สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ผลของการใช้สารสกัดจากโพธิ์ทะเล ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำ

Effects of Extract from *Thespesia populnea* Solandex Correa on Growth Inhibition of *Vibrio harveyi* and Disease Resistance of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)

RCH
SH
380.6
ว116ส

โดย

นางสาวดวงใจ กิตติปรีชากุล
นางสาวมนต์สรวง ยางทอง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 64429
วัน,เดือน,ปี 11 ก.ย. 2549

b 11648624
i.....

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

2548

ผลของการใช้สารสกัดจากโพธิ์ทะเล ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำ

ดวงใจ กิตติปรีชากุล และ มนต์สรวง ยางทอง

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้ ชุดการทดลองแรกเป็นชุดที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลเท่ากับ 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 และ 3,000 ppm ส่วนอีกชุดการทดลองเป็นชุดควบคุมใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยทุกชุดการทดลองใส่เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ $1x10^7$ CFU/ml โดยใช้อัตราส่วนของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1:1 หลังจากบ่มไว้ 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียโดยวิธีการกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS agar) ผลการศึกษาพบว่าปริมาณแบคทีเรียในชุดที่ใส่สารสกัดทุกระดับความเข้มข้นลดลงหลังจากบ่ม 3 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลมีสารที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ สำหรับการศึกษาผลของสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลต่อความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ โดยทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับ 0, 1,000, 2,000 และ 3,000 ppm เป็นเวลา 60 วัน ได้กุ้งน้ำหนักเฉลี่ย 11.07 กรัม หลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อลำตัวเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับ 3,000 ppm มีอัตรารอดสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเล ($P<0.05$) แต่ในช่วงเวลา 48 – 168 ชั่วโมง อัตรารอดของกุ้งกุลาดำทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งจากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลสามารถต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำได้ แต่ควรเพิ่มระยะเวลาการให้อาหารผสมสารสกัดที่ระดับ 3,000 ppm ให้มากกว่า 60 วัน เพื่อเพิ่มอัตราการสะสมของสารสกัดในตัวกุ้งให้มากขึ้น

Effects of Extract from *Thespesia populnea* Solandex Correa on Growth Inhibition of *Vibrio harveyi* and Disease Resistance of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)

Duangjai Kittipreechakul and Monsuang Yangthong

ABSTRACT

Effect of extract from *Thespesia populnea* Solandex Correa on growth inhibition of *Vibrio harveyi* . Experiment was designed to 2 treatments as following; treatment group containing five concentrations from *T. populnea* at 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 and 3,000 ppm. and control group was using 1.5% NaCl solution. Each trial were performed. Approximately 10^7 CFU/ml. Was inoculated into all treatments. Which ratio of extract per bacteria was 1:1. After incubation 3, 6, 9, 12 and 24 hours, total bacteria of counts were conducted by using spread – plate method on Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar). The number of bacteria at any concentration of extract from *T. populnea* were decreased after incubated 3 hours while control group were increased but the concentration at 3,000 ppm. was used, the number of bacteria colonies was the least. These results indicated that the crude extract from *T. populnea* contained antibacterial activity against *V. harveyi*.

Effect of extract from *T. populnea* on resistance to pathogenic bacteria *V. harveyi* was studied. Experimental shrimp were fed with diets containnig four concentrations of extract from *T. populnea* at 0, 1,000, 2,000 and 3,000 ppm. After sixty days of feeding, shrimps with average weigth of 11.07 gm. Were challenged by intramuscular injection of *V. harveyi* suspension. At 24 hours, the shrimps fed with diets containing concentration of extract from *T. populnea* at 3,000 ppm. showed significantly higher survival rate than control ($P<0.05$). But 48 – 168 hours, there were no significant differences of survival rate amongst any experimental and control group ($p>0.05$). Result from this study indicated that extract from *T. populnea* can disease resistance in

black tiger prawn if increase to fed with diets containing concentration of extract from *T. populnea* at 3,000 ppm. more sixty days for increase accumulate rate of extract in shrimps.

สารบาญ

หน้า

สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(3)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
อุปกรณ์	10
วิธีการทดลอง	12
ผลการทดลอง	18
วิจารณ์ผลการทดลอง	30
ข้อเสนอแนะ	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	35

สารบาญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดลอง 13

2 ปริมาณแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ที่ผสมกับสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา 19

3 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลระดับต่าง ๆ กันในการทดลองความต้านทานกับเชื้อ *V. harveyi* ระยะเวลา 168 ชั่วโมง 22

4 อัตรารอด $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับต่าง ๆ กัน ในการทดสอบความต้านทานกับเชื้อ *V. harveyi* 23

5 สมบัติของน้ำ (ค่าเฉลี่ย) ก่อนการทดลอง และระหว่างการทดลองในระยะเวลา 60 วัน 25

6 สมบัติของน้ำ (ค่าเฉลี่ย) ก่อนการทดลองและระหว่างการทดลองในตู้กระจกในระยะเวลา 7 วัน 28

ตารางผนวกที่

1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* 43

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปริมาณแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ที่ผสมกับสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา	20

ภาพผนวกที่

1	ลักษณะใบโพธิ์ทะเลที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงละเอียด	45
2	เครื่องสกัดสาร (Evaporator)	46
3	ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)	47
4	อุปกรณ์ในการกระจายเชื้อแบคทีเรีย	48
5	ขั้นตอนการกรองสารสกัดด้สนเครื่องกรองสูญญากาศก่อนนำเข้าเครื่องสกัดสาร	49
6	การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในตู้กระจกเพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*	50
7	ขั้นตอนการฉีดเชื้อเข้าสู่กล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำเพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*	51

ผลของการใช้สารสกัดจากโพธิ์ทะเล ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำ

Effects of Extract from *Thespesia populnea* Solandex Correa on Growth Inhibition of *Vibrio harveyi* and Disease Resistance of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon* Fabricius)

คำนำ

จากปัญหาการส่งออกสินค้าสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำที่ผ่านมานั้น ประเทศไทยได้ประสบปัญหาเรื่องการตกค้างของยาและสารเคมีในเนื้อกุ้ง จนทำให้ต่างประเทศที่รับซื้อสินค้าของเรา หยุดการนำเข้ากุ้งกุลาดำจากประเทศไทยไประยะหนึ่งนั้น มีผลทำให้ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเกิดการเปลี่ยนแปลงครั้งใหญ่เพื่อที่จะสามารถส่งออกสินค้าอาหารไปต่างประเทศได้อีก โดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ซึ่งเป็นผู้ดูแลพื้นฐานทางด้านเกษตรของประเทศทั้งหมดร่วมกับหน่วยงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้มีการกำหนดมาตรการ "ห้ามใช้ยาหรือสารเคมีที่มีการตกค้างในเนื้อกุ้งแล้วมีผลต่อผู้บริโภค" ออกมาเพื่อควบคุมดูแลและแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ซึ่งการออกมาตรการดังกล่าวนั้นก็สามารถแก้ปัญหาการต่อต้านการนำเข้ากุ้งไทยของต่างประเทศได้ แต่ก็ส่งผลให้ผู้เลี้ยงกุ้งในปัจจุบันเลี้ยงกุ้งได้ยากขึ้น เนื่องด้วยสาเหตุจากการขยายตัวของพื้นที่การเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนทำให้สภาพแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เสื่อมลงทั้งทางด้านคุณภาพน้ำหรือคุณภาพดิน เกิดการสะสมของสารอินทรีย์จนเป็นแหล่งของเชื้อโรค เช่น *Vibrio* sp. ซึ่งในอดีตนั้นการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียก็จะใช้ยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ซึ่งก็ให้ผลในการรักษาที่ดี แต่ปัจจุบันได้มีมาตรการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ปัญหาการตกค้างดังกล่าวเกิดขึ้น ดังนั้นการหาวิธีการทางชีวภาพเพื่อจะแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นทั้งการตกค้างของยาและสารเคมีหรือการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียโดยการใช้สมุนไพร ก็เป็นวิธีหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับและให้ความสนใจมากในปัจจุบัน

โพธิ์ทะเลเป็นไม้ยืนต้น พบมากตามชายฝั่งทะเลหรือตามชายน้ำ ส่วนต่าง ๆ ของโพธิ์ทะเล เช่น ใบ ดอก ผล เปลือก จัดเป็นสมุนไพร ซึ่งคำว่า "สมุนไพร" ตามความหมายของพระราชบัญญัติยา หมายถึงยาที่ได้จากพืช สัตว์และแร่ธาตุ ซึ่งยังมิได้ผสมหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ โพธิ์ทะเลมีคุณสมบัติในการรักษาโรคผิวหนัง หิด แผลมีหนอง และ

