รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดจากสาหร่ายซากาสซัมต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนาไม

Effect of macroalgae (*Sargassum* sp.) crude extracts against *Vibrio harveyi* infection on white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

ผศ. ดร. อัจฉรี เรืองเดช

รศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากรายได้ภาควิชา คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดจากสาหร่ายซากาสซัมต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ใน กุ้งขาวแวนาไม

Effect of macroalgae (*Sargassum* sp.) crude extracts against *Vibrio harveyi* infection on white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2552 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 40,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง 30 กันยายน 2552

ผู้ดำเนินการวิจัย นางสาวอัจฉรี เรืองเดช ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สจล.

kruschar@kmitl.ac.th

นางนงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง สจล.

klnongnu@kmitl.ac.th

บทคัดย่อ

การเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vanamei*) มักประสบปัญหาเรื่องโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Vibrio* sp. สาหร่าย *Sargassum oligocystum* เป็นสาหร่ายที่มีการนำมาศึกษากันมาก ซึ่งสารที่ได้ในสาหร่าย *S. oligocystum* คือ สารประกอบพวก แร่ธาตุ polysaccharide กรดอะมิโน กรดไขมัน sterols คาร์โรทีนอยด์และ polyphenols ส่วนของ polyphenols นั้นจะถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรค หรือ antioxidative การศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาถึงผลของการเสริมอาหารด้วยสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ในกุ้งขาว ผลจากการศึกษาพบว่า กุ้งขาวที่ได้สารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่เป็น กรานูลมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ โดยจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิด granulocyte จำนวน 4.4 ± 0.03 % ชนิด hyaline 20.72 ± 0.17 % และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวม 2.51 ± 0.15 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งเม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายสูงสุด โดยมีอัตราการรอดตาย 100.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (96 ชั่วโมงหลังจากการใส่เชื้อ) โดยกลุ่มควบคุมเริ่มตายที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากการใส่เชื้อ ส่วนการเจริญเติบโตของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง จากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่า ผลของการเสริมอาหารด้วยสารสกัดจากสาหร่าย *Sargassum oligocystum* ในกุ้งขาว นั้นมีผลต่อภูมิคุ้มกันของกุ้ง

คำสำคัญ: สาหร่ายซากาสซัม กุ้งขาวแวนนาไม เชื้อวิบริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12776300

Abstract

White shrimp (*Litopenaeus vanamei*) often suffer from disease problems mainly the diseases caused by viruses and bacteria such as *Vibrio* sp. Seaweed, *Sargassum oligocystum*, had been studied about the natural compounds for instance polysaccharide, minerals, amino acids, fatty acids, sterols, carotenoids and polyphenols. These could be used to prevent and treat diseases or functioned as antioxidative substance. In this study we investigate the effect of dietary supplementation with an extract of seaweed *S. oligocystum* in shrimp. The results of this study found that shrimp fed with seaweed extract of *S. oligocystum* at concentrations of 10 g per 1 kg had the highest granular blood cells compared to the other. The number of granulocyte cell, hyaline cell, and total blood cell were 20.72 ± 0.17, 4.4 ± 0.03 and 2.51 ± 0.15 million cells per milliliter, respectively, which involved with the immune system. Challenged test by infection with *Vibrio harveyi* found that extracts of *S. oligocystum* at concentrations of 0.1, 1 and 10 g/ kg with a better survival rate than the control. The survival rate was 100.00 per cent at the end of the experiment (96 h after inoculation), on the contrary, the control group died within 72 hours after inoculation. There was no difference in growth of shrimp in each treatment at the end of the experiment. This study could say that effects of dietary supplementation with an extract of *S. oligocystum* on shrimp immune were the most prominent.

Keywords: Sargassum, Pacific white shrimp, Vibrio

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	6
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ใน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	10
2	อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannmei*) ที่เวลาต่างๆกันหลังจากการใส่เชื้อ *Vibrio harveyi*	13
3	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง	13

ตารางผนวกที่		หน้า
1	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ไม่ได้รับสารสกัด*Sargassum oligocystum* (กลุ่มควบคุม)	18
2	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัด*Sargassum oligocystum* เข้มข้น 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	18
3	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัด*Sargassum oligocystum* เข้มข้น 1กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	18
4	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัด*Sargassum oligocystum* เข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	19
5	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อ *Vibrio harveyi* และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆกัน	19
6	อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลาต่างๆกัน	20
7	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus Vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะต้นสาหร่าย *Sargassum oligocystum*	3
2	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิด granulocyte	11
3	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิด hyaline	11
4	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวรวมทั้งหมด	12

