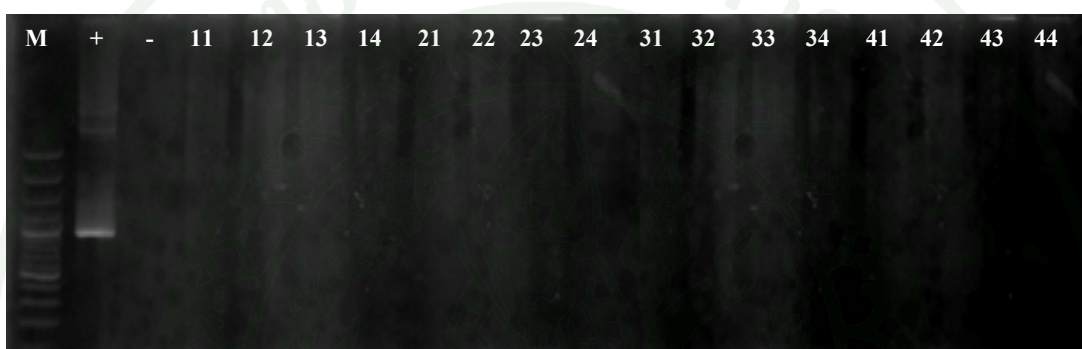
21 ถึง 24 คือ ตัวอย่างเหงือกในกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิควินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

31 ถึง 34 คือ ตัวอย่างเหงือกในกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิควินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

41 ถึง 44 คือ ตัวอย่างเหงือกกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิควินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4



(a)



(b)

ภาพที่ 18 การแสดงการปนเปื้อนไวรัสหัวเหลืองของตัวอย่างเหงือกกุ้งขาว โดยใช้เทคนิค RT-PCR หลังจากสิ้นสุดการทดลอง โดยที่

+ คือ ปฏิกริยาควบคุมผลบวก

- คือ ปฏิกริยาควบคุมผลลบ

M คือ 100 bp Marker

C1+ ถึง C4+ คือ ตัวอย่างกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ตัวอย่างที่ 1-4

C1- ถึง C4- คือ ตัวอย่างกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างที่ 1-4

11 ถึง 14 คือ ตัวอย่างกุ้งในกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

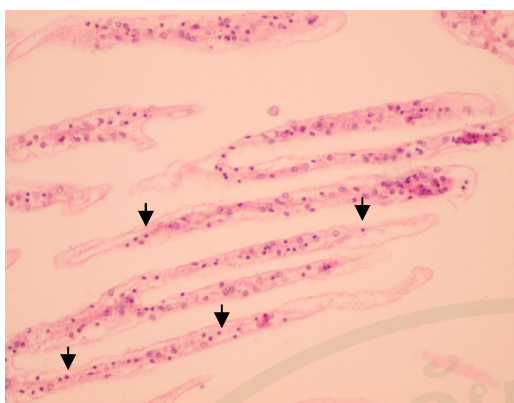
21 ถึง 24 คือ ตัวอย่างกุ้งในกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

31 ถึง 34 คือ ตัวอย่างกุ้งในกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

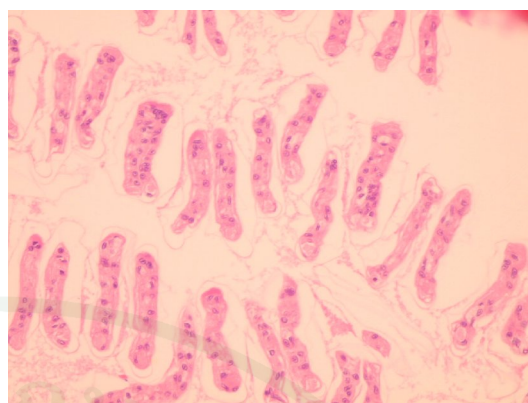
41 ถึง 44 คือ ตัวอย่างกุ้งในกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสหัวเหลืองกับสารละลายลิกนินความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัวอย่างที่ 1-4

4.3 การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อถุงขาว

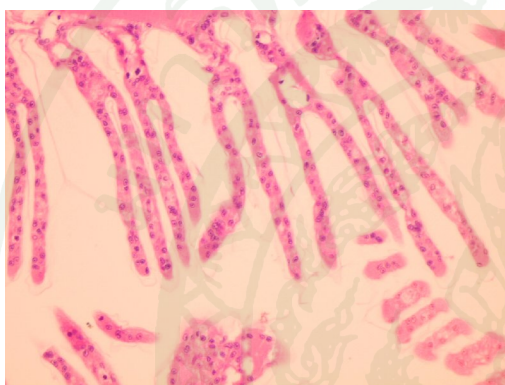
การศึกษาในส่วนนี้เป็นการตรวจสอบเพื่อให้ทราบว่าถุงขาวที่เหลืรอดจากการติดเชื้อไวรัสผสมลิกันมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสห้วเหลืองหรือไม่ควบคู่การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ภายหลังสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 20 โดยได้ทำการสุ่มถุงที่เหลืรอดจากการทดลองมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองทุกชุดการทดลอง เช่นเดียวกับในข้อ 4.2 พบว่ากลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองเท่านั้นที่มีเนื้อเยื่อ Lymphoid organ และเหงือก ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายของโรคห้วเหลืองมีการตายของเซลล์ (necrosis) กระจายอยู่ทั่วไปโดยสังเกตเห็นเซลล์นิวเคลียสหดเล็ก และโครมาติครวมตัวเป็นก้อน (Pyknotic nuclei) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการตายของเซลล์ที่เกิดจากเชื้อไวรัสห้วเหลือง ส่วนกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือและกลุ่มที่ผสมเชื้อไวรัสห้วเหลืองกับสารละลายลิกันที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการตายของเซลล์ในเนื้อเยื่อเหงือก และ Lymphoid organ แสดงให้เห็นว่าถุงที่เหลืรอดไม่มีการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองแต่อย่างใด (ภาพที่ 19 และ 20)



ชุดควบคุมผลบวก (ฉีดเฉพาะเชื้อไวรัส)



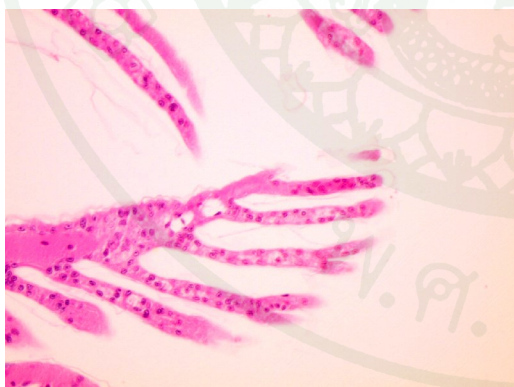
ชุดควบคุมผลลบ (ฉีดน้ำเกลือ 0.85%)



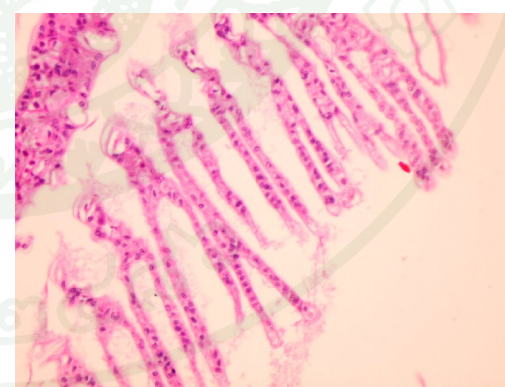
ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายกลีเซอรีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร



ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายกลีเซอรีน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

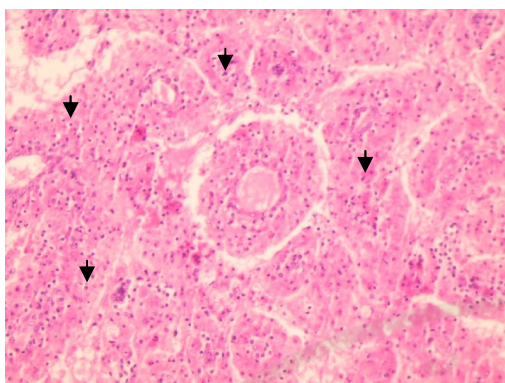


ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายกลีเซอรีน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

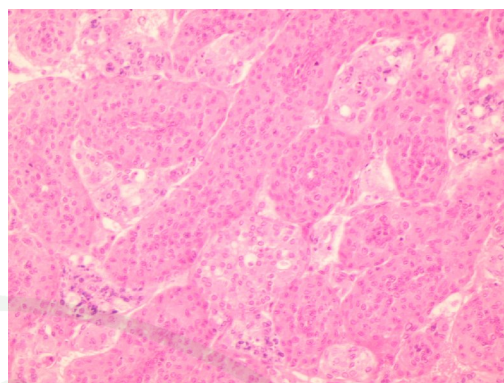


ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายกลีเซอรีน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

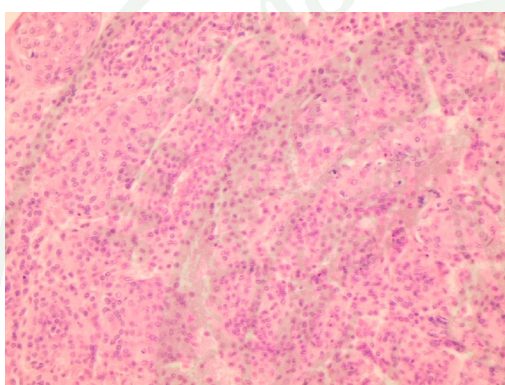
ภาพที่ 19 จุลพยาธิของเหงือกกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับสารละลายกลีเซอรีนความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ลูกศรชี้แสดงถึงลักษณะของการเกิด Pyknotic nuclei)



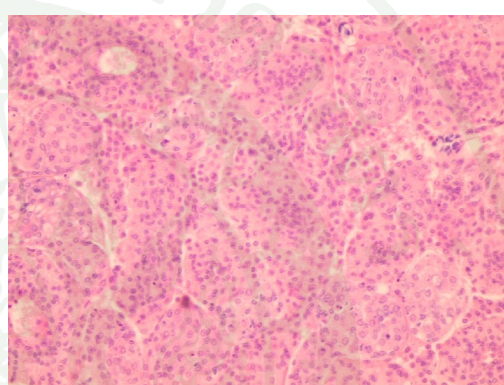
ชุดควบคุมผลบวก (ฉีดเฉพาะเชื้อไวรัส)



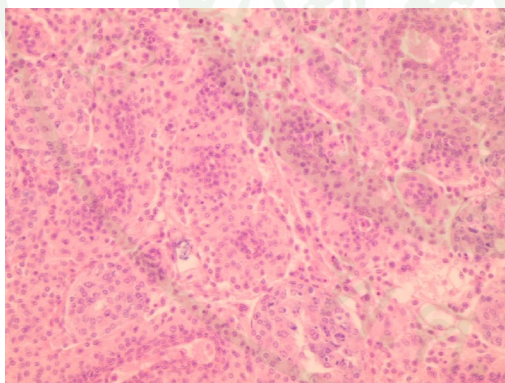
ชุดควบคุมผลลบ (ฉีดน้ำเกลือ 0.85%)