โรคผิวหนังอื่น ๆ และมีสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งชนิดแกรมบวก (Gram positive) และแกรมลบ (Gram negative) โดยเฉพาะแบคทีเรียในลำไส้

ดังนั้นโพธิ์ทะเลน่าจะเป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่สามารถนำมารักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำเช่น *Vibrio* sp. ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแก้ปัญหาในเรื่องการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งได้ เนื่องจากสมุนไพรจัดว่าเป็นยาที่ป้องกันบำบัดรักษาโรคที่มีความปลอดภัยสูง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาบทบาทของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi*

2. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลที่ใช้ผสมในอาหารต่อความต้านทานเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

กุ้งสกุล *Penaeus* ได้ถูกบันทึกไว้ใน Official List of Generic Name in Zoology หมายเลข 498 โดย John Christ Fabricius เป็นผู้บรรยายลักษณะต่าง ๆ ไว้เป็นคนแรกในปี ค.ศ. 1798 ส่วนคำว่า *monodon* นั้น Holthuis เป็นผู้ใช้เรียกชนิดของกุ้งกุลาดำ แต่เดิมมีการแยกจนถึง subspecies คือ *Penaeus monodon manillensis* ต่อมาภายหลังพบว่า subspecies นี้เป็นลักษณะที่ผิดปกติของกุ้ง *Penaeus semisulcatus* จึงยกเลิกการใช้ subspecies ไป (SEAFDEC, 1988)

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ (SEAFDEC, 1988) มีดังนี้

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Suborder Natantia
Infraoder Penaeidea
Superfamily Penaeoidea
Family Penaeidae Rafinesque, 1815
Genus *Penaeus* Fabricius, 1798
Subgenus *Penaeus*
Species *monodon*

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Penaeus monodon* Fabricius, 1798

พฤติกรรมการกินอาหาร

การทราบถึงพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำ ในการเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นสิ่งที่ผู้เลี้ยงจะต้องหมั่นสังเกตอยู่ตลอดระยะการเลี้ยง เพราะพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำแต่ละชนิดนอกจากจะแตกต่างกันไป เช่น ปลาจะกินอาหารอย่างรวดเร็ว แต่กุ้งจะกินอาหารอย่างช้าๆ พฤติกรรมการกินอาหารในแต่ละวันก็เปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ กัน การเข้าใจถึงพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำจะทำให้ทราบถึงวิธีการให้อาหารสัตว์น้ำอันจะทำให้ผู้เลี้ยงประสบความสำเร็จในการเลี้ยง

กุ้งกุลาดำมีพฤติกรรมการกินอาหารดังนี้

1. กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ประเภทกินเนื้อ ชอบอาหารที่มีกลิ่นคาวโดยเฉพาะอาหารสด เช่น หอย ปลา หรือปลาหมึก แต่อย่างไรก็ตามสามารถฝึกให้กินอาหารสำเร็จรูปได้เป็นอย่างดี

2. ลักษณะการจับกินอาหารของกุ้งกุลาดำจะใช้ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ในการจับกินอาหารเข้าปาก ฉะนั้นอาหารจึงควรมีลักษณะเล็กและยาว และไม่แตกตัวง่าย แต่กุ้งกุลาดำวัยอ่อนจะกินอาหารโดยการกรอง

3. ปกติกุ้งกินอาหารบริเวณผิวหน้าดิน หรือพื้นทราย ไม่กินที่ผิวน้ำ ฉะนั้นอาหารจึงต้องจมน้ำได้อย่างรวดเร็ว แต่กุ้งกุลดำวัยอ่อนจะกินอาหารในบริเวณผิวน้ำ กลางน้ำ หรือหน้าดิน ฉะนั้นอาหารจะต้องไม่จมน้ำ

4. ในสภาพธรรมชาติกุ้งกุลาดำจะหากินในเวลากลางคืน แต่ผู้เลี้ยงสามารถฝึกให้กุ้งกินอาหารเวลากลางวันได้ และจะฝึกให้กินกี่มื้อต่อวันก็ได้ แต่กุ้งกุลาดำวัยอ่อนจะกินอาหารตลอดเวลาเพราะมีลำไส้สั้น และมีการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก Nauplius เป็น Postlarva

5. กุ้งไม่ใช้สัตว์สังคม จะมีพฤติกรรมที่หน้าดิน โดยแต่ละตัวแยกกันกินอาหารไม่ยอมให้กุ้งตัวอื่นมาแย่งอาหารเลย ฉะนั้นการให้อาหารกุ้งกุลาดำจึงต้องให้กุ้งแต่ละตัวมีโอกาสได้รับอาหารมากที่สุด ไม่แย่งกันเองโดยการหว่านรอบ ๆ บ่อ

6. กุ้งกุลาดำมีลำไส้สั้น และตรงอยู่แนวหลังลำตัว โดยความยาวลำไส้สั้นกว่าความยาวตัว (total length) ฉะนั้นจะต้องให้อาหารบ่อย ๆ วันละ 3 – 6 ครั้ง เพื่ออาหารจะได้ดูดซึมได้เต็มที่

7. หลังจากการลอกคราบใหม่ ๆ เปลือกกุ้งจะนิ่มในช่วงนี้กุ้งกุลาดำจะไม่กินอาหารหรือกินน้อยลง แต่เมื่อกุ้งเปลือกเริ่มแข็งก็จะกินอาหารมากขึ้น ฉะนั้นจะต้องมีการปรับปริมาณการให้อาหารตลอดเวลาการเลี้ยง (มะลิ, 2531)

<u>โพธิ์ทะเล</u>

โพธิ์ทะเลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Thespesia populnea* Solandex Correa ชื่อสามัญ Rose wood หรือ Tulip tree ชื่อวงศ์ Malvaceae (เสริมสิริ และคณะ,2542) โพธิ์ทะเลเป็นพันธุ์ไม้ที่มักขึ้นอยู่ตามชายฝั่งทะเลในประเทศเขตร้อน หรือ ในที่ ๆ น้ำทะเลท่วมถึง (วิทย์,2542) เป็นไม้ยืนต้นพบมากตามชายฝั่งทะเลอันดามัน และแหลมอินโดจีน หรือปลูกไว้ตามชายน้ำเพื่อเป็นไม้ประดับ ใบรูปหัวใจสีเขียวเข้ม ดอกสีเหลืองที่โคนกลีบมีสีม่วงแดง เมื่อโรยเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงทั้งดอก ผลเมื่อแก่เต็มที่แตกออก กลีบเลี้ยงอยู่คงทนจนกระทั่งเป็นผล เปลือกต้นมีสีเทาถึงสีน้ำตาล มักมีปุ่มยื่นออกมา (นิจศิริ และพยอม, 2534)

<u>สรรพคุณ</u>

ใบ ดอก ผล เปลือก ใช้รักษาโรคผิวหนัง หิด แผลมีหนอง และโรคผิวหนังอื่น ๆ ผลมีสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งชนิดแกรมบวก (Gram positive) และแกรมลบ (Gram negative) โดยเฉพาะแบคทีเรียในลำไส้ เมล็ดให้น้ำมันใช้ในโรคผิวหนัง ดอกและผลให้สีเหลืองละลายได้ในน้ำ ใช้ยอมไหมและไหมพรม (นิจศิริ และพยอม, 2534)

ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ต้านเชื้อรา, ต้านยีสต์, กระตุ้นการสร้าง interferon, ต้านไวรัส, ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้, ยับยั้งเอนไซม์ aminotransferase, ยับยั้งความเป็นพิษต่อตับ, ต้านมะเร็ง, มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง, ยับยั้งการเกาะของตัวอ่อนที่ผนังมดลูก (เสริมสิริ และคณะ ,2542)

การทดสอบความเป็นพิษพบว่า เมื่อฉีดสารสกัดจากผลหรือกิ่งด้วย 50% เอทานอล เข้าช่องท้องของหนูถีบจักร ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 มีค่าเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือมากกว่า 1 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (เสริมสิริ และคณะ, 2542)

<u>สารเคมีที่อยู่ในโพธิ์ทะเล</u>

β-carotene, ceryl alcohol, cyanidin-3-β-D-rutinoside, daucosterol, fixed oil, gossypetin, gossypol, herbacetin, herbacetin-7-O-β-glocoside, kaempferol, linoleic acid, lupenone, lupeol, mansonone C, mansonone D, mansonone E, mansonone F, myricyl alcohol, naphtho(1,8-B-C)-pyran-4,8-dione,2,3,5,6-tetrahydro, 7-hydroxy-3,6,9-trimethyl, n-nonacosane, oleic acid, palmitic acid, popunin, quercetin, quercitin-7-O-rhanoglucoside, sitosterol, thespesone (เสริมสิริ และคณะ, 2542)