ภาพผนวกที่		หน้า
1	กราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Vibrio harveyi*	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

สาหร่ายทะเล *Sargassum* sp. หรือที่เรียกสาหร่ายใบหรือสาหร่ายทุ่น เป็นสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีการแพร่กระจายสูง สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ตามแนวเศษปะการังและก้อนหินในระดับน้ำขึ้นน้ำลงและในระดับน้ำลงต่ำสุดในบริเวณน้ำที่ใส มีส่วนที่เป็นรากสำหรับยึดเกาะ ต้นตั้งตรง บางชนิดแตกแขนงได้มากจนเป็นพุ่ม แกนของต้นมีลักษณะกลม หรือแบน ขอบใบมีจักแหลม และมีแกนกลางใบ โคนใบมีถุงลมเล็กๆ เกิดอยู่ เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์ จะสร้างรีเซปตาเคิลเป็นกระจุกที่ปลายยอดหรือปลายแขนง

การใช้ประโยชน์ของสารสกัดที่พบในสาหร่าย สารที่ได้จากการสกัดสาหร่ายนั้นมีหลายตัว พบในปริมาณมากน้อยไม่เท่ากัน แต่สารที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลนั้นที่พบมากคือพวก phlorotannin ซึ่งมี phloroglucinol เป็นหน่วยพื้นฐาน และสารจำพวก phlorotannin มีปฏิกิริยาในการต่อต้านสารพวกออกซิเจนไอออนของ superoxide และ hydroxyl ที่เป็นอนุมูลอิสระ และเป็นที่รู้กันดีว่าในสาหร่ายสีน้ำตาลมีสารประกอบหลายอย่าง เช่น แร่ธาตุ polysaccharide กรดอะมิโน กรดไขมัน sterols คาร์โรทีนอยด์และ polyphenols ส่วนของ polyphenols นั้นจะถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง antitioxidative และการต้านการอักเสบ

การเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบันมักประสบปัญหาเรื่องโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Vibrio* sp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในการเลี้ยงกุ้งขาว การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากสาหร่ายในการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว โดยตรวจสอบจากการนับเม็ดเลือด และ ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้กินสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ในระดับความเข้มข้นต่างๆกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดชนิดต่างๆของกุ้งขาว หลังจากได้รับสารสกัดของสาหร่าย *S. oligocystum* ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน
2. เพื่อศึกษาความสามาระในการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* หลังจากกุ้งได้รับสารสกัด ของสาหร่าย *S. oligocystum* ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae)

สาหร่ายสีน้ำตาลจัดอยู่ใน Division Phaeophata มีทั้งหมดประมาณ 250 สกุล และมากกว่า 1500 ชนิด แต่มีเพียง 5 สกุลเท่านั้นที่อยู่ในน้ำจืด นอกนั้นเป็นสาหร่ายทะเลและน้ำกร่อย สาหร่ายพวกนี้ชอบขึ้นอยู่ในเขตอบอุ่น และเขตหนาวมากกว่าในเขตร้อน พบบริเวณชายฝั่งแอตแลนติก และแปซิฟิก ตั้งแต่ระดับที่น้ำท่วมถึงไปจนถึงระดับน้ำลึก 100 เมตรหรืออาจลึกถึง 220 เมตร ในน้ำใสและแสงส่องถึง (กาญจนภาชน์, 2527) สาหร่ายสีน้ำตาลมักขึ้นอยู่บนก้อนหินหรือบนสาหร่ายชนิดอื่น ในลักษณะเป็น อีพิไฟต์ (epiphyte) พวกที่ขึ้นเป็น อีพิไฟต์บางชนิดต้องเลือกสิ่งที่ยึดเกาะ เรียกว่า selected host โดยจะขึ้นเกาะเฉพาะบนพืชบางชนิดเท่านั้น (Khanjanapaj and Hisao, 1995) บางสกุลอาจลอยอยู่บนน้ำ ก็สามารถเจริญเติบโตขยายพันธุ์ได้ ลักษณะทั่วไปส่วนใหญ่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ไม่ปรากฏเป็นพวกเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์เลย พวกที่มีขนาดเล็กสุด เป็นเส้นที่สามารถแตกแขนงได้ หรือไม่แตกแขนง เช่นพวกที่อยู่ในอันดับ Ectocarpales และครอบครัว Myrionemataceae ในอันดับ Chordariales บางสกุลแผ่เป็นแผ่น ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ พาเรนไคมา (Pseudoparenchyma) สาหร่ายสีน้ำตาลมีการสืบพันธุ์แบบทั้งที่อาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ บางชนิดสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการขาดท่อน และบางชนิดสร้างแขนงพิเศษเรียกว่า propagules หรือ propagulum ซึ่งสามารถหลุดไปงอกเป็นต้นใหม่ได้

ลักษณะของสาหร่าย *Sargassum* sp.