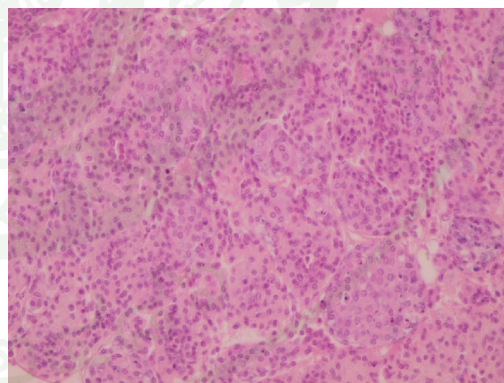
ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายลิกันนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร



ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายลิกันนิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายลิกันนิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร



ชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
ที่ผสมสารละลายลิกันนิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 20 จุลพยาธิของ Lymphoid organ ของกุ้งขาวที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับ
สารละลายลิกันนินความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ลูกศรชี้แสดงถึง
ลักษณะของการเกิด Pyknotic nuclei)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารลิกนินที่สามารถทำให้กึ่งขาวตาย 50 เปอร์เซนต์ภายใน 96 ชั่วโมง (Medial lethal dosage at 96 hours; 96-hours LD₅₀)

จากข้อมูลวิชาการในอดีตจนถึงปัจจุบันการศึกษาความเป็นพิษของสารลิกนินและอนุพันธ์ต่าง ๆ ของสารชนิดนี้ได้มีรายงานมาอย่างต่อเนื่องอันเป็นผลมาจากการพยายามนำเอาสารชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ในกิจกรรมทางการเกษตรและอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะการนำมาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์บก เนื่องจากการที่สารลิกนินมีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการ เช่น คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของไวรัส คุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก คุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ขณะที่สัตว์น้ำนั้นยังถือว่าข้อมูลทางด้านพิษวิทยาของสารลิกนินนั้นมีอยู่อย่างจำกัดมากเมื่อเทียบกับสัตว์บก การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเอาสารลิกนินมาใช้ในการต้านทานไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาว ซึ่งจัดว่าเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงและสร้างความเสียหายอย่างหนักในอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งทะเลโดยทั่วไป ดังนั้นเพื่อให้การนำเอาสารลิกนินมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูงสุด การทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการประเมินความเป็นพิษของสารลิกนินโดยการศึกษาค่า LD₅₀ ภายในเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารลิกนินในสัตว์จำพวกกุ้งเป็นครั้งแรกโดยมีผลการทดลองเป็นดังนี้

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารลิกนินที่สามารถทำให้กึ่งขาวตาย 50 เปอร์เซนต์ (LD₅₀) ภายใน 96 ชั่วโมง พบว่าสารเคมีชนิดนี้มีความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังจากกึ่งทดลองที่ได้รับการฉีดลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 100-300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากึ่งทดลองในแต่ละกลุ่มจะแสดงการตายเฉพาะในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเท่านั้น โดยหลังจากได้รับสารลิกนินแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กึ่งทดลองในทุกกลุ่มจะไม่แสดงการตายให้เห็นเลยจนถึง 96 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าลิกนินที่ฉีดเข้าไปในตัวกึ่งทดลองนั้นจะแสดงความเป็นพิษเฉียบพลันในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเท่านั้น นอกจากนี้จากการสังเกตกึ่งที่แสดงการตายพบว่าภายหลังจากได้รับสารลิกนินแล้วกึ่งจะแสดงอาการซึมหยุดนิ่ง ไม่เคลื่อนไหวและในขณะเดียวกันจะเริ่มสังเกตเห็นว่ากล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีด หัวใจและเหงือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนและกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นเลย ๆ หลังจากนั้นกึ่งจะเริ่มนอนตะแคงตัวและตายในที่สุด จากการศึกษากครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากล้ามเนื้อ หัวใจและเหงือกของกึ่งจัดเป็นอวัยวะ

เป้าหมายหลักที่สำคัญที่มีการสะสมตัวของสารลิกนินจนได้รับผลกระทบของสารลิกนินและทำให้เกิดการตายในที่สุด

เมื่อพิจารณาถึงระดับความเป็นพิษของสารลิกนินในกุ้งขาวจากการศึกษาครั้งนี้จะพบว่าการให้สารลิกนินกับกุ้งทดลองโดยการฉีดจะทำให้ลิกนินมีความเป็นเย็บปล้นค่อนข้างสูง คือมีค่า LD_{50} ภายในเวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความเป็นพิษที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์ของสารที่อยู่ในรูป Phenolic และ Alcoholic compounds ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารลิกนิน โดยทั่วไป (Khanam *et al.*, 2006) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองแช่กุ้งขาวขนาดเดียวกันนี้ด้วยสารลิกนินตั้งแต่ 1,000-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองเบื้องต้นที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารลิกนินในรูปของ Lethal concentration (LC_{50}) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของสารลิกนินเหล่านี้ไม่สามารถโน้มนำทำให้กุ้งเกิดความผิดปกติใด ๆ ภายหลังจากการแช่เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำให้ต้องศึกษาเฉพาะค่าความเป็นพิษในรูปของ Lethal dose (LD_{50}) เท่านั้น ซึ่งการทดลองส่วนนี้ได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่าการที่กุ้งขาวได้รับสารลิกนินโดยการฉีดโดยตรงจะทำให้กลไกการเกิดความเป็นพิษสูงกว่าวิธีการแช่อย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาถึงกลไกความเป็นพิษของสารลิกนินโดยการฉีดจะพบการสะสมตัวของลิกนินอย่างเห็นได้ชัดในส่วนของกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีด หัวใจและเหงือก โดยเฉพาะส่วนของหัวใจและเหงือกนั้นจะเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีชัดเจนที่สุด ซึ่งอวัยวะทั้ง 2 นี้จะทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับระบบหมุนเวียนของเลือดในร่างกาย สันนิษฐานได้ว่าลิกนินที่ฉีดเข้าไปจะมีผลทำให้การทำงานของอวัยวะดังกล่าวเกิดความล้มเหลวเป็นผลทำให้ไม่สามารถลำเลียงเลือดหมุนเวียนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้จึงเป็นผลทำให้เกิดการสะสมตัวของเลือดบริเวณดังกล่าวเกิดขึ้นในที่สุด ซึ่งในสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไปมีการรายงานว่าสารประกอบอนุพันธ์ของลิกนินจะมีคุณสมบัติในการเป็น Antithrombotic คือ ยับยั้งเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในเซลล์กลุ่มที่ทำหน้าที่ควบคุมในการแข็งตัวของเลือดอย่างได้ผลในระดับ 0.05-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น โดยไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงในการแข็งตัวของเลือดและการไหลออกของเลือดจากท่อเลือดสู่ภายนอกร่างกาย (Loomis and Beyer, 1953) หรืออาจเป็นไปได้ว่าสารลิกนินที่ฉีดเข้าไปในตัวกุ้งซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่ม Crustacean จะไปยับยั้งเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Hyalinocyte (Söderhäll and Cerenius, 1992) ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดภายในร่างกายเกิดขึ้น หรืออาจยับยั้งเซลล์เม็ดเลือดในกลุ่มอื่น ๆ และโปรตีนบางชนิดที่อยู่ในน้ำเลือด แล้วให้ผลตรงกันข้ามกับที่เกิดในสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไป ดังจะสังเกตได้จากหัวใจและเหงือกที่นอกเหนือจากจะมีสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อนแล้วยังพบว่ามีลักษณะการบวมซึ่งเป็นลักษณะการรวมตัวของเม็ดเลือดรวมอยู่ด้วย

ในปัจจุบันข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษของสารลิกนินในสัตว์น้ำโดยเฉพาะกับกุ้งนั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด แต่ก็มีการศึกษาในกลุ่มของแมลงและปลาบางชนิดเท่านั้น เช่น Wilson (1972) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) ขนาดต่าง ๆ พบว่ามีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 2,000-2,400 ppm จากการศึกษาความเป็นพิษของลิกนินโดย Roald (1977) ที่ได้ทำการทดลองในปลา Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ขนาด 23.6 กรัม พบว่าลิกนินที่ความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายจำนวนครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 7,300 ppm โดยปลาที่ได้รับลิกนินจะแสดงอาการหยุดการเคลื่อนที่บางตัวลอยอยู่ผิวน้ำและหายใจเอาอากาศอย่างรวดเร็วและลงไปในอนที่พื้นของภาชนะก่อนที่จะแสดงการตาย และยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1,875 ppm เป็นระดับที่ไม่มีผลต่อปลา Rainbow trout ขนาดดังกล่าว ซึ่งกลไกในการออกฤทธิ์ต่อปลานั้นยังไม่แน่ชัด แต่อาจมีสาเหตุโน้มนำมาจากผลข้างเคียงต่อคุณภาพน้ำบางประการ เช่น pH, Biochemical Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD) รวมถึงค่าความโปร่งแสง (Transparency) ของน้ำด้วย

จากการรายงานของ Khanam *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษาความเป็นพิษของลิกนินที่สกัดได้จากชานอ้อยต่อแมลงที่เป็นวัชพืช 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum*, *Sitophilus oryzae* และ *Callosobruchus maculatus* พบว่าค่า LD_{50} ของสารลิกนินที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อ *Tribolium castaneum* มีค่าเท่ากับ 139.38 และ 49.88 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ส่วนค่า LD_{50} ของสารลิกนินที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อ *Tribolium confusum* มีค่าเท่ากับ 239.54, 221.34 และ 215.86 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่ค่า LD_{50} ของสารลิกนินที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อ *Sitophilus oryzae* มีค่าเท่ากับ 335.56, 57.43 และ 24.72 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และค่า LD_{50} ของสารลิกนินที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อ *Callosobruchus maculatus* มีค่าเท่ากับ 273.40 และ 57.74 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Luscombe and Nicholls (1973) ที่ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันที่ 24 ชั่วโมง ของสารลิกนินในหนูทดลองขนาด 80-100 กรัม โดยการกินเพียงครั้งเดียว พบว่าไม่สามารถศึกษาค่าความเป็นพิษของสารลิกนินด้วยวิธีนี้ได้เนื่องจากระดับความเข้มข้นของสารลิกนินที่ให้สูงสุดถึง 40 กรัมต่อกิโลกรัมของหนูทดลอง ไม่สามารถนำหนูทดลองได้เลยตั้งแต่ 24-96 ชั่วโมง แต่พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารลิกนินตั้งแต่ 10 กรัมต่อกิโลกรัมของหนูทดลอง จะแสดงอาการท้องเสียในช่วงแรกของการทดลองเท่านั้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันแบบ Subacute toxicity โดยการการผสมลิกนินในน้ำความเข้มข้นตั้งแต่ 0 (กลุ่มควบคุม) 0.025, 0.25, 2.5 และ 10 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้สัตว์ทดลองดื่มเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าจาก