<u>สมบัติของแบคทีเรียสกุล*Vibrio*</u>

Vibrio spp. เชื้อวิบริโอจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งตรง หรือโค้งเล็กน้อย ขนาด 1.2-4 x 0.3-1.0 ไมโครเมตร ปลายมน มี palar flagella เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลล่าที่อยู่บริเวณรอบลำตัว ลักษณะโคโลนีบน SWA สีไม่ขาวและขุ่น ลักษณะกลมนูนขอบเรียบ เป็นมันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1-3 มิลลิเมตร เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ที่ระดับพีเอช 6-9 และเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5-7.5 % ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของอาหาร มีคุณสมบัติพิเศษคือ ความสามารถในการ ferment carbohydrates

อาหารเลี้ยงเชื้อวิบริโออีกชนิดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการคือ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS) อาหารชนิดนี้เป็นอาหารแข็งที่เชื้อ *Vibrio* spp. เจริญได้ดีเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Selective media) วิบริโอที่เจริญบน TCBS จะมีสีเขียว (Non-sucrosefermenter) และสีเหลือง (Sucrose fermenter)

โรค Vibriosis

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Vibriosis ในกุ้งกุลาดำ เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งเคลื่อนไหวได้ ไม่สร้างสปอร์ ได้แก่สกุล *Vibrio* ซึ่งจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆ คือ *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* spp. แบคทีเรียดังกล่าวนี้พบได้ทั้งในน้ำทั่วไปและตะกอนต่างๆ เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้กุ้งเกิดอาการเครียด ร่างกายอ่อนแอ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ก็จะทำให้เกิดโรคต่อกุ้งได้ Johnson (1978) รายงานว่า การติดเชื้อแบคทีเรียในระบบเลือดและของเหลวภายในร่างกาย (body fluid) จะเกิดขึ้นหลังจากพบว่าสัตว์มีความอ่อนแอ เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

แบคทีเรียสามารถทำอันตรายต่อเปลือก เหงือก และระยางค์ต่าง ๆ ของกุ้งได้ โดยผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อย่อยไคตินที่เปลือกกุ้ง แล้วแพร่เชื้อไปในร่างกายหรืออาจเข้าไปทางบาดแผลที่กุ้งเป็นอยู่เดิม ทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า Shell disease, rust disease, black spot หรือ brown spot (Giorgetti, 1990; Lightner, 1977) โรคนี้ทำให้บริเวณเปลือกเหงือกหรือระยางค์ของกุ้งถูกทำลาย ทำให้เห็นเปลือกเป็นรอยแผลสีดำเกิดการสึกกร่อน บางครั้งเกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อใต้บริเวณรอยแผลดำนั้นด้วย (Johnson และ Lightner, 1988)

แบคทีเรียจะแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ของกุ้งทางระบบเลือด และของเหลวในร่างกาย ทำให้พบแบคทีเรียเป็นจำนวนมากในท่อเลือด กุ้งที่ป่วยจะมีอาการสีตัวจางลง กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น ซี่เหงือกมีสีดำ ไม่กินอาหาร มีการตอบสนองต่อสิ่งที่มากระตุ้นน้อยลง และการว่ายน้ำเสียสมดุลย์ไป กุ้งที่ป่วยจะขึ้นมาอยู่ตามขอบบ่อ หรือลอยตามผิวน้ำ ตับและตับอ่อน มักจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ (ชลอ, 2534)

ลักษณะทางโลหิตวิทยาของกุ้งที่เป็นโรค พบว่าจะมีจำนวนเม็ดเลือดลดลง โดย granulocytes จะลดจำนวนลงก่อน แล้ว semigranulocytes และ hyaline cell จึงจะลดจำนวนตาม พบว่ามีการรวมตัวกันของเม็ดเลือดใน hemal sinuses และมักพบแบคทีเรีย และเม็ดเลือดที่ตายแล้วรวมอยู่บริเวณนี้ด้วย นอกจากนี้การติดเชื้อแบคทีเรียจะทำให้น้ำเลือดมีสีขาวขุ่น และมีการแข็งตัวช้าลง (Anderson และคณะ,1988; Johnson, 1978; Lightner,1977)

การเปลี่ยนแปลงในตับและตับอ่อน พบว่า อาหารสะสมพวกไขมัน และไกลโคเจน มีปริมาณลดลง เซลล์ของตับและตับอ่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงมาก โดยเฉพาะบริเวณที่ติดกับ midgut จะมีการบวมน้ำ และเกิดการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือด นอกจากนี้ในบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างเซลล์ของตับและตับอ่อนจะมีการตาย และลอกหลุดของเซลล์ตับและตับอ่อน (Anderson และคณะ, 1988)

การเปลี่ยนแปลงใน antennal gland พบว่า เกิดการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดในท่อของ antennal gland มีการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส และเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์สังเกตได้โดยบริเวณ lumen ของท่อมีลักษณะกลม มองเห็นองค์ประกอบต่างๆ ไม่ชัดเจน ต่อมาจะพบว่ามีการบวมของเซลล์และลอกหลุดไป ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับ lymphoid organ พบว่าอวัยวะนี้จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เพราะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ และมีการสะสมของเม็ดเลือด รวมทั้งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยใน cytoplasm จะเกิดบริเวณที่มีสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าจะเกิด anaplasia คือการที่เซลล์สูญเสียการทำหน้าที่ปกติไป ในระยะสุดท้ายจะเกิดการตายของเซลล์ โดยจะเห็นเป็นช่องว่างอยู่ในอวัยวะนั้น ๆ (Owen และ Hall Mendelin, 1990)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

- กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) อายุ 1 เดือน
- อาหารกุ้งกุลาดำ
- สารคาว
- ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 500 ลิตร จำนวน 16 ถัง
- ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 1,600 ลิตร จำนวน 2 ถัง
- ตู้กระจกความจุประมาณ 20 ลิตร จำนวน 16 ตู้
- Air pump ขนาด 100 หัว จำนวน 1 เครื่อง
- ตาชั่ง 1,000 กรัม
- เศษอวน
- หัวทราย และสายออกซิเจน
- ใยแก้ว และ ถุงกรอง

2. สำหรับการสกัดสาร

- ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot air oven)
- เครื่องบดตัวอย่างหยาบ
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องกรองสูญญากาศ
- เครื่องสกัดสาร (Evaporator)
- บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250 และ1,000 มิลลิลิตร
- ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตร (Volummetric flask) ขนาด 500 และ1,000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 250 มิลลิลิตร

- แท่งแก้วคนสาร (Glass stirring rod)
- ช้อนตักสาร (Spoon)
- ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เอทานอล (Ethanol;CH_5OH 95%)

3. <u>สำหรับการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย</u>

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- เครื่องเขย่าตะกอน (Votex mixer)
- เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubutor)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- ปิเปตอัตโนมัติ (Micro pipette)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
- จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- น้ำเกลือเข้มข้น 1.5เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi*

1. การเตรียมสารสกัดจากโพธิ์ทะเล

ทำการล้างใบโพธิ์ทะเลให้สะอาด นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมงเพื่อลดความชื้นจนใบแห้ง เข้าเครื่องบดให้เป็นผงละเอียด ทำการชั่งน้ำหนัก และนำไปสกัดโดยใช้เอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 และ3,000 ppm ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนใบโพธิ์ทะเล 50 กรัมต่อเอทานอล 250 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการคั้นแยกเอาส่วนที่เป็นกากออก สารสกัดที่ได้นำไปกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องสกัดสารที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยเอาแอลกอฮอล์ออก

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* นำมาจาก stock เชื้อ ณ ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวเคมีดังตารางที่ 1 นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการต่อเชื้อจำนวน 3 ครั้ง เพื่อเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับค่า absorbance เท่ากับ 0.6 ที่ 540 นาโนเมตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ $1x\ 10^7$ CFU/ml

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi*

วิธีการทดลองจะทำในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ใช้อัตราส่วนของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1:1 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ๆ ละ 2 ซ้ำ ดังนี้คือ ชุดที่เติมความเข้มข้นของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลในระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1,000, 1,500, 2,000,

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียชนิด *V.harveyi* ที่ใช้ในการทดลอง

การทดสอบทางเคมี	ผลการทดสอบ
Gram's stain	gram negative
TCBS agar	G
Triple sugar iron agar	A/A
Motility	+
O-F test	+/+
Arginine decarboxylase	-
Lysine decarboxylase	+
Orinithime decarboxylase	+
Oxidase	+
Indole	+
MR/VP	+/ -
Citrate	+
Arabinose	+
Glucose	+
Inosital	-
Lactose	-
Maltose	+
Mannitol	+
Mannose	+
Raffinose	-
Sucrose	-