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตน้ำหนักของอวัยวะภายใน ค่าโลหิตวิทยา องค์ประกอบของปัสสาวะ กิจกรรมของเอนไซม์ Transaminase และ Alkaline-phosphatase ในซีรัม พบว่าหนูทดลองที่ได้รับ สารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.025-2.5 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวไม่ แตกต่างกับกับกลุ่มควบคุม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันกับการศึกษาจุลพยาธิวิทยาที่ไม่ความผิดปกติของ อวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามในหนูทดลองที่ได้รับสาร ลิกนินในความเข้มข้นสูงจะทำให้หนูตัวผู้มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันลดลง และทำให้หนูทั้งเพศผู้และ เพศเมียแสดงความผิดปกติหลายประการ เช่น การเกิดบาดแผลที่บริเวณโคนหาง การลดลงของ ปริมาณเม็ดเลือดขาวและเกิดภาวะ โลหิตจาง (Anaemia) และยังมีผลทำให้น้ำหนักของตับ ไตและ ม้ามของหนูทดลองมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สอดคล้องกับการศึกษาของ Sakagami *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาการสะสมตัวของสาร ลิกนินในหนูทดลองโดยการให้กินพบว่าลิกนินจะมีการสะสมตัวในทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ และสามารถขับออกทางปัสสาวะและทางอุจจาระได้บางส่วน ขณะที่การทดลองโดยการฉีดจะทำให้ เกิดการสะสมที่ตับ กระเพาะอาหารและปอดเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าการฉีดสารลิกนิน ยังมีผลทำให้ม้ามของหนูทดลองมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น (splenomegaly) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระบบ ภูมิคุ้มกันของหนูถูกกระตุ้น ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าหนูทดลองที่ได้รับลิกนินโดยการฉีดจะส่งผล โดยตรงต่อเอนไซม์ชนิด Heme oxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตในตับยังสามารถถูกชักนำให้มี การผลิตเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การให้สารลิกนินในระดับ Lethal dose จะ ส่งผลทำให้เกิดการคลังของเลือดในบริเวณม้ามและปอด และส่งผลทำให้หนูทดลองเกิดการตก เลือดในอวัยวะดังกล่าวในที่สุด

2. การศึกษาผลของการผสมสารละลายลิกนินในอาหารต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

จากการศึกษาผลของสารลิกนินในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพิจารณาจากปริมาณเม็ดเลือด รวมทั้งหมด (Total haemocyte count) ของกุ้งขาวที่ได้รับการเสริมลิกนินในอาหารในระดับความ เข้มข้นตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน พบว่าภายหลังจากการได้รับอาหารที่ ผสมสารลิกนินในวันที่ 3, 7 และ 14 มีเพียงวันที่ 7 เท่านั้น กุ้งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารในอัตรา 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารลิกนินในอาหาร ในอัตรา 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างไรก็ตามปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งขาว ในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง แม้ว่าจะได้รับลิกนิน

ในอาหารต่อเนื่องกันจึงถึง 14 วัน จากการรายงานของ Luscombe and Nicholls (1973) พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารลิกนินระดับความเข้มข้นสูงในระดับ 10 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตรโดยการดื่มทุกๆ วันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 6, 10 และ 16 หนูกลุ่มนี้จะมีปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P<0.01$) อย่างชัดเจน ในทางตรงกันข้ามกับพบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณ Haemoglobin และค่า Haematocrit ของหนูในกลุ่มนี้มีค่าลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนเช่นกัน ($P<0.01$) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Slaminková *et al.* (2009) ที่ได้รายงานว่าการเสริมลิกนินในอาหารในอัตรา 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์จะสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes) และเม็ดเลือดชนิด leukocytes ในไก่เนื้อ (Broiler chicken) ให้ปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ T cells ของไก่ที่ได้รับสารลิกนินในระดับดังกล่าวมีค่าเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ในการศึกษาครั้งนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการเสริมลิกนินในระยะเวลาสั้น ๆ ดังกล่าวจะสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกิ้งได้ เนื่องจากระยะเวลาของการทดลองยังสั้นกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการทดลองในหนู แต่ให้ผลแตกต่างกับการทดลองในไก่ซึ่งใช้ระยะเวลาเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าชนิดของสัตว์และความเข้มข้นของสารลิกนินที่แตกต่างกันอาจจะได้รับผลของการตอบสนองที่แตกต่างกันออกไปได้ (Baurhoo *et al.*, 2008)

ส่วนการศึกษาระบบการ Phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดกิ้ง ภายหลังกินอาหารผสมลิกนิน พบว่าการเสริมลิกนินในอาหารสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งทดลองได้ โดยเฉพาะในวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งพบว่ากิ้งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ Phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และยังเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่ากิ้งที่ได้รับลิกนินในอาหารในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ Phagocytosis สูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน ($P<0.05$) ผลของการทดลองส่วนนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาค่า Phagocytic index ที่พบว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง กิ้งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า Phagocytic index สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และยังพบว่ากิ้งที่ได้รับลิกนินในอาหารในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า Phagocytic index สูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน ($P<0.05$) เช่นกัน การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมลิกนินลงไปในอาหารให้กิ้งกินนั้นสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกิ้งที่ทำหน้าที่ดักจับกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมมีประสิทธิภาพในการทำงานทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

นอกจากนี้ Suzuki *et al.* (1989a) ได้ทำการศึกษาผลของสารลิกนินในรูป Lignosulfonate ต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันของเซลล์ Macrophage cell line ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีลิกนิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 24 ชั่วโมง พบว่าการกระตุ้นดังกล่าวจะมีผลทำให้เซลล์ Macrophage มีความสามารถในการยึดเกาะและการยึดตัวของเท้าเทียมสูงขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้จากการตรวจสภาพของเซลล์ Macrophage ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมลิกนินใน อัตรา 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีการนำเอากลูโคสเข้าไปในเซลล์มากกว่าปกติถึง 3.7 เท่า และยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์ Macrophage มีการแบ่งเซลล์มากขึ้นตามความเข้มข้นของลิกนินที่ เพิ่มขึ้น โดยมีระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์สูงสุดที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ Sorimachi *et al.* (1990b) ที่พบว่าการใช้นุพันธ์ลิกนินในรูปที่ละลายน้ำสามารถ กระตุ้นให้เซลล์ Macrophage ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีสารลิกนิน ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเชื่อม (fuse) รวมกันเป็นลักษณะของเซลล์ที่เรียกว่า “Giant cells” ที่มี นิวเคลียสภายในเฉลี่ยประมาณ 60 นิวเคลียส ซึ่งการเปลี่ยนสถานะของเซลล์ในลักษณะนี้จะเป็น การตอบสนองของเซลล์เพื่อใช้ในการต่อต้านเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม เช่น การเกิดโรค Tuberculosis ที่เกิดจากเชื้อ Mycobacterium เป็นต้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้น Macrophage เช่น Lipopolysaccharide (LS) ไม่สามารถชักนำให้เกิดได้

Sakagami *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ Lignin carbohydrate complex 2 ชนิด คือ Fr.VI และ Fr.VII ที่สกัดได้จาก Pine cones สามารถกระตุ้นให้เซลล์ Macrophage ของ หนูให้สามารถผลิต Nitric oxide (NO), Citrulline (CIP) และ Asparagine (ASN) โดยมีผลไปเร่งการ สร้าง (Expression) ของเอนไซม์ Inducible nitric oxide synthetase (iNOS) และ ASN synthetase (AS) ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Macrophage ของหนูให้สามารถเกิดกระบวนการ Phagocytosis ในการดักจับกินและทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะที่สาร Tannin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตเช่นเดียวกับลิกนินกลับมีผลในการยับยั้งกระบวนการ Phagocytosis

นอกจากนี้จากการสังเกตพบวาระหว่างการทดลองกึ่งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารในระดับ ตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่ได้แสดงความผิดปกติใด ๆ ให้เห็นและไม่พบว่ากึ่งทดลอง ในทุกกลุ่มมีการตายระหว่างทดลองเลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมลิกนินในอาหารในระดับ ดังกล่าวเป็นระดับที่ปลอดภัยและไม่ทำให้เกิดการตายในกึ่งขาวแต่อย่างใดในช่วง 14 วัน และยังไม่ พบการสะสมของสารลิกนินในบริเวณเหงือกและหัวใจ เช่นเดียวกับการทดลองในส่วนของการ ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการฉีดเข้าตัวกึ่งโดยตรง แสดงให้เห็นว่าการที่กึ่งได้รับสาร

ลิกนินผ่านเข้าไปในระบบทางเดินอาหาร โดยการกินจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์หรือกลไกต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารจะเป็นส่วนที่สำคัญในการป้องกันไม่ให้ลิกนินสามารถแสดงความเป็นพิษต่อกิ้งกวดทดลองได้ ถึงแม้ว่ากิ้งกวดทดลองจะกินลิกนินเข้าไปในระดับความเข้มข้นสูงก็ตาม

3. การศึกษาผลของการผสมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus: YHV)

ผลของการเสริมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลืองสามารถสรุปได้ว่าการเสริมลิกนินในอาหารตั้งแต่ความเข้มข้น 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่ได้ส่งผลให้กิ้งกวดมีการต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้แต่อย่างใด ถึงแม้ว่าการเสริมลิกนินในอาหารจะสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดให้สามารถกลืนกินสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีประสิทธิภาพแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการเกิดกระบวนการ Phagocytosis อาจไม่ใช่ส่วนสำคัญในการต้านทานต่อไวรัสหัวเหลือง นอกจากนี้เป็นที่ทราบแล้วว่าเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญคือ เซลล์เม็ดเลือด (Haemocyte) (Nash *et al.*, 1995) อาจส่งผลทำให้กระบวนการ Phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกวดมีประสิทธิภาพลงไปก็ได้

ถึงแม้ว่าการเสริมลิกนินลงในอาหารไม่สามารถทำให้กิ้งกวดทดลองสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ แต่ก็มีรายงานหลาย ๆ รายงานที่พบว่าการเสริมลิกนินลงในอาหารนั้น จะสามารถทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองในหลาย ๆ ส่วนเช่น Baurhoo *et al.* (2007) พบว่าการเสริมลิกนินลงในอาหารในอัตรา 1.25 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารของไก่กระตัง (Broiler chickens) ได้เป็นอย่างดี โดยจะมีผลทำให้ความสูงของ Villi ลำไส้ ปริมาณของ Goblet cells รวมถึงปริมาณของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร เช่น Lactobacilli bacteria และ Bifidobacteria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรียที่ก่อโรคโดยเฉพาะ *Escherichia coli* ในลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Slaminková *et al.* (2009) ยังได้รายงานว่าการเสริมลิกนินในอาหารในอัตรา 0.5 เปอร์เซ็นต์ให้ไก่ทดลองกินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะสามารถเพิ่มปริมาณ B และ T cells ซึ่งมีความสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจงได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Sakagami *et al.* (1993); Ikada *et al.* (1988); Suzuki *et al.* (2002a และ 2002b) ยังพบว่าการกระตุ้นเซลล์ Monocytes และ Macrophages ของหนูและคนด้วย สารลิกนินจะมีผลทำให้เซลล์เหล่านี้มีการสร้างสารในกลุ่ม Cytotoxic factor และ Inflammatory cytokines ซึ่งได้แก่ Tumor necrosis factor (TNF), Interleukin-1 และ Nitric oxide เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย ดังนั้นการเสริมลิกนินลงไปในอาหารกึ่งน้ำจะเป็นการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารให้มีการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมให้ดีขึ้น นอกจากนี้ Labaj *et al.* (2003) ยังได้รายงานว่าลิกนินยังเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งสารก่อมะเร็งบางชนิด เช่น N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine (MNNG) ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการทำลาย Double strand DNA และก่อให้เกิดการ Mutation ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการดูดซับและทำหน้าที่เป็น Antioxidant ของสารลิกนินหรือการที่มีคุณสมบัติเป็น Scavenging activity ในการต่อต้านอนุมูลอิสระหรือ Reactive oxygen species (ROS) (Ebringer *et al.*, 2003) โดยจากข้อมูลที่ผ่านมาจะพบว่าเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือสัตว์โดยทั่วไปจะไม่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ ดังนั้นการเสริมลิกนินในอาหารในระดับที่เหมาะสมก็จะทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพในระยะยาว

4. การทดลองผลของสารลิกนินในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองในหลอดทดลอง (*in vitro*)

การทดลองครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นแล้วว่า ลิกนินนั้นเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งไวรัสหัวเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเข้มข้น 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้น พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้บางส่วนเท่านั้น โดยเมื่อการทดลองเข้าสู่ขั้นท้าย ๆ กึ่งทดลองที่ได้รับลิกนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็มีแนวโน้มของการตายสูงขึ้นและใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมผลบวกในวันที่ 20 ของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของลิกนินที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลืองในการทดลองครั้งนี้

นอกจากนี้ผลของการใช้เทคนิค RT-PCR และจุลพยาธิ ในการเป็นเครื่องยืนยันประสิทธิภาพของการใช้ลิกนินในการยับยั้งเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่ากึ่งที่หลอดรอดจากกลุ่มทดลองที่ได้รับการฉีดการฉีดไวรัสหัวเหลืองร่วมกับสารลิกนินตั้งแต่ 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วแต่ให้ผลเป็นลบอย่างชัดเจนจากการใช้เทคนิคทั้ง 2 ในการตรวจสอบ โดยการทดลองนี้จะสอดคล้องกับหลาย ๆ การทดลองซึ่งมีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งได้แก่

Suzuki *et al.* (1989a และ 1989b) ได้รายงานว่าการใช้ลิกนินในระดับความเข้มข้นที่มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิด Cytopathic effect, การแสดงออกของยีนส์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจนจำเพาะและการเกิด Syncytia formation ของเชื้อ HIV ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้จากการทดลองเดียวกันนี้ยังพบว่าลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินที่ปราศจากน้ำตาลยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ Reverse transcriptase ของไวรัส HIV ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน นอกจากนี้จากรายงานของ Sorimachi *et al.* (1990a) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับอนุพันธ์ของลิกนิน คือ EP3 และ Lignosulfonate (LS) พบว่าอนุพันธ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเกิด Cytopathic effects ของ Herpes simplex virus (type 1 และ type 2) ที่สามารถก่อให้เกิดโรคเริม และ Western equine encephalitis (WEE) ซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบได้อย่างสมบูรณ์

Lai *et al.* (1990) และ Suzuki *et al.* (1989a) พบว่าการใช้ลิกนินที่สกัดได้จาก Pine cone และเชื้อราสามารถยับยั้งไวรัสที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเอดส์ (AIDS) ในเซลล์ที่เลี้ยงใน Flask ทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Suzuki *et al.* (1990) ยังพบว่าการใช้สารประกอบลิกนินในรูป EP3 ซึ่งสกัดได้จากเชื้อรา *Lentinus edodes* สามารถยับยั้งเชื้อ HIV ได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน และยังพบว่าคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อไวรัสนั้นเป็นผลมาจากส่วนประกอบที่เป็น Low molecular weight ขณะที่ส่วนประกอบที่เป็น High molecular weights นั้นจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มค่า Glucose consumption ของ Murine peritoneal macrophages อย่างมีนัยสำคัญ

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nakashima *et al.* (1992) ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง Human immunodeficiency virus (HIV) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเอดส์ของสารลิกนิน 2 ชนิด คือ Frs. VI และ Frs. VII เปรียบเทียบกับสารลิกนินในรูปต่าง ๆ โดยพิจารณาจากค่า Selectivity index (SI) พบว่าทั้ง Frs. VI และ Frs. VII มีค่า SI อยู่ระหว่าง 4-124 ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ใช้ Tetrameric, Trimeric, Dimeric, Monomeric hydrolysable tannin และ Tannin เข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสารเหล่านี้จะมีค่า SI เป็น 7.3 ± 6.5 , 3.4 ± 3.7 , 2.3 ± 3.2 , 1.8 ± 2.8 และ 1.1 ± 0.4 ตามลำดับเท่านั้น

Ichimura *et al.* (1999) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารลิกนินที่สกัดได้จาก Wheat bean และลิกนินสังเคราะห์หลายชนิดในการยับยั้งเชื้อ HIV-1 ใน Cell line ชนิด MT-4 cells พบว่าสารสกัดลิกนินที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามขนาดของ Molecular weight ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ขนาดมากกว่า 30 kDa, 30-10 kDa, 10-1 kDa และ 1 kDa - 500 Da โดยทั้ง 4 กลุ่มจะสามารถยับยั้ง

การทำงานของเอนไซม์ Protease ที่สร้างจากเชื้อไวรัส HIV-1 ใน Cell line ชนิด MT-4 cells ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังพบว่ากลุ่มที่มี Molecular weight ต่ำสุด (1 kDa - 500 Da) ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HIV-1 ใน Cell line ชนิด MT-4 cells ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Zhang *et al.* (2007) พบว่า Lignin-polysaccharide complex ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของลิกนินมีฤทธิ์ต้าน Herpes simplex virus (HSV) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการจับของเซลล์ไวรัสกับเซลล์ของเจ้าบ้านก่อนอนุกรุกเข้าสู่เซลล์ของเจ้าบ้านในท้ายที่สุด อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ก็ยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดของลิกนินในการป้องกันไวรัสชนิดดังกล่าว Sakagami *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาโดยการนำเอา Influenza virus ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายได้มาผสมกับ Lignin carbohydrate complex ในรูป Fr.VI พบว่าสารละลายดังกล่าวไม่สามารถนำมาทำให้สัตว์ทดลองตายได้เลย เขาจึงทำการศึกษากลไกการยับยั้งดังกล่าว โดยนำเอาส่วนผสมระหว่างลิกนินและไวรัสไปปั่นเหวี่ยงใช้โดยเทคนิค Sucrose density gradient centrifugation พบว่าลิกนินในรูปของ Fr.VI และ Influenza virus ถูกปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอยู่ในตำแหน่งแถบ (Band) เดียวกันกับโปรตีนของ Influenza virus แสดงให้เห็นว่าสารประกอบลิกนินนั้นสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสโดยการเข้าจับกับอนุภาคของไวรัสโดยตรง Raghuraman *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 พบว่าการใช้เทคนิคในการปั่นตกตะกอนและ SEC chromatography สามารถแยกขนาดของลิกนิน ออกเป็น 5 fractions ที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 5 ขนาด คือ 39.4, 14.8, 5.9, 2.5 และ 1.9 kDa เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งของไวรัสของสารเหล่านี้ในการเข้าทำลายเซลล์ โดยพิจารณาจากค่า 50 เปอร์เซ็นต์ Inhibition concentration (IC_{50}) จะพบว่าค่า IC_{50} ของลิกนินจะมีค่าสูงขึ้นตามขนาดโมเลกุลที่เล็กลงของสารลิกนินและได้พบว่าอนุพันธ์ของสารลิกนินเหล่านี้จะมีความสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสที่มี envelop โดยทั่วไปทั้ง HSV และ HIV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ใกล้เคียงกันกับ Heparan sulfate (HS) ซึ่งจัดเป็น Proteoglycan ชนิดหนึ่งที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ ซึ่งถือเป็นบริเวณเริ่มต้นของไวรัสใช้สำหรับยึดเกาะกับ envelop เพื่อเข้าไปสู่ Target cell (Ugolini *et al.*, 1999; Spear *et al.*, 2000; Shukla and Spear 2001; Gallay 2004; Spear 2004; Fittipaldi and Giacca 2005) โดยในส่วนของ HSV นั้นจะใช้ Glycoprotein หลายชนิด เช่น gB, gC และ gD (Herold *et al.*, 1994; Shukla *et al.*, 1999; Cheshenko and Herold 2002 ; Tiwari *et al.*, 2004) ในการเข้าจับกับ HS คล้าย ๆ กันกับ HIV-1 ที่จะใช้โปรตีน gp120 และ Tat ในการจับกับ HS เพื่อที่จะให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ ดังนั้นการใช้สารลิกนินและ อนุพันธ์ของลิกนินต่าง ๆ จะเป็นผลให้ไวรัสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้หรือเข้าได้ในปริมาณที่น้อยลงนั่นเอง

จากรายงานข้างต้นทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่าการผสมกลินินกับไวรัสหัวเหลือง ซึ่งเป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA และอนุภาคมีขนาดประมาณ 150 ถึง 200 nm รวมทั้งยังมี Envelope ห่อหุ้มอยู่ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของไวรัสชนิดนี้ (Lightner and Redman, 1998) อาจมีผลทำให้เกิดการเกาะตัวกันระหว่างกลินินและองค์ประกอบของโปรตีนบางชนิดที่อยู่บน Envelope ซึ่งจะส่งผลต่อเนื่องให้ไวรัสหัวเหลืองไม่สามารถเข้าเกาะกับเซลล์ของกุ้งขาวได้ กุ้งที่หลุดรอดจากการได้รับการฉีดด้วยไวรัสหัวเหลืองผสมกับกลินินในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงไม่แสดงอาการของโรคหัวเหลืองให้เห็นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารลิกนินที่สามารถทำให้กุ้งขาวตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) ภายใน 96 ชั่วโมง พบว่าลิกนินมีความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงระดับความเป็นพิษของสารลิกนินในกุ้งขาวจากการศึกษาครั้งนี้จะพบว่า การให้สารลิกนินกับกุ้งทดลองโดยการฉีดจะทำให้ลิกนิน มีความเป็นพิษพลันค่อนข้างสูง เนื่องจากจากกุ้งจะแสดงการตายเฉพาะในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเท่านั้นและยังจะพบการสะสมตัวของลิกนิน อย่างเห็นได้ชัดในส่วนของบริษัทกล้ามเนื้อที่ฉีด หัวใจและเหงือกแสดงให้เห็นว่าอวัยวะดังกล่าวอาจเป็นอวัยวะหลักที่เกิดความเป็นพิษอันเป็นผลมาจากสารลิกนิน ส่วนการเสริมลิกนินในอาหารในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากุ้งไม่ได้แสดงความผิดปกติใด ๆ ให้เห็นและไม่พบว่ากุ้งทดลองในทุกกลุ่มมีการตายระหว่างการทดลองเลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมลิกนินในอาหารในระดับดังกล่าวเป็นระดับที่ปลอดภัยและไม่ทำให้เกิดการตายในกุ้งขาวแต่อย่างใดในช่วง 14 วัน และยังไม่พบการสะสมของสารลิกนินในบริเวณเหงือกและหัวใจ เช่นเดียวกับการทดลองในส่วนของการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการฉีด

2. จากการผลการศึกษาผลของการผสมสารละลายลิกนินในอาหารต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งขาวในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง แม้ว่าจะได้รับลิกนินในอาหารต่อเนื่องกันจนถึง 14 วัน ส่วนกระบวนการ Phagocytosis และกระบวนการ Phagocytic index ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งภายหลังกินอาหารผสมลิกนิน พบว่าการเสริมลิกนินในอาหารสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งทดลองได้ โดยเฉพาะในวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งพบว่ากุ้งที่ได้รับสารลิกนินในอาหารตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า Phagocytosis และ Phagocytic index สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่ากุ้งที่ได้รับลิกนินในอาหารในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่า Phagocytosis และ Phagocytic index สูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมลิกนินลงไปให้อาหารให้กุ้งกินนั้นสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งที่ทำหน้าที่ดักจับกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมมีประสิทธิภาพในการทำงานทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ เมื่อได้รับสารลิกนินติดต่อกันไปเป็นระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์

3. การศึกษาผลของการผสมลิกนินในอาหารต่อการต้านทานไวรัสหั่วเหลืองพบว่า การเสริมลิกนินในอัตราตั้งแต่ 1-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน ไม่สามารถทำให้กุ้งทดลองมีความต้านทานไวรัสหั่วเหลืองได้อย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าที่สิ้นสุดการทดลอง กุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมลิกนินทุกความเข้มข้นจะมีอัตราการตายสูงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม

4. การศึกษาผลของสารลิกนินในการต้านทานเชื้อไวรัสหั่วเหลืองในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าการผสมสารลิกนินในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร กับไวรัสหั่วเหลืองในระดับที่ทำให้กุ้งทดลองตายทั้งหมดภายใน 96 ชั่วโมง สามารถยับยั้งไวรัสไม่ให้ก่อโรคหั่วเหลืองในกุ้งทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อใช้เทคนิค RT-PCR และเทคนิคทางจุลพยาธิวิทยาในการตรวจสอบการปนเปื้อนและการเกิดโรคของไวรัสหั่วเหลืองในกุ้งที่เหลือรอดในทุกกลุ่มที่ได้รับสารลิกนินก็พบว่า กุ้งที่เหลือรอดดังกล่าวทุกตัวให้ผลเป็นลบ (Negative) สอดคล้องกันทั้งการใช้เทคนิค RT-PCR และเทคนิคทางจุลพยาธิวิทยา แสดงให้เห็นว่าลิกนินระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5-20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่สามารถยับยั้งไวรัสหั่วเหลืองในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้อย่างสมบูรณ์

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพิษเฉียบพลัน ผลต่อภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของสารลิกนินในกุ้งขาว พบว่าการให้สารลิกนินแก่กุ้งโดยวิธีการฉีดจะมีค่าความเป็นพิษค่อนข้างสูง ส่วนการทดลองโดยการแช่ไม่สามารถทำได้เนื่องจากถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของสารลิกนินสูงถึง 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็ไม่สามารถทำให้กุ้งทดลองตายได้ อีกทั้งการเสริมลิกนินในอาหารในอัตราตั้งแต่ 1- 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ก็ไม่สามารถทำให้กุ้งทดลองเกิดความผิดปกติหรือตายได้เช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้ลิกนินโดยการกินหรือการแช่เป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อกุ้งขาวกว่าวิธีการฉีด นอกจากนี้ผลจากการศึกษาคุณสมบัติของสารลิกนินในการต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลืองในหลอดทดลองพบว่าลิกนินในรูปแบบที่ละลายน้ำสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษาดังกล่าวจึงน่าจะใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อนำไปเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งและป้องกันเชื้อไวรัสหัวเหลืองหรือไวรัสชนิดอื่น ๆ โดยการละลายลงไปในพื้นที่ให้เลี้ยงเพื่อป้องกันอนุภาคของไวรัสที่อาจปนเปื้อนมากับน้ำในรูปแบบต่าง ๆ เนื่องจากในธรรมชาติลิกนินนั้นจัดเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี คงตัวหรือยากต่อการย่อยสลายในน้ำ และมักทำให้น้ำมีสีน้ำตาลอ่อน ๆ กอปรกับการที่มีพิษค่อนข้างต่ำต่อสัตว์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเพื่อเป็นการลดผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาและสารเคมีที่เป็นอันตราย ซึ่งส่งผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสภาพแวดล้อมและผู้บริโภคกุ้งและผลิตภัณฑ์ทั้งในและต่างประเทศต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2550. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2550.

ศูนย์สารสนเทศ. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

กิจการ สุขมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ดันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. 2543. ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

จิตวัฒนา เหลืองบำรุง, เต็มดวง สมศิริ และสุดา ตันทวนิช. 2550. การเกิดโรค *Aeromonas hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*). วารสารการประมง. 60(2): 147-151.

จิรพร สิงห์พันธ์. 2547. ผลของ Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*; Boone, 1931). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัทชนัน ศรีไพศาล, นนทวิทย์ อารีรักษ์, เรืองวิษณุ ยืนพันธ์ และนิติ ชูเชิด. 2549. การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone). น. 279-290. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

_____ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ธิดิ เชี่ยวชาญวิทย์. 2552. ลิกนิน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เทคโนโลยี, ปทุมธานี.

นนทวิทย์ อารีรัตน์, วัลลภา อรุณไพโรจน์, วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา, มยุว
อารีกิจเสรี, เจนนุช ว่องธวัชชัย และ งามอาจ เลหาวินิจ. 2547. รายงานการวิจัยมาตรฐาน
การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ เหมาะประสิทธิ์. 2522. ผลของอาหารผสมซึ่งมีระดับโปรตีนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการ
เจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ, น. 86 ใน รายงานประจำปีหน่วยอาหารกุ้งและปลา.
งานทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง. กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

บุญอ้อม โคมทวี. 2550. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

ประจวบ หล้าอุบล. 2543. อดีต-อนาคตกุ้งไทย, น.1-67. ใน เสวนาวิชาการเรื่อง “กุ้ง”.
คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

ปรีชา เกียรติกระจาย. 2528. เคมีของเนื้อไม้. ภาควิชาวนผลิตภัณฑ์. คณะวนศาสตร์.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546ก. ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม. สัตว์น้ำ. 14(161):
109-112.

_____. 2546ข. ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม. สัตว์น้ำ. 14(162): 119-122.

พชรวดี เลหามงคลรักษ์, นนทวิทย์ อารีรัตน์, สุนทราภรณ์ ลิ่มสกุล และ สุริยัน รัชกิจจานุกิจ.

2549. การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*
Fabricius) น. 291-302. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ครั้งที่ 44 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรรณนิภา พรหมเพชร. 2547. การศึกษาการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) แบบ
พัฒนาด้วยน้ำความเค็มต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. **วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนนาม (Practical technology for *Litopenaeus vannamei* Culture)**. สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม่กาจีน, สมุทรปราการ.

Akao Y., N. Seki, Y. Nakagawa, H. Yi, K. Matsumoto, Y. Ito, K. Ito, M. Funaoka, W. Maruyama, M. Naoi and Y. Nozawa. 2004. A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Bioorg. Med. Chem.** 12: 4791-4801.

Bauchau, A. G. 1981. Crustacean, pp. 385-420. *In* N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley, eds. **Invertebrate Blood Cell**. Academic Press, London.

Baurhoo, B., L. Phillip, and C. A. Ruiz-Feria. 2007. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on Intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. **Poult. Sci.** 86: 1070-1078.

_____, C. A. Ruiz-Feria and X. Zhao. 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals. **Feed Sci. Technol.** 144: 175-184

Bell, T. A. and D. V. Lightner. 1984. IHHN virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 38: 185-194.

_____ and _____. 1988. **A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Bisaria, V. S. and T. Chose. 1981. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-103.

- Bondad, R. M. G., S. E. McGladdery, I. East and R. P. Subasinghe. 2001. **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. FAO Fisheries Technical Paper No. 402, Supplement 2, Rome.
- Brock, J. A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei***. The Oceanic Institute, Makapu Point, Honolulu, HI.
- Brock, J. A., R. Gose, D. V. Lightner and K. W. Hasson. 1995. **An Overview of Taura Syndrome, and Important Disease of *Penaeus vannamei***. pp. 84-94. In C. L. Browdy and J. S. Hopkins, eds. **Swimming through Troubled Water**. Proceedings of the special session on shrimp farming, World Aquaculture Society, Baton rouge.
- Brown, A. 1985. Review of lignin in biomass. **J. Appl. Biochem.** 7: 371-387.
- Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchandra, S. Direkbusaracom, U. Ekpanithanpong and C. Chantanachookin. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathol.** 28: 103-109.
- Burrell, V. G. Jr., J. Sample, C. Battey, and M. Y. Bobo. 1991. Concentration of *Vibrio vulnificus* in oysters, *Crassostrea virginica*, grown in ponds with Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Shellfish Res.** 10: 277.
- Cerenius, L. and K. Söderhäll. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunol. Rev.** 198: 116-126.
- Chantanachookin, C., S. Boonyaratpalin, J. Kasornchandra, S. Direkbusarakom, U. ekpanithanpong, K. Supamattaya, S. Sriuraitana and T. W. Flegel. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head disease. **Dis. Aquat. Org.** 17: 145-157.