หมายเหตุ G = โคโลนีสีเขียว A = Acid

+ = positive reaction - = negative reaction

2,500 และ 3,000 ppm ตามลำดับ ลงในหลอด ๆ ละ 5 มิลลิลิตร และชุดควบคุมมีเฉพาะสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมแบคทีเรียลงไปทุกหลอดซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $1x10^7$ CFU/ml ลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ24 ชั่วโมงตามลำดับ ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการกระจายเชื้อ (Spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลที่ใช้ผสมในอาหารต่อความต้านทานเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยสุ่มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 60 วัน มาทดลองในตู้กระจก ใส่กุ้งกุลาดำตู้ละ 20 ตัวต่อซ้ำจำนวน 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ โดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรพื้นฐาน (Control)

ชุดการทดลองที่ 2 กลุ่มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรพื้นฐานผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 กลุ่มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรพื้นฐานผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 กลุ่มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรพื้นฐานผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm

แต่ละชุดการทดลองจะฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวกุ้งปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งกุลาดำอายุประมาณ 1 เดือน มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,600 ลิตร เพื่อปรับสภาพนาน 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการคัดเลือกกุ้งกุลาดำที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 50 ตัวต่อซ้ำ จำนวน 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ รวม 800 ตัว มาใส่ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ซึ่งบรรจุน้ำ 400 ลิตร ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารสูตรพื้นฐานและอาหารสูตรพื้นฐานผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลในระดับความเข้มข้น 1,000, 2,000 และ3,000 ppm ตามลำดับ โดยให้อาหารวันละ5 มื้อ คือเวลาประมาณ 07.00 น., 11.00 น., 15.00 น., 19.00 น. และ 23.00น. ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน แล้วนำมาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ระหว่างการเลี้ยงมีการดูดเศษอาหารทิ้ง และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ 3 วัน มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ น้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงมีความเค็ม 25 ppt

3. การเตรียมอาหารทดลอง

ใช้อาหารสูตรพื้นฐานสำหรับกุ้งกุลาดำนำมาคลุกกับสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลในระดับความเข้มข้น 1,000, 2,000 และ3,000 ppm ตามลำดับ ในอัตรา 10 ซีซีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จากนั้นนำไปพึ่งลมให้แห้งแล้วเก็บในถุงพลาสติกปิดผนึกสีดำและเก็บไว้ในที่เย็น ก่อนนำไปให้ในแต่ละมื้อนำไปเคลือบเม็ดอาหารด้วยสารคาวเพื่อป้องกันการสูญเสีย

4. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดสอบนำมาจาก stock เชื้อ ณ ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองทุกครั้ง จะนำมาเลี้ยงบนอาหาร Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS agar) แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อลำตัวกุ้ง เมื่อกุ้งแสดงอาการโรคออกมา ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน แล้วฉีดเข้าไปใหม่ ทำอย่างนี้ 3 ครั้ง ก่อนการทดลองเพื่อเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ

5. การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย

หลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารสูตรพื้นฐานและอาหารสูตรพื้นฐานผสมสารสกัดจากโพธิ์ทะเลในระดับต่าง ๆ จนครบ 60 วัน จึงสุ่มกุ้งจำนวน 20 ตัว จากแต่ละซ้ำของชุดการทดลอง จำนวน 4 ชุด มาปรับให้คุ้นเคยกับตู้กระจก นาน 1 สัปดาห์ โดยให้อาหารของแต่ละชุดการทดลองแล้วอดอาหาร 1 วัน ก่อนการทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* โดยฉีดเชื้อในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 % (ซึ่งได้ทดสอบมาก่อนแล้วว่าควรใช้ปริมาณเชื้อเท่าไร) เข้าทางกล้ามเนื้อกุ้งปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยา ขนาด 27G x 0.5 นิ้ว และ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย จะให้อาหารทดลองวันละ 5 มื้อ และดูดเศษอาหารทิ้งทุกๆ 3 วัน ตรวจดูผลการทดลองโดยพิจารณาจากจำนวนกุ้งที่ตายในระยะเวลา 7 วัน ตรวจอาการภายนอก และเขี่ยเชื้อที่แยกจาก hepatopancreas ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS agar) เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งตายด้วยเชื้อชนิดนี้

6. ศึกษาสมบัติของน้ำ

วิเคราะห์สมบัติของน้ำก่อนการทดลองและระหว่างการทดลองทุก ๆ 5 วัน โดยทำการวิเคราะห์สมบัติน้ำดังต่อไปนี้

- ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยใช้ DO Meter
- อุณหภูมิของน้ำโดยใช้ Thermometer
- ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH) โดยใช้ pH Meter
- ความเค็มของน้ำโดยใช้ Salinometer
- ค่าความเป็นด่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร ของ $CaCO_3$)
- แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N, มิลลิกรัมต่อลิตร) และไนไตรท์-ไนโตรเจน (NO_2-N, มิลลิกรัมต่อลิตร)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

7. บันทึกจำนวนกุ้งกุลาดำที่ตายและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บันทึกจำนวนกุ้งกุลาดำที่ตายในระยะเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตรารอดของกุ้งกุลาดำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา, ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์ และอาคารปฏิบัติการ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังวิทยาเขตชุมพร

ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนมกราคม 2548 – ธันวาคม 2548 รวมระยะเวลา 12 เดือน

64429

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi*

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 1,500, 2,000, 2,500 และ 3,000 ppm ตามลำดับ ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ มีค่าดังนี้ ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 1,080, 230, 130, 120, 110 และ 108 CFU/ml ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 555, 210, 185, 110, 98 และ 86 CFU/ml ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 9 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 340, 262, 115, 108, 114 และ 81 CFU/ml ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 345, 232, 161, 110, 98 และ 78 CFU/ml ตามลำดับ และที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 205, 145, 120, 65, 64 และ 54 CFU/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1

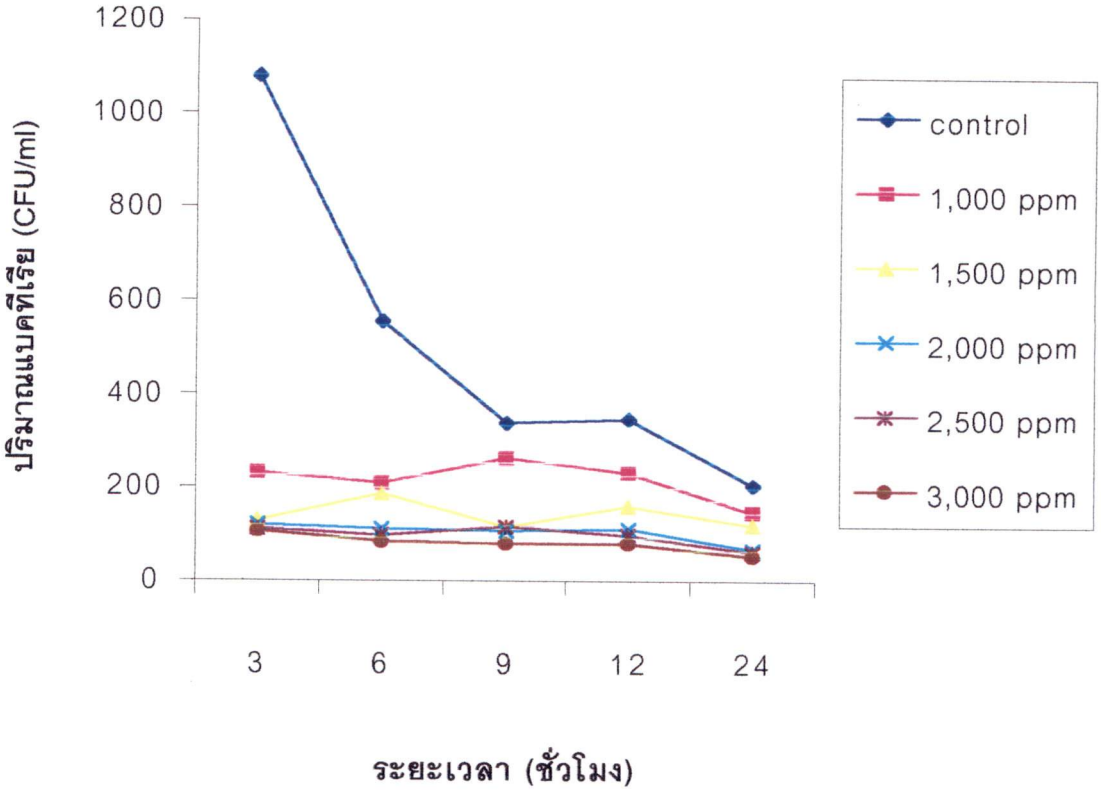
จากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียชุดการทดลองที่ผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลทุกระดับความเข้มข้นมีจำนวนเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากบ่มไว้ที่ 3 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสารสกัดจากโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 2,000, 1,500 และ 1,000 ppm ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลที่ใช้ผสมในอาหารต่อความต้านทานเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองระยะเวลา 60 วันน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 4 เท่ากับ 11.01, 11.16, 10.98 และ11.14 กรัมต่อตัว ตามลำดับ และฉีดเชื้อ *V. harveyi* ระดับค่า absorbance เท่ากับ 0.6 ที่ 540 นาโนเมตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.25×10^7 CFU/ml เข้ากล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดการทดลองปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำตายมากในช่วง 8-24 ชั่วโมง โดยหลังจากฉีดเชื้อประมาณ 1 ชั่วโมง จะพบกุ้งกุลาดำมีอาการเชื่องช้า ไม่ว่ายน้ำ เริ่มมีอาการตายในช่วงเวลา 6 ชั่วโมง ลักษณะอาการ