- Cheshenko, N. and B. C. Herold. 2002. Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread. **J. Gen. Virol.** 83: 2247-2255.
- Chong, Y. C. and H. Loh. 1984. Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. **Singapore Vet.** 9: 51-56.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang and C. F. Lo. 1995. Pathology of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.** 23: 165-173.
- Couch, J. A. 1991. Baculoviridae; Nuclear polyhedrosis virus. Part 2. Nuclear polyhedrosis viruses of invertebrates other than insects, pp. 205-225. In J. R. Adam and J. R. Bonami, eds. **Atlas of Invertebrate Virus.** CRC Press, Boca Raton.
- Cowling, E. B. and T. K. Kirk. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. **Biotechnol. Bioeng.** 6: 95-123.
- Crowford, D. L. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 714-717.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World.** Osprey Books, Huntington, New York.
- Durand, S., D. V. Lightner and J. R. Bonami. 1998. Differentiation of BP-type baculovirus strains using *in situ* hybridization. **Dis. Aquat. Org.** 32: 237-239.
- _____, _____, L. M. Nunan, R. M. Redman, J. Mari and J. R. Bonami. 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 27: 59-66.

- Ebringer, L., L. Krizkova, J. Polonyi, J. Dobias and N. Lahitova. 2003. Antimutagenicity of lignin in vitro. **Anticancer Res.** 47: 569-572.
- Eggeling, L. 1983. Lignin-an exceptional biopolymer and a rich resource. **Trends in Biotechnol.** 1: 123-127.
- Emmerik, M., E. Dwin, Y. Ugcha, J. Luzardo, F. Castro, G. Leclercq, J. Rodriguez, P. Miranda, O. Borja, J. Serrano, M. Terreros, K. Monpalvo, A. Narvaez, N. Tenorio, V. Cedeno, E. Mialhe and V. Boulo. 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 219: 57-70.
- Evans, C. 1987. Lignin degradation. **Process Biochem.** 22: 102-104.
- Flegel, T.W., L. Nielsen and W. Sang-oum. 2003. **Outbreaks of Taura Syndrome Virus (TSV) with Exotic *Penaeus vannamei* Cultivated in Thailand. JSPS-NRCT International Symposium on Faculty of Fishery.** Kasetsart University, Bangkok, Rayong, Thailand.
- _____, S. Boonyaratpalin and B. Withyachumnarnkul. 1997. **Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand**, pp. 285-296. *In* T. W. Flegel and I.H. MacRae, eds. **Diseases in Asian Aquaculture III.** Fish Health Secion, Asian Fisheries Society, Manila.
- Fittipaldi, A. and M. Giacca. 2005. Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. **AdV. Drug DeliVery ReV.** 57: 597-608.
- Fontaine, C. T. and D. V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-19.

- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson and F. Brown. 1991. **Classification and Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Arch. Virol. (Suppl. 2).** Springer-Vienna, Australia, New York.
- Frelie, P. E., J. K. Loy. and B. Kruppenbach. 1993. Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. **J. Invertebr. Pathol.** 61: 44-48.
- _____, _____, A. L. Lawrence, W. A. Bray and G. W. Brumbaugh. 1994. **U.S. Marine Shrimp Farming Program 10th Anniversary Review, Gulf Coast Research Laboratory Special Publication No. 1.** Ocean Spring, Mississippi.
- Gallay, P. 2004. Syndecans and HIV-1 pathogenesis. **Microbes Infect.** 6: 617-622.
- Garza, J. R., K. W. Hasson, B. T. Poulos, R. M. Redman, B. L. White and D. V. Lightner. 1997. Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. **J. Aquatic Animal Health.** 9: 156-159.
- 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 (*Artemis franciscans*). **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2318-2322.
- Grey, D. L., W. Dall and A. Baker. 1983. **A Guide to the Australian Penaeid Prawns.** The Department of Primary Production of the Northern Territory, Australia.
- Hasson, K. W., D. V. Lightner, B. T. Poulos, R. M. Redman, B. L. White, J. A. Brock and J. R. Bonami. 1995. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral aetiology. **Dis. Aquat. Org.** 23: 115-126.

Herold, B. C., R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt and P. G. Spear. 1994.

Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. **J. Gen. Virol.** 75: 1211-1222.

Holthuis, L. B. 1980. **Animal Tissue Techniques**. 4th ed. W.H. Freeman and Company San Francisco.

Hose, J. E., G. E. Martin, and A. A. Gerard. 1990. A dacapoda hemocyte classification scheme integrating morphology cytochemistry and function. **Biol. Bull.** 178: 53-45.

Hu, C. and B. Tao. 2000. Penaeid shrimp vibriosis and immune prevention: a review. **Tropic Oceanol. Redai Haiyang.** 19: 84-94.

Ikeda, M., H. Sakagami and K. Konno. 1988. Spontaneous production of differentiation-inducing factor(s) by mouse macrophage-like cell line J774.1, and the stimulation of its production by antitumor polysaccharide fractions of pine cone extract (in Japanese). **Show. Med. J.** 48, 449-454.

Ichimura, T., T. Otake, H. Mori and S. Maruyama. 1999. HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble lignin-like substances. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 63(12): 2202-2204.

Iversen, E. and K. Hale. 1992. **Aquaculture Sourcebook. A Guide to North American Species**. 1st ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

Jimenez, R., L. Barniol, L. de Barniol and M. Machuca. 2000. Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. **Dis. Aquat. Org.** 42: 91-99.

Johansson, M. W. and K. Söderhäll. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. **J. Comp. Physiol. B.** 156: 175-181.

- Johnson, S. K. 1989. Digestive gland manifestation, p. 16. *In* **Handbook of Shrimp Diseases**. Sea Grant College Program, Texas A&M University, Galveston.
- Kirk, T. K. and D. Cullen. 1988. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. pp. 273-307. *In* **Environmental Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. Academic press.
- Klein, J. 1982. **Immunology: The Science of Self-nonsel Discrimination**. USA: A Wiley interscience publication.
- Khanam, L. A. M., D. Talukder and M. A. Hye. 2006. Toxic and repellent action of sugarcane bagasse-based lignin against some stored grain insect pests. **Univ. j. zool. Rajshahi Univ.** 25. 27-30.
- Labaj, J., D. Slamenova and B. Kosikova. 2003. Reduction of genotoxic effects of the carcinogen N-methyl-N0-nitro-nitrosoguanidine by dietary lignin in mammalian cells cultured in vitro. **Nutr. Cancer** 47: 95-103.
- Labric, L. 2001. **Effect of Methylparathion on the Susceptibility of Shrimp to Bacterial Challenge**. Toulouse France Ecole Natl. Veterinaire ENVT 2001.
- Lackie, A. M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology** 80: 393-412.
- Lai, P.K., J. Donovan, H. Takayama, H. Sakagami, A. Tanaka, K. Konno and M. Nonoyama. 1990. Modification of human immunodeficiency viral replication by pine cone extracts. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. 6: 205-217.
- Lightner, D. V. 1983. **Disease of Culture Penaeid Shrimp**, pp. 289-485. *In* J. P. McVey, ed. **Handbook of Mariculture, Vol. I Crustacean Aquaculture**. CRC Press, Boca Raton. Florida.

Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp, pp. 393-486. *In* J. P. McVey, ed. **CRC Handbook of Mariculture**, 2nd ed., vol. 1, Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

_____, 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.

_____, R. M. Redman, B. T. Poulos, L. M. Nunan, J. L. Mari and K. W. Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.** 16: 146-160.

_____ and _____. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. **J. Invertebr. Pathol.** 38: 299-302.

_____ and _____. 1992. Geographic distribution, hosts and diagnostic procedures for the penaeid virus diseases of concern to shrimp culturists in the Americas, pp. 573-592. *In* A. W. Fast and L. J. Lester, eds. **Culture of Marine Shrimp: Principals and Practices**. Elsevier, Amsterdam.

_____, _____ and J. R. Bonami. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **Dis. Aquat. Org.** 13: 235-239.

_____ and _____. 1994. An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. **Aquaculture** 122: 9-18.

_____ and _____. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture** 164: 201-220.

- Limsuwan, C. 2003. The Taura syndrome virus situation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture in Thailand. **The AAHRI Newsletter**. 12: 1-2.
- Loomis, T. A. and R. E. Beyer. 1953. Heparin-like anticoagulant action of sulfonated lignins from commercial waste sulfite liquor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 109: 21-25.
- Lotz, J. M. 1997. Effect of host size on virulent of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). **Dis. Aquat. Org.** 30: 45-51.
- Lu, Y., L. M., Tapay, J. A. Brock and P. C. Loh. 1994. Infection of the yellow head baculovirus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). **J. Fish Dis.** 17: 649-656.
- Luscombe, D. K., and P. J. Nicholls. 1973. Acute and subacute oral toxicity of AHR-2438B, a purified sodium lignosulphonate, in rats. **Fd Cosmet. Toxicol.** 11: 229-237.
- Mari, J., J. R. Bonami and D. V. Lightner. 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. **Dis. Aquat. Org.** 33: 7-11.
- _____, _____, B. Poulos and D. V. Lightner. 1993. Preliminary characterization and partial cloning of the genome of baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV=MBV). **Dis. Aquat. Org.** 16: 207-215.
- Martin, G. G. and B. L. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. **J. Morphol.** 185: 339-349.
- _____, G., D. Poole, C. Poole, J.e. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Inver. Pathol.** 62: 308-315.

- Mayo, M. A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Arch. Virol.** 147: 1655-1656. *Cited* J. A. Cowley, C. M. Dimmock, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and P. J. Walker. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill associated-virus from Australia are closely related but distinct prawn virus. **Dis. Aquat. Org.** 36: 153-157.
- Mikulski, C. M., L. E. Burnett and K. G. Burnett. 2000. The effects of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Shellfish Res.** 19: 301-311.
- Mohney, L. L., D. V. Lightner and T. A. Bell. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). **World Aquacult. Soc.** 25: 116-125.
- Moss, S. M., B. R. LeaMaster and J. N. Sweeney. 2000. Relation abundance and species composition of Gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. **J. World Aquac. Soc.** 31: 255-263.
- Nakashima H., T. Murakami, N. Yamamoto, T. Naoe, Y. Kawazoe, K. Konno and H. Sakagami. 1992. Lignified materials as medicinal resources. V. Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of some synthetic lignins. **Chem. Pharm. Bull.** 40: 2102-2105.
- Nash, G., A. Akarajamorn and B. Withyachumnarnkul. 1995. Histology and rapid haemocytic diagnosis of yellow-head disease in *Penaeus monodon*, pp. 89-98. *In* M. Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Arthur, eds. **Diseases in Asian Aquaculture II**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

- Nash, G., C. Nithimathachoke, C. Tungmandi, A. Arkarjamom, P. Prathanpipat and P. Ruamthvesub. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand, pp. 143-155. In M. Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Arthur, eds. **Proceedings of First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Norkrans, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. **Adv. Appl. Microbiol.** 9: 91-215.
- Nunan, L.M. and D.V. Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **J. Virol. Meth.** 63: 193-201.
- Overstreet, R. M., D. V. Lightner, K. W. Hasson, S. McIlwain and J. M. Lotz. 1997. Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the Southeastern United States. **J. Invertebr. Pathol.** 69: 165-176.
- Perazzolo, L. M. and M. A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Peneaus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Persson, M., A. Ver and K. Söderhäll. 1987. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by seprated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. **Cell. Tiss. Res.** 247: 409-415.
- Perez-Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World, Keys and Diagnoses for the Families and Genera**. Memories du Museum National D'Histoire Naturelle, Paris.
- Raghuraman, A., V. Tiwari, Q. Zhao, D. Shukla, A. K. Debnath and U. R. Desai. 2007. Viral inhibition studies on sulfated Lignin, a chemically modified biopolymer and a potential mimic of heparan sulfate. **Biomacromolecules.** 8: 1759-1763.

- Ratcliffe, N. A., A. F. Rowley, S. W. Fitzgerald and C. P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytol.** 97: 183-350.
- Reed, L. J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.** 27: 493-497
- Roald, S. O. 1977. Acute toxicity of lignosulphonates on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 17(6): 702-706.
- Robertson, P. A. W., J. Calderon, L. Carrera, J. R. Stark, M. Zherdmant and B. Austin. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infection in *Penaeus vannamei* larvae. **Dis. Aquat. Org.** 32: 151-155.
- Rosenberry, B. 1997. **World Shrimp Farming 1997**. Shrimp News International, San Diego.
- Sakagami, H., A. Utsumi, S. Fujinaga, M. Takeda, T. Naoe and Y. Kawazoe. 1993. Stimulation of iodination and cytokine production by dehydrogenation polymers of henylpropenoids. **Anticancer Res.** 13: 1001-1006.
- Sakagami, H., K. Asano, T. Yoshida and Y. Kawazoe. 1999. Organ distribution and toxicity of lignin. **In Vivo.** 13(1): 41-44.
- _____, K. Hashimoto, F. Suzuki, T. Ogiwara, K. Satoh, H. Ito, T. Hatano, Y. Takashi and S. Fujisawa. 2005. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. **Phytochemistry** 66: 2108-2120.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor laboratory press. N. Y.

- Shukla, D. J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg and P. G. Spear. 1999. A novel role for 3-*O*-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell** 99: 13-22.
- Shukla, D. and P. G. Spear. 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **J. Clin. Invest.** 108: 503-510.
- Sindermann, C. J. 1990. **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Vol. 2.** 2nd ed. Academic Press, New York.
- Slaminková, Z., V. Revajová, M. Levkut, L. Leng and R. Bořutová. 2009. Influence of deoxynivalenol and lignin on lymphocyte subpopulations in blood and intestinal mucosa in chickens. **Folia Vet.** 53(1): 53-55.
- Smith, V. and K. Söderhäll. 1983. β -1,3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vivo*. **Bio. Bull.** 164: 299-314.
- Söderhäll, K. and V. J. Smith. 1986. Prophenoloxidase-activation cascade as a recognition system in arthropod, pp. 251-258. In A. P. Gupta, ed. **Hemolytic and Humoral Immunity in Arthropods.** John Wiley & Sons, Inc., New York.
- _____ and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis.** 2: 3-23.
- _____ and _____. 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10: 23-28.
- _____, _____ and M. W. Johansson. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 712: 155-161.

- Sorimachi, K., A. Niwa, S. Yamazaki, S. Toda and Y. Yasumura. 1990a. Anti-viral activity of water-solubilized lignin derivatives *in vitro*. **Agric. Biol. Chem.** 53: 1337-1339.
- _____, K. Akimoto, S. Yamazaki, A. Niwa, S. Toda and Y. Yasumura. 1990b. Multinucleation of macrophages with water-solubilized lignin derivatives *in Vitro*. **Cell Struct Funct.** 15(5): 317-322.
- Spear P. G., R. J. Eisenberg and G. H. Cohen. 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. **Virology** 275: 1-8.
- _____. 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell. Microbiol.** 6: 401-410.
- Sritunyalucksana, K. and K. Söderhäll. 2000. The proPO and clotting system in crustacean. **Aquaculture** 191: 53-69.
- Stuck, C. and M. Overstreet. 1994. Effect of baculovirus penaeid on growth and survival of experimentally infected postlarvae of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Inverteb. Pathol.** 64: 18-25
- Sukhumsirichart, W., C. Wongteerasupaya, V. Boonseang, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. **Dis. Aquat. Org.** 38: 1-10.
- Sung, H., Y. L. Yung and Y. L. Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16: 278-284.

- Suzuki, F., H. Okayasu, M. Tashiro, K. Hashimoto, Y. Yokote, K. Akahane, S. Hongo and H. Sakagami. 2002. Effect of lignins and their precursors on nitric oxide, citrulline and asparagine production by mouse macrophage-like cells Raw 264.7. **Anticancer Res.** 22: 2719-2724.
- _____, M. Tashiro, K. Hashimoto, Y. Yokote, K. Akahane and H. Sakagami. 2002. Stimulation of arginine consumption and asparagine production in LPS-activated macrophages. **Anticancer Res.** 22: 203-210.
- Suzuki, H., K. Iiyama, A. Okubo, S. Yamazaki and S. Toda. 1989a. Lignosulfonate from waste liquor of pulping process activates murine macrophages and causes proliferation of bone marrow cells. **Agric. Biol. Chem.** 53: 1197-1199.
- _____, T. S. Tochikura, K. Iiyama, S. Yamazaki, N. Yamamoto and S. Toda. 1989b. Lignosulfonate, a water-solubilized lignin from the waste liquor of the pulping Process, inhibits the infectivity and cytopathic effects human immunodeficiency virus *in vitro*. **Agric. Biol. Chem.** 53: 3369-3372.
- _____, A. Okubo, S. Yamazaki, K. Suzuki, H. Mitsuya and S. Toda. 1989c. Inhibition of infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* Mycelia (LEM). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 160: 367-373.
- _____, K. Iiyama, O. Yoshida, S. Yamazaki, N. Yamamoto and S. Toda. 1990. Structural Characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *lentinus edodes* mycelia (LEM). **Agric. Biol. Chem.** 54: 479-487.

- Takahashi, Y., Y. Shimoyama and K. Momoyama. 1985. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from diseased postlarvae of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 51: 721-730.
- Tang, K. F. and D. V. Lightner. 1999. A yellow head virus probe: nucleotide sequence and application to in situ hybridization. **Dis. Aquat. Org.** 35: 165-173.
- _____ and _____. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Dis. Aquat. Org.** 44: 79-85.
- Tiwari, V., C. Clement, M. B. Duncan, J. Chen, J. Liu, D. Shukla. 2004. A role for 3-O-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1. **J. Gen. Virol.** 85: 805-809.
- Tseng, W. Y. 1987. **Shrimp Mariculture, A Practical Manual.** Department of Fisheries, The university of Papua New Guinea, Port Moresby, Papua New Guinea.
- Tu, C., H. Huang, S. Chuang, J. Hsu, S. Kuo, N. Li, T. Hsu, M. Li and S. Lin. 1999. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* culture in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.** 38: 159-161.
- Ugolini, S., I. Mondor and Q. Sattentau. 1999. HIV-1 attachment: another look. **J. Trends Microbiol.** 7: 144-149.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular response. **J. Mar. Biotechnol.** 3: 153-156.

- _____, P. Hinojosa – Baltazar, G.P. Clark and F. Magallon – Barajas. 1998.
Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis*
Holmes, prophenoloxidase system. **Aquacult. Res.** 29(8): 549-553.
- Wassenberg, T. J. and B. J. Hill. 1987. Natural diet of the tiger prawns *Penaeus esculentus* and
P. semisulcatus. **Aus. J. Mar. Freshwater Res.** 38: 169-182.
- Whetstone, J. M., G. D. Treece, C. L. Browdy and A. D. Stokes. 2002. **Opportunities and
Constraints in Marine Shrimp Farming**. SRAC Publication No. 2600.
- Wilson, K. W. 1974. Toxicity testing for ranking oils and oil dispersants, pp. 11-22. *In* L. R.
Beyon and E. B. Cowell. eds. **Ecological aspects of toxicity testing of oils and
dispersants**. British Petroleum Co. Ltd., London.
- Wongteerasupaya, C., S. Wongwisansri, V. Boonsaeng, S. Panyim, P. Pratanpipat, G. Nash,
B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel. 1996. DNA fragment of *Penaeus monodon*
baculovirus PmNoBII gives positive *in situ* hybridization with viral infections in six
penaeid shrimp species. **Aquaculture** 143: 23-32.
- _____, J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. Nash, A. Akarajamorn, V. Boosaeng,
S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel. 1995.
A nonoccluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal
origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat.
Org.** 21: 69-77.
- Yu, C. I. and S. C. Lin. 2002. Outbreak of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus
vannamei* culture in Taiwan. **Fish Pathol.** 35: 21-24.

Zhang Y., P. Pui-Hay But, V. Eng-Choon Ooi, H. X. Xu, G. D. Delaney, S. H. S. Lee and S. F. Lee. 2007. Chemical properties, mode of action, and *in vivo* anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. **Antivir. Res.** 75: 242-249.





สารเคมีในการวิเคราะห์ Phagocytic index activity

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant)

ใช้ 10% Sodium citrate ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI

2. สารละลาย Shrimp saline

NaCl	28.40	กรัม
MgCl ₂ .7H ₂ O	10.00	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.00	กรัม
CaCl ₂ .H ₂ O	2.25	กรัม
KCl	0.70	กรัม
Glucose	1.00	กรัม
Hepes	2.38	กรัม

ผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3. Heat – killed yeast

3.1 นำ Baker's yeast 0.5 กรัมมาละลายใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl 250 มิลลิลิตร แล้วต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2 หลังจากนั้นทำการล้างด้วย Shrimp saline ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที 5 ครั้ง

3.3 นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ละลายด้วย Shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อและสารเคมีต่างๆ

1. การเตรียมสารละลาย Davison's fixative สำหรับ 1 ลิตร

- 1.1 Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ 330 มิลลิลิตร
- 1.2 Formalin 100 เปอร์เซ็นต์ 220 มิลลิลิตร
- 1.3 Glacial acetic acid 115 มิลลิลิตร
- 1.4 น้ำกลั่น 335 มิลลิลิตร
- 1.5 ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. ขั้นตอนของขบวนการดิ่งน้ำออกจากเซลล์โดยเครื่อง Automatic tissue processor

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	alcohol 50 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
2	alcohol 70 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
3	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
4	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
5	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
6	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
7	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
8	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	0.5-1
9	chloroform I	1
10	chloroform II	1.5
11	paraplast I	1.5
12	paraplast II	2

3. ขั้นตอนการย้อมสไลด์

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Xylene	5
2	Xylene	4
3	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	1
4	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	1
5	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	ล้างน้ำ	2
8	Hematoxylin	2
9	ล้างน้ำ	2
10	Blueing Solution (Dilute)	จุ่ม10-20 ครั้ง
11	ล้างน้ำ	1
12	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	จุ่ม10-20 ครั้ง
13	Eosin	1
14	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	0.15
15	alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	0.15
16	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	1
17	alcohol 100 เปอร์เซ็นต์	1
18	Xylene	1
19	Xylene	2
20	Xylene	2