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ที่ผสมกับสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา

ระดับความเข้มข้นของสารสกัด (ppm)	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml) เวลา (ชั่วโมง)				
	3	6	9	12	24
Control	1080	555	340	345	205
1,000	230	210	262	232	145
1,500	130	185	115	161	120
2,000	120	110	108	110	65
2,500	110	98	115	98	64
3,000	108	86	81	78	54



ภาพที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียชนิด*V. harveyi* ที่ผสมกับสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละช่วงเวลา

ของกุ้งกุลาดำที่กำลังจะตายจะนอนนิ่งกับพื้น ช่วงเวลา 48 ชั่วโมง พบกุ้งกุลาดำชุดการทดลองที่ 1 ถึง 4 มีการตายเพิ่ม และช่วงเวลา 72-168 ชั่งโมง ไม่พบว่ามีกุ้งกุลาดำตายเพิ่มอีก กุ้งกุลาดำที่เหลือรอดมีอาการปกติ สำหรับกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลองที่แสดงอาการโรค เมื่อนำแยกเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas พบเชื้อ *V. harveyi* จำนวนมาก จำนวนการตายสะสมของกุ้งกุลาดำแสดงดังตารางที่ 3 และอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 4 แสดงผลดังตารางที่ 4

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าอัตรารอดของกุ้งกุลาดำชุดการทดลองที่ 1 ถึง 4 ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 62.5, 75, 88.75 และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 1 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 4 ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ($P>0.05$) ระยะเวลาที่ 48-168 ชั่วโมง อัตรารอดของกุ้งกุลาดำมีค่าเท่ากับ 50, 68.75, 80 และ 87.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 3 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลระดับต่าง ๆ กันในการทดลองความต้านทานกับเชื้อ *V. harveyi* ระยะเวลา 168 ชั่วโมง

ชั่วโมง / ซ้ำ	การตายสะสม															
	1				2				3				4			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
24	10	5	5	10	5	0	10	5	0	0	0	9	0	0	0	0
48	15	10	5	10	5	0	10	10	0	7	0	9	5	0	0	5
72	15	10	5	10	5	0	10	10	0	7	0	9	5	0	0	5
96	15	10	5	10	5	0	10	10	0	7	0	9	5	0	0	5
120	15	10	5	10	5	0	10	10	0	7	0	9	5	0	0	5
144	15	10	5	10	5	0	10	10	0	7	0	9	5	0	0	5
168	15	10	5	10	5	0	10	10	0	7	0	9	5	0	0	5
%การตาย	75	50	25	50	25	0	50	50	0	35	0	45	25	0	0	25

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 สูตรพื้นฐาน

ชุดการทดลองที่ 2 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm

ตารางที่ 4 อัตรารอด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับต่างๆ กัน ในการทดสอบความต้านทานกับเชื้อ *V. harveyi*

	อัตรารอด			
	ชุดการทดลอง			
ชั่วโมง	1	2	3	4
24	62.50±14.43[a]	75.00±20.41[ab]	88.75±22.50[ab]	100.00±0.00[b]
48	50.00±20.41[ns]	68.75±23.94[ns]	80.00±23.45[ns]	87.50±14.43[ns]
72	50.00±20.41[ns]	68.75±23.94[ns]	80.00±23.45[ns]	87.50±14.43[ns]
96	50.00±20.41[ns]	68.75±23.94[ns]	80.00±23.45[ns]	87.50±14.43[ns]
120	50.00±20.41[ns]	68.75±23.94[ns]	80.00±23.45[ns]	87.50±14.43[ns]
144	50.00±20.41[ns]	68.75±23.94[ns]	80.00±23.45[ns]	87.50±14.43[ns]
168	50.00±20.41[ns]	68.75±23.94[ns]	80.00±23.45[ns]	87.50±14.43[ns]

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 สูตรพื้นฐาน

ชุดการทดลองที่ 2 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สมบัติของน้ำ

จากการวิเคราะห์สมบัติของน้ำก่อนการทดลอง และระหว่างการทดลองทุกๆ 5 วัน ทุกชุดการทดลองมีค่าต่างๆ ดังนี้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 5.35-6.30 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิของน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 25.80-28.63 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าอยู่ระหว่าง 7.25-7.72 ความเค็มของน้ำมีค่าเท่ากับ 25 ppt ค่าความเป็นด่างมีค่าอยู่ระหว่าง 70.50-103.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ$CaCO_3$ แอมโมเนีย-ไนโตรเจน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.01-0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนไตรท์-ไนโตรเจนมีค่าอยู่ระหว่าง 0.01-0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ตารางที่ 5 สมบัติของน้ำ(ค่าเฉลี่ย)ก่อนการทดลอง และระหว่างการทดลองในระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณออกซิเจน (mg/l)	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ความเค็ม (ppt)	ความเป็นด่าง (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	0	6.25	28.10	7.71	25	77.50	0.01	0.03
	5	5.63	28.60	7.65	25	71.50	0.06	0.09
	10	5.89	27.30	7.40	25	90.25	0.07	0.04
	15	5.75	27.15	7.39	25	89.00	0.04	0.02
	20	5.75	27.00	7.60	25	82.75	0.02	0.05
	25	5.50	26.75	7.40	25	84.25	0.06	0.01
	30	5.38	26.50	7.33	25	101.50	0.08	0.09
	35	5.88	26.87	7.50	25	84.75	0.03	0.08
	40	5.75	26.00	7.25	25	83.25	0.01	0.03
	45	5.88	26.00	7.30	25	102.50	0.01	0.04
	50	5.75	26.75	7.44	25	95.75	0.05	0.02
	55	5.63	26.88	7.51	25	85.25	0.03	0.02
	60	5.75	27.17	7.41	25	91.75	0.05	0.06
2	0	6.25	28.00	7.69	25	77.45	0.02	0.04
	5	5.63	28.63	7.57	25	72.25	0.06	0.08
	10	5.88	27.30	7.39	25	89.50	0.07	0.02
	15	5.62	27.00	7.41	25	86.50	0.03	0.01
	20	5.63	27.00	7.63	25	81.50	0.01	0.07
	25	5.43	26.80	7.42	25	82.75	0.08	0.03
	30	5.38	26.66	7.35	25	90.25	0.08	0.09
	35	5.85	26.79	7.55	25	85.00	0.05	0.06
	40	5.88	26.25	7.26	25	84.25	0.02	0.02
	45	5.75	25.89	7.31	25	103.50	0.01	0.05
	50	5.68	26.87	7.47	25	99.25	0.06	0.04
	55	5.63	26.90	7.51	25	84.75	0.03	0.01
	60	5.90	27.10	7.39	25	90.50	0.07	0.06

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณออกซิเจน (mg/l)	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความกรดเป็นด่าง	ความเค็ม (ppt)	ความเป็นด่าง (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
3	0	6.30	28.23	7.70	25	77.55	0.02	0.02
	5	5.50	28.63	7.65	25	72.50	0.07	0.09
	10	5.88	27.27	7.41	25	90.75	0.08	0.06
	15	5.50	27.23	7.38	25	86.75	0.02	0.01
	20	5.80	27.00	7.63	25	83.25	0.01	0.05
	25	5.48	26.73	7.44	25	81.50	0.07	0.03
	30	5.30	26.52	7.31	25	92.75	0.08	0.07
	35	5.80	26.83	7.48	25	83.75	0.04	0.08
	40	5.75	26.15	7.26	25	82.75	0.01	0.02
	45	5.90	25.80	7.31	25	102.00	0.02	0.04
	50	5.88	26.72	7.45	25	96.50	0.05	0.03
	55	5.63	26.78	7.53	25	89.75	0.03	0.02
	60	5.88	27.00	7.39	25	95.25	0.05	0.07
4	0	6.29	28.00	7.72	25	77.50	0.01	0.02
	5	5.63	28.63	7.60	25	70.50	0.05	0.07
	10	5.89	27.25	7.41	25	88.70	0.08	0.03
	15	5.75	27.25	7.39	25	84.25	0.03	0.01
	20	5.70	27.00	7.63	25	81.25	0.01	0.04
	25	5.43	26.73	7.40	25	83.25	0.06	0.01
	30	5.35	26.42	7.30	25	83.00	0.05	0.06
	35	5.83	26.92	7.51	25	84.75	0.01	0.02
	40	5.80	26.00	7.26	25	103.25	0.01	0.05
	45	5.85	26.00	7.30	25	99.25	0.04	0.04
	50	5.70	26.85	7.45	25	85.00	0.05	0.03
	55	5.65	26.86	7.51	25	82.25	0.04	0.08
	60	5.90	26.97	7.42	25	95.75	0.06	0.02

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 สูตรพื้นฐาน

ชุดการทดลองที่ 2 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm

ตารางที่ 6 สมบัติของน้ำ (ค่าเฉลี่ย) ก่อนการทดลอง และระหว่างการทดลองในตู้กระจกในระยะเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณออกซิเจน (mg/l)	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	ความเค็ม (ppt)	ความเป็นด่าง (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	0	6.30	27.30	7.75	25	102.10	0.02	0.01
	2	6.20	28.00	7.71	25	101.50	0.01	0.01
	4	6.25	28.00	7.67	25	103.00	0.01	0.03
	6	5.90	27.30	7.46	25	100.25	0.05	0.04
2	0	6.25	28.00	7.80	25	99.25	0.01	0.01
	2	6.20	28.00	7.57	25	100.75	0.01	0.02
	4	5.88	28.00	7.63	25	100.25	0.02	0.02
	6	5.90	27.23	7.55	25	99.25	0.04	0.03
3	0	5.90	27.75	7.70	25	103.50	0.02	0.01
	2	6.25	27.30	7.69	25	100.50	0.01	0.02
	4	5.75	28.00	7.50	25	99.75	0.03	0.02
	6	5.85	27.75	7.57	25	99.25	0.04	0.02
4	0	6.00	28.00	7.75	25	102.50	0.01	0.01
	2	5.88	27.30	7.60	25	101.75	0.01	0.03
	4	5.85	27.30	7.57	25	99.50	0.03	0.03
	6	5.75	28.00	7.44	25	99.25	0.03	0.04

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 สูตรพื้นฐาน

ชุดการทดลองที่ 2 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 สูตรพื้นฐาน + สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi*

จากผลการทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* พบว่าสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากใบโพธิ์ทะเลมีสารออกฤทธิ์ที่ชื่อว่า Kaempferol และ Kaemferol-7-glucoside ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ghosh และ Bhattacharya (2004) ได้ทดลองสกัดสาร Kaemferol และ Kaemferol-7-glucoside จากโพธิ์ทะเลซึ่งสามารถใช้ในการยับยั้งโรคจากเชื้อราและแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ เต็มดวง (2547) ได้รายงานว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อ *V.harveyi* ได้ โดยมีสารออกฤทธิ์คือ Kaemferol และ Kaemferol-7-glucoside

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากโพธิ์ทะเลที่ใช้ผสมในอาหารต่อความต้านทานเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

จากผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm. ที่ผสมในอาหารให้กุ้งกุลาดำกินในระยะเวลา 60 วันนั้นมีผลต่อความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* เนื่องจากใบโพธิ์ทะเลมีสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดังการทดลองที่ 1 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ L lavarasan และคณะ (2004) ได้รายงานว่าโพธิ์ทะเลสามารถยับยั้งและควบคุมแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm. สามารถยับยั้งเชื้อได้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ 1 จะแตกต่างกับชุดการทดลองที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ระยะเวลา 48-168 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 1 กลับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดการทดลองที่ 4 ($P>0.05$) ซึ่งอาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการให้อาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลแก่กุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 60 วัน นั้นอาจจะสั้นเกินไป จึงทำให้สารสกัดที่สะสมในตัวกุ้งอยู่ในระดับโดสที่ไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรียอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากใช้สารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับความเข้มข้นที่ 3,000 ppm ควรเพิ่มระยะเวลาในการให้อาหารนานขึ้น หรือเพิ่มอัตราการผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลต่ออาหาร 1 กิโลกรัมให้มากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดลองใช้สารสกัดจากโพธิ์ทะเลในด้านการแพทย์อื่นๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในคน เพราะสารสกัดจากโพธิ์ทะเลยังมีฤทธิ์ทางเภสัชในด้านอื่นๆ นอกเหนือจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รา ไวรัส และปาราสิต เช่น มีฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง, ยับยั้งการเกาะของตัวอ่อนที่ผนังมดลูก และออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง เป็นต้น

2. ควรมีการศึกษาระยะเวลาการให้อาหารผสมสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลที่ระดับ 3,000 ppm ว่าควรให้นานเท่าใด จึงจะช่วยให้กุ้งกุลาดำมีความต้านทานโรคได้ร้อยเปอร์เซนต์

3. ควรมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบโพธิ์ทะเลต่อกุ้งกุลาดำในด้านอื่น ๆ เช่น การเจริญเติบโต ความต้านทานต่อความเครียด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

คณิต ไชยาคำ, สิริ ทุกข์วินาศ, ยงยุทธ ปรีดาสัมพะบุตร, พุทร ส่องแสงจินดา และดุสิต ตันวิไลย, 2537. คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง. 109 น.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ฐานเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ. 202 น.

เต็มดวง ภัทรขจร. 2547. ฟ้าทะลายโจร. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ. กรมประมง. กรุงเทพฯ. หน้า 128-135.

นิจศิริ เรืองรังษี และพยอม ตันติวัฒน์. 2534.พืชสมุนไพร. โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. 243 น.

พงศ์เชฏฐ์ พิชิตกุล. 2544. การวิเคราะห์น้ำ. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร. 83 น.

มะลิ บุณยรัตผลิน. 2531. อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ. สำนักพิมพ์ช่องนนทรี, กรุงเทพฯ. 63 น.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. พจนานุกรมสมุนไพร พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัท รวมสาน์น (1997) จำกัด. กรุงเทพฯ. 880 น.

เสริมสิริ วินิจฉัยกุล นันทวัน บุณยะประภัศร และสุวรรณ ธีระวรพันธ์. สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน(3). คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. โรงพิมพ์ประชาชน จำกัด. กรุงเทพฯ. 823 น.

Anderson, I.G., M.N. Shamsudin, M. Shariff and G. Nash. 1988. Bacterial septicemia in Juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon,* cultured in Malaysia Brackkishwater pond. Asian Fis. Sci. 2: 93-108 p.

Ghosh K and TK Bhattacharya . 2004. Preliminary study on the antiimplantation activity of compound from the extracts of seeds of *Thespesia populnia*. Department of Chemical Technology, Unoversity College of Science and Technology, Calcutta University, Kolkata, India. 93-107 P.

Giorgetti, G. 1990. Diseases problems in farmed penaeids in Italy. Actes de Colloque 9: 75-87.

Johnson, S.K. 1978. Handbook of shrimp Disease. Texas Agricultural Extention Service, Sea Grant College, Texas A & M University. 22 p.

Johnson, P.T. and D.V. Lightner. 1988. Rod – shaped nuclear viruses of crustaceans : gut – infection species. Dis. Aquat. Org. 5 : 123-141.

Lightner, D.V. 1977. Shrimp diseases, pp. 10-90. *In* C.J. Sinderman(ed.). Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

L lavarasan R, M Vasudevan , S Anbazhagan and S Venkataraman . 2004. Isolation of Biologically active Naphthoquinones from *Thespesia populnia*. Department of Phamacology, C.L. Baid Metha Collage of Pharmacy, Jyothi Nagar, Old Mahabalipuram Road, Thorapakkarn, Chennai, 600096, India. 30-227 P.

Owens, L. and S. Hall-Mendelin. 1990. Recent advances in Australian prawns disease and pathology. Actes de Colloqe. 9: 103-112 p.

SEAFDEC. 1988. Biology and Culture of *Penaeus monodon*. Brackishwater Aquaculture Information System, Aquaculture Department, Tigbauan, Iloilo, Philippines. 178 P.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
วิธีการวิเคราะห์

การเตรียมสารละลายน้ำเกลือ (Nacl) 1.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมสารละลายน้ำเกลือ 1.5 % ปริมาตร 1 ลิตร

วิธีคำนวณ น้ำ 100 ml ใช้ NaCl 1.5 g

น้ำ 1000 ml ใช้ NaCl $\frac{1.5 \times 1000}{100} = 15$ g

วิธีการเตรียม - ชั่ง NaCl 15 g เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml คนให้ละลาย

- นำไป clave

การเตรียมสารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 1 ลิตร

วิธีคำนวณ เอทานอล 95 % ปริมาตร 1 มล. มีเนื้อสาร 0.7896

สาร 1 กก. = 1×10^6 มก.