ผล นิวเคลียส ติดสีน้ำเงิน

ไซโตพลาสซึม เป็นสีชมพูถึงแดง

ตารางผนวกที่ 1 การตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดสารละลายลิควินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลองเบื้องต้น

ความเข้มข้น ของสารละลายลิควิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนกุ้ง ขาว (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (%)				
		12	24	48	72	96
		ชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง
0 (0.85 NaCl)	10	0	0	0	0	0
50	10	0	0	0	0	0
100	10	0	0	0	0	0
150	10	10	10	10	10	10
200	10	70	70	70	70	70
250	10	80	80	80	80	80
300	10	80	100	100	100	100

ตารางผนวกที่ 2 การตายสะสมของกุ้งขาวที่ฉีดสารละลายลิควินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการทดลองขั้นละเอียด

ความเข้มข้น ของสารละลายลิควิน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนกุ้ง ขาว (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตายสะสม (%)				
		12	24	48	72	96
		ชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง	ชั่วโมง
0 (0.85 NaCl)	30	0	0	0	0	0
100	30	10	10	16.67	20	26.67
130	30	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
175	30	23.33	23.33	23.33	23.33	23.33
230	30	46.67	46.67	46.67	46.67	46.67
300	30	66.67	66.67	66.67	66.67	66.67

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์หาค่า LD₅₀ ตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

Concentration (mg/l)	Log dose	n	Number dead	Number alive	Accumulate dead	Accumulate alive	Total	Cumulative
100	2.00	30	8	22	8	99	107	7.477
130	2.12	30	2	28	10	77	87	11.494
175	2.24	30	7	23	17	49	66	25.758
230	2.36	30	14	16	31	26	57	54.386
300	2.47	30	20	10	51	10	61	83.607

$$\begin{aligned}
 LD_{50} &= \log \text{conc. Below 50\% mortality} + \left\{ \frac{50 - \text{mor. below 50\%}}{\text{mor. above 50\%} - \text{mor. below 50\%}} \right\} \times \left\{ \log \text{conc. above 50\%} - \log \text{conc. below 50\%} \right\} \\
 &= 2.24 + \left\{ \frac{(50.000 - 25.758)}{(54.386 - 25.758)} \times [2.36 - 2.24] \right\} \\
 &= 2.3416 \\
 &= 220 \text{ mg/l}
 \end{aligned}$$

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน
(Mean±S.D.)

ชุดการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (x10 ⁶ cells/ml)			
	วันที่ 0 ของการทดลอง	วันที่ 3 ของการทดลอง	วันที่ 7 ของการทดลอง	วันที่ 14 ของการทดลอง
ชุดควบคุม	4.01 ± 1.56 ^a	4.55 ± 1.52 ^a	5.18 ± 1.25 ^{ab}	4.85 ± 3.00 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 1 g/kg	4.02 ± 0.45 ^a	3.55 ± 0.79 ^a	7.62 ± 1.28 ^a	5.42 ± 2.47 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 3 g/kg	3.52 ± 2.92 ^a	4.02 ± 1.60 ^a	3.38 ± 1.93 ^b	5.13 ± 0.70 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 5 g/kg	5.60 ± 1.79 ^a	6.27 ± 3.24 ^a	3.67 ± 1.63 ^b	4.37 ± 2.42 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 10 g/kg	4.90 ± 0.91 ^a	4.55 ± 1.97 ^a	6.17 ± 1.10 ^{ab}	8.07 ± 0.73 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยพยัญชนะภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 5 เปอร์เซ็นต์ Phagocytosis ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน
(Mean±S.D.)

ชุดทดลอง	Phagocytosis (%)			
	วันที่ 0 ของการทดลอง	วันที่ 3 ของการทดลอง	วันที่ 7 ของการทดลอง	วันที่ 14 ของการทดลอง
ชุดควบคุม	40.71 ± 12.69 ^a	39.62 ± 4.29 ^a	44.05 ± 11.60 ^a	37.78 ± 8.18 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 1 g/kg	33.33 ± 6.51 ^a	53.37 ± 10.67 ^{ab}	58.11 ± 16.42 ^a	62.74 ± 7.50 ^b
ผสมสารลิกนินในอาหาร 3 g/kg	35.28 ± 7.47 ^a	41.53 ± 2.25 ^a	51.81 ± 3.32 ^a	62.58 ± 1.51 ^b
ผสมสารลิกนินในอาหาร 5 g/kg	42.55 ± 3.99 ^a	44.37 ± 4.62 ^a	57.58 ± 10.71 ^a	57.13 ± 4.49 ^b
ผสมสารลิกนินในอาหาร 10 g/kg	49.93 ± 13.79 ^a	63.95 ± 19.15 ^b	72.50 ± 9.19 ^a	77.91 ± 4.87 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยพยัญชนะภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 6 Phagocytic Index ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารลิกนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน (Mean±S.D.)

ชุดทดลอง	Phagocytic Index			
	วันที่ 0 ของการทดลอง	วันที่ 3 ของการทดลอง	วันที่ 7 ของการทดลอง	วันที่ 14 ของการทดลอง
ชุดควบคุม	23.05 ± 2.47 ^a	24.80 ± 1.55 ^a	27.00 ± 3.43 ^a	19.06 ± 6.59 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 1 g/kg	14.99 ± 3.88 ^a	36.35 ± 18.58 ^a	44.92 ± 16.60 ^a	49.15 ± 1.33 ^{bc}
ผสมสารลิกนินในอาหาร 3 g/kg	18.74 ± 8.68 ^a	21.44 ± 3.68 ^a	30.06 ± 2.99 ^a	44.81 ± 3.87 ^b
ผสมสารลิกนินในอาหาร 5 g/kg	16.24 ± 3.84 ^a	23.49 ± 0.47 ^a	37.18 ± 17.22 ^a	43.92 ± 9.33 ^b
ผสมสารลิกนินในอาหาร 10 g/kg	22.89 ± 15.85 ^a	31.63 ± 24.63 ^a	39.40 ± 12.42 ^a	60.67 ± 7.29 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยพยัญชนะภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 7 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากกินอาหารที่ผสมสารลิกนินในความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 และ 148 ชั่วโมง ตามลำดับ (Mean±S.D.)

ชุดทดลอง	อัตราการตายสะสมของกุ้งขาว (ตัว)						
	เริ่มต้น การทดลอง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง	148 ชั่วโมง
ชุดควบคุม	0.00 ± 0 ^a	6.67 ± 5.77 ^a	6.67 ± 5.77 ^a	30.00 ± 26.46 ^a	83.33 ± 5.77 ^a	100.00 ± 0 ^a	100.00 ± 0 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 1 g/kg	0.00 ± 0 ^a	0.00 ± 0 ^a	0.00 ± 0 ^a	40.00 ± 10.00 ^a	60.00 ± 17.32 ^a	80.00 ± 0 ^{ab}	96.67 ± 5.77 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 3 g/kg	0.00 ± 0 ^a	6.67 ± 5.77 ^a	10.00 ± 0 ^a	13.33 ± 5.77 ^a	53.33 ± 20.82 ^a	90.00 ± 10.00 ^{ab}	93.33 ± 5.77 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 5 g/kg	0.00 ± 0 ^a	0.00 ± 0 ^a	0.00 ± 0 ^a	23.33 ± 15.28 ^a	40.00 ± 26.46 ^a	73.33 ± 15.28 ^b	93.33 ± 5.77 ^a
ผสมสารลิกนินในอาหาร 10 g/kg	0.00 ± 0 ^a	3.33 ± 5.77 ^a	3.33 ± 5.77 ^a	10.00 ± 10.00 ^a	73.33 ± 5.77 ^a	93.33 ± 5.77 ^{ab}	93.33 ± 5.77 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยพยัญชนะภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสคริปต์เดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวกที่ 8 อัตราการตายสะสมของกุ้งขาวเมื่อได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผสมกับสารลิกนินในหลอดทดลอง (*in vitro*) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นาน 20 วัน

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของกุ้งขาว (%)									
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
C-	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	3.3 ± 5.8^a	3.3 ± 5.8^a	6.7 ± 5.8^a	6.7 ± 5.8^a	6.7 ± 5.8^a	6.7 ± 5.8^a	6.7 ± 5.8^a
C+	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	3.3 ± 5.8^a	10.0 ± 10^a	43.3 ± 5.8^b	80.0 ± 10^b	93.3 ± 5.8^b	100 ± 0^b	100 ± 0^c	100 ± 0^c
T1	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	13.3 ± 15.3^a	26.7 ± 28.9^a	26.7 ± 28.9^a	26.7 ± 25.2^a	36.7 ± 25.2^b	43.3 ± 25.2^b
T2	3.3 ± 5.8^a	10.0 ± 10^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	16.7 ± 15.3^a	20.0 ± 10^{ab}	23.3 ± 11.5^{ab}
T3	0.0 ± 0^a	10.0 ± 17.3^a	10.0 ± 17.3^a	10 ± 17.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^a	13.3 ± 15.3^{ab}	13.3 ± 15.3^a
T4	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	0.0 ± 0^a	3.3 ± 5.8^a	13.3 ± 11.5^a	13.3 ± 11.5^a	13.3 ± 11.5^{ab}	16.7 ± 15.3^{ab}

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	เปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมของกุ้งขาว (%)									
	วันที่ 11	วันที่ 12	วันที่ 13	วันที่ 14	วันที่ 15	วันที่ 16	วันที่ 17	วันที่ 18	วันที่ 19	วันที่ 20
C-	10.0 ± 5.8 ^a	13.3 ± 5.8 ^a	13.3 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a	16.7 ± 5.8 ^a
C+	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^b
T1	46.7 ± 20.8 ^b	46.7 ± 20.8 ^b	63.3 ± 11.5 ^b	70 ± 17.3 ^b	73.3 ± 11.5 ^b	73.3 ± 11.5 ^b	73.3 ± 11.5 ^b	73.3 ± 11.5 ^b	73.3 ± 11.5 ^b	80.0 ± 20.0 ^b
T2	23.3 ± 11.2 ^{ab}	23.3 ± 11.2 ^{ab}	23.3 ± 11.2 ^a	26.7 ± 15.3 ^a	26.7 ± 15.3 ^a	26.7 ± 15.3 ^a	26.7 ± 15.3 ^a	26.7 ± 15.3 ^a	26.7 ± 15.3 ^a	26.7 ± 15.3 ^a
T3	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a	13.3 ± 15.3 ^a
T4	20 ± 17.3 ^a	20 ± 17.3 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a	23.3 ± 11.5 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยพยัญชนะภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

C- คือ กลุ่มทดลองที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มควบคุมผลลบ)

C+ คือ กลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขาวตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง (กลุ่มควบคุมผลบวก)

T1-T4 คือ กลุ่มทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองผสมกับสารละลายลิควินความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายสุวินัย ปานขาว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 30 พฤษภาคม 2524
สถานที่เกิด	จ. ลพบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-