ถ้า สาร 0.7896 กก. = $10^6 \times 0.7896$ มก.

จาก $n_1v_1 = n_2v_2$

จะได้ $v_1 = \frac{1{,}000 \times 1{,}000}{(10^6 \times 0.7896)}$

$v_1 = 1.27$ มล.

ดังนั้น ต้องใช้เอทานอลเข้มข้น 95 % 1.27 มล.

สารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 1,500 ppm ปริมาตร 1 ลิตร

วิธีคำนวณ เอทานอล 95 % ปริมาตร 1 มล. มีเนื้อสาร 0.7896

สาร 1 กก. = 1×10^6 มก.

ถ้า สาร 0.7896 กก. = $10^6 \times 0.7896$ มก.

จาก $n_1v_1 = n_2v_2$

จะได้ $v_1 = \frac{1{,}500 \times 1{,}000}{(10^6 \times 0.7896)}$

$v_1 = 1.90$ มล.

ดังนั้น ต้องใช้เอทานอลเข้มข้น 95 % 1.90 มล.

สารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm ปริมาตร 1 ลิตร

วิธีคำนวณ เอทานอล 95 % ปริมาตร 1 มล. มีเนื้อสาร 0.7896

สาร 1 กก. = $1x10^6$ มก.

ถ้า สาร 0.7896 กก. = $10^6x0.7896$ มก.

จาก $n_1v_1 = n_2v_2$

จะได้ $v_1 = \frac{2,000 \times 1,000}{(10^6 \times 0.7896)}$

$v_1 = 2.53$ มล.

ดังนั้น ต้องใช้เอทานอลเข้มข้น 95 % 2.53 มล.

สารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm ปริมาตร 1 ลิตร

วิธีคำนวณ เอทานอล 95 % ปริมาตร 1 มล. มีเนื้อสาร 0.7896

สาร 1 กก. = $1x10^6$ มก.

ถ้า สาร 0.7896 กก. = $10^6x0.7896$ มก.

จาก $n_1v_1 = n_2v_2$

จะได้ $v_1 = \frac{2,500 \times 1,000}{(10^6 \times 0.7896)}$

$v_1 = 3.17$ มล.

ดังนั้น ต้องใช้เอทานอลเข้มข้น 95 % 3.17 มล.

สารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm ปริมาตร 1 ลิตร

วิธีคำนวณ เอทานอล 95 % ปริมาตร 1 มล. มีเนื้อสาร 0.7896

สาร 1 กก. = $1x10^6$ มก.

ถ้า สาร 0.7896 กก. = $10^6x0.7896$ มก.

จาก $n_1v_1 = n_2v_2$

จะได้ $v_1 = \frac{3,000 \times 1,000}{(10^6 \times 0.7896)}$

$v_1 = 3.80$ มล.

ดังนั้น ต้องใช้เอทานอลเข้มข้น 95 % 3.80 มล.

หมายเหตุ n_1 = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น v_1 = ปริมาตรของสารที่ต้องการหา
n_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ v_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการ

วิธีการเตรียม - เตรียมเอทานอลเข้มข้น 95 % ตามปริมาตรที่ได้คำนวณไว้ข้างต้นใน แต่ละความเข้มข้นที่ต้องการ นำมาใส่ขวดปรับปริมาตรจุ 1,000 มล.
- จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มล. เขย่าให้เข้ากัน
- เทสารละลายใส่ขวดทึบแสง เก็บให้ห่างจากแสง

วิธีตรวจวัดและวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ความเป็นกรดเป็นด่าง

1. เตรียมตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปวัดค่าด้วยเครื่องวัด pH

2. เลือกช่วง pH โดยกดปุ่ม MODE จอจะแสดงค่าของ pH ที่วัดออกมาทันทีตามค่า Standardization ที่ได้ทำไว้ก่อนหน้านี้ ถ้าต้องการ Standardization ใหม่ ให้กดปุ่ม CAL

3. หลังจากล้าง electrode ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำมาจุ่มในสารละลาย Buffer แรก

4. เครื่องจะแสดงค่า Buffer ที่วัดได้ และจะทำการ Standardize เอง โดยอัตโนมัติเมื่อค่าที่อ่านได้คงที่

5. กดปุ่ม MODE เพื่อเริ่มทำการวัด

6. หลังจากล้าง electrode ด้วยน้ำกลั่นแล้วจุ่มลงในตัวอย่างและอ่านค่า pH จากจอ

7. ล้าง electrode ทุกครั้งด้วยน้ำกลั่นหลังจากใช้แล้ว และเก็บโดยการแช่ไว้ในสารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตร

ความเป็นด่าง

ด้วยวิธี APHA (คณิตและคณะ, 2537)

1. ตวงน้ำตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่

2. เติม Phenolphthalein indicator 2 หยด ถ้าสารละลายเป็นสีชมพู นำไปเติมสารละลาย0.02 กรัมสมมูลของกำมะถัน (H_2SO_4)ในสารละลาย 1 ลิตร ซึ่งอยู่ในบิวเรต การไตเตรทค่อย ๆ รินกรดกำมะถัน (H_2SO_4) ครั้งละประมาณ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมกันดี แล้วค่อยเติมกรดกำมะถัน(H_2SO_4) ครั้งต่อไปจนสีชมพูหมดไป

3. ถ้าสารละลายไม่มีสีชมพู เติม Methyl orange 2 หยด แล้วไตเตรทสารละลายด้วยกรดกำมะถัน(H_2SO_4) ได้สารละลายสี reddish orange (สีแดงอมส้ม)

4. วิธีไตเตรทค่อย ๆ รินกรดตามวิธีข้อ 2

5. บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ในข้อ 2 และ 3 แล้วคำนวณหาค่าความเป็นด่าง ดังนี้

การคำนวณ

ความเป็นด่าง(เท่ากับ มิลลิกรัมแคลเซียมคาร์บอเนต/ลิตร) = $\frac{BxNx50,000}{\text{มิลลิลิตรของน้ำตัวอย่าง}}$

ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

1. เตรียมตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปวัดด้วยเครื่องวัด DO

2. เครื่องจะแสดงค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ปริมาณแอมโมเนีย- ไนโตรเจน

ด้วยวิธี Phenol-hypochlorite methed (คณิต และคณะ, 2537)

1. ก่อนวิเคราะห์ เครื่องแก้วที่จะใช้ทั้งหมดต้องแช่ด้วยกรด HCl เจือจางที่อุ่นแล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่น สามารถใช้กรดได้หลาย ๆ ครั้ง

2. ดูดน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้ว แล้วเติมสารละลายดังนี้

(1) 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลาย Phenol-alcohol

(2) 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลาย Sodium nitroprusside

(3) 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Oxidizing

ผสมโดยใช้ Tube buzzer

3. นำกระดาษ Aluminium foil หุ้มปิดปลายหลอดแก้ว เพื่อป้องกันแอมโมเนียจากบรรยากาศลงไปเจือปน ตั้งหลอดแก้วทิ้งไว้เพื่อให้สารละลายทำปฏิกริยาโดยสมบูรณ์ เกิดเป็นสารประกอบ Indophenol ซึ่งมีสีน้ำเงินซึ่งมีสีน้ำเงิน ประมาณ 60 นาที

4. วัดค่า Absorbance ของน้ำตัวอย่างจากข้อ 3 ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ Wavelength 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Reference solution (Blank)

5. วัดค่า Absorbance ของ Reagent bank และสารละลาย Substandard

ข้อควรระวัง

1. ควรใช้น้ำกลั่น De-ionized water ที่เตรียมใหม่ ๆ จาก Cationexchange resin สำหรับเตรียมสารละลายและวิเคราะห์เท่านั้น

2. น้ำตัวอย่างควรเก็บในขวดที่มีฝาปิดสนิท และหลอดแก้วควรหุ้มปลายด้วย Aluminium foil ระหว่างการวิเคราะห์ ไม่ควรให้สารละลายมีโอกาสระเหยสัมผัสอากาศและจุกยาง

3. อุปกรณ์ สารเคมี และผงซักฟอกที่มีแอมโมเนียผสม ควรเก็บออกจากบริเวณที่วิเคราะห์ และไม่ให้มีโอกาสสัมผัสน้ำตัวอย่างและสารละลาย

ปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจน

ด้วยวิธี Colorimetric method (พงษ์เชฏฐ์, 2544)

1. สำหรับน้ำตัวอย่างที่มีความขุ่นมาก ควรกรองน้ำด้วย Poltcarbonnate filters และต้องล้างกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นก่อน

2. ตวงน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Sulfanilamide 0.2 มิลลิลิตร และตามมาด้วย N-(1-Naphthy)ethylenediamine dihydrochloride solution (NED) ตามลำดับ

3. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ Wavelength 540 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข.

ตาราง

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนอัตรารอดของกุ้งกุลาดำใน การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*

เวลา(ชั่วโมง)	SOV	df	SS	MS	F	C.V. (%)
24	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	3.7624*	20.6186
	Error	12	3393.7500	282.8125		
	Total	15	6585.9380			
48	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	2.4350ns	29.2109
	Error	12	5243.7500	436.9792		
	Total	15	8435.9380			
72	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	2.4350ns	29.2109
	Error	12	5243.7500	436.9792		
	Total	15	8435.9380			
96	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	2.4350ns	29.2109
	Error	12	5243.7500	436.9792		
	Total	15	8435.9380			
120	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	2.4350ns	29.2109
	Error	12	5243.7500	436.9792		
	Total	15	8435.9380			
144	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	2.4350ns	29.2109
	Error	12	5243.7500	436.9792		
	Total	15	8435.9380			
168	Treatment	3	3192.1880	1064.0630	2.4350ns	29.2109
	Error	12	5243.7500	436.9792		
	Total	15	8435.9380			

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

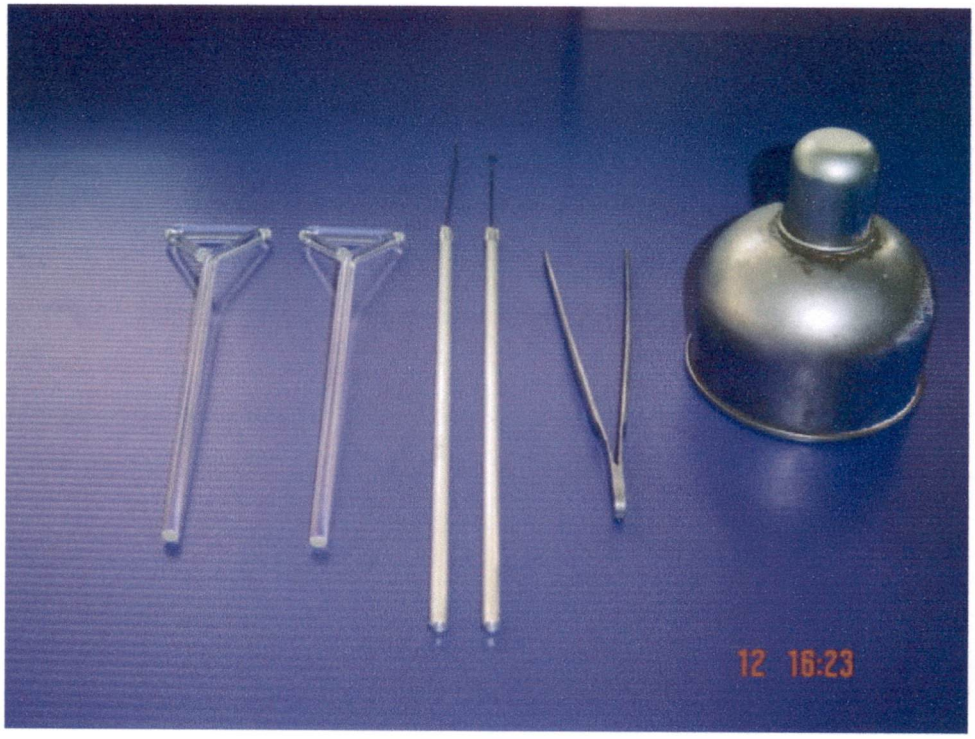
ภาคผนวก ค.

รูปภาพ

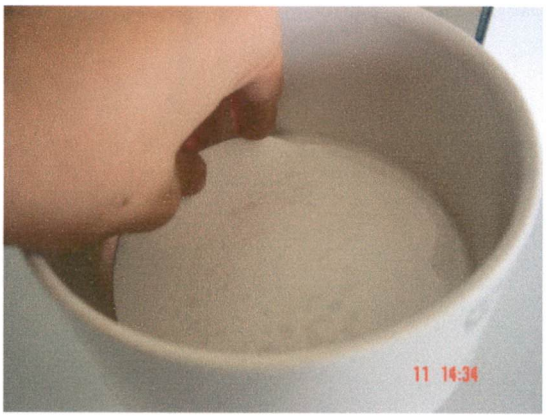
ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะใบโพธิ์ทะเลที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงละเอียด

ภาพผนวกที่ 2 เครื่องสกัดสาร (Evaporator)

ภาพผนวกที่ 3 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)

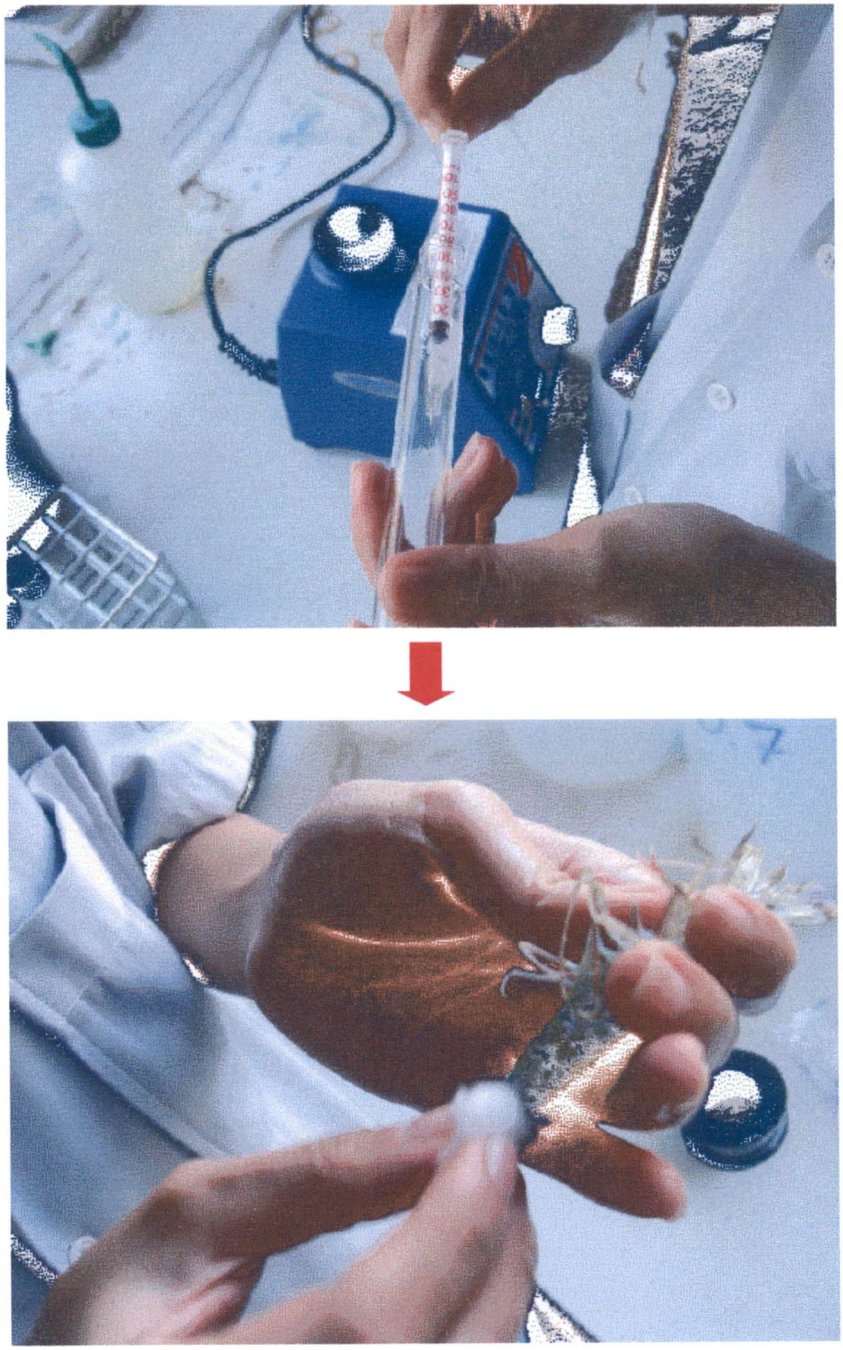


ภาพผนวกที่ 4 อุปกรณ์ในการกระจายเชื้อแบคทีเรีย



ภาพผนวกที่ 5 ขั้นตอนการกรองสารสกัดด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ
ก่อนนำเข้าเครื่องสกัดสาร

ภาพผนวกที่ 6 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในตู้กระจกเพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*



ภาพผนวกที่ 7 ขั้นตอนการฉีดเชื้อเข้าสู่กล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำเพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*