สาหร่ายทะเล *Sargassum* sp. หรือที่เรียกสาหร่ายใบหรือสาหร่ายทุ่น เป็นสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีการแพร่กระจายสูง สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (กาญจนภาชน์, 2527) ตามแนวเศษปะการังและก้อนหินในระดับน้ำขึ้นน้ำลงและในระดับน้ำลงต่ำสุดในบริเวณน้ำที่ใส (Khanjanapaj and Hisao, 1995) มีลักษณะทัลลัสเหมือนพืชชั้นสูง มีส่วนที่เป็นรากสำหรับยึดเกาะ ต้นตั้งตรง บางชนิดแตกแขนงได้มากจนเป็นพุ่ม แกนของต้นมีลักษณะกลม หรือแบนเบลดมีลักษณะเหมือนใบไม้ ขอบใบมีจักแหลม และมีแกนกลางใบ โคนใบมีถุงลมเล็กๆ เกิดอยู่ เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์ จะสร้างรีเซปตาเคิลเป็นกระจุกที่ปลายยอดหรือปลายแขนง(Noiraksa et al., 2006) สาหร่ายสีน้ำตาลอันดับนี้มีวัฏจักรชีวิตที่มีลักษณะ เฉพาะ คือ มีต้นดิพลอยด์ ซึ่งมีไมโอซิสในระยะแกมีต และการรวมของแกมีตเป็นแบบโอโอแกมี การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ไม่มีการสร้างสปอร์มีแต่การขาดท่อน ส่วนที่ขาดท่อนมานี้สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้อีกต่อไป (กาญจนภาชน์, 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์และความสำคัญของสาหร่าย *Sargassum* sp.

ได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์ และโครงสร้างของสารสกัดที่พบในสาหร่าย สารที่ได้จากการสกัดสาหร่ายนั้นมีหลายตัวพบในปริมาณมากน้อยไม่เท่ากัน แต่สารที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลนั้นที่พบมากคือพวก phlorotannin ซึ่งมี phloroglucinol เป็นหน่วยพื้นฐาน (Glomitza and Keusgen, 1995) และสารจำพวก phlorotannin มีปฏิกิริยาในการต่อต้านสารพวกออกซิเจนไอออนของ superoxide และ hydroxyl ที่เป็นอนุมูลอิสระ จึงได้มีการนำสาร phlerotannin มากำจัดอนุมูลอิสระ และเป็นที่รู้กันดีว่าในสาหร่ายสีน้ำตาลมีสารประกอบหลายอย่าง เช่น แร่ธาตุ polysaccharide กรดอะมิโน กรดไขมัน sterols คาร์โรทีนอยด์และ polyphenols ส่วนของ polyphenols นั้นจะถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง antitioxidative และการต้านการอักเสบ (Keusgen et al., 1997) สาร polyphenols ที่พบในสาหร่ายนั้นมีสารพวก phenolic ที่มีลักษณะเฉพาะของ polyphenols ที่ได้มาจากสาหร่าย คือ bromophenol (Nakai et al, 2006) นอกจากนี้ยังสามารถนำสาหร่ายมาบริโภคด้วยเนื่องจากสาหร่ายมีโปรตีนและไขมันไม่มากนัก มีแคลอรี่ต่ำและมีกากใยอาหารสูงแต่ต่างจากพืชบกตรงที่มีปริมาณวิตามินและเกลือแร่สูงและเป็นพวกที่ร่างกายมนุษย์ต้องการ

ภาพที่ 1 ลักษณะต้นสาหร่าย *Sargassum oligocystum*

ที่มา : http://media.photobucket.com/image/Sargassum/Reneecoles/sargassum.jpg

ประโยชน์ของสาหร่ายในด้านการแพทย์ใช้ลดความเป็นพิษของตับ Acetaminophen (AP) เป็นยาชนิดหนึ่งที่ทั่วโลกใช้เป็นยาแก้ปวด ยาลดไข้ โดยพิษ AP นั้นจะเป็นสาเหตุที่เซลล์ตับเปื่อย เฉพาะเซลล์ตับที่ถูกทำลาย โดยการเมตาบลิซึมของ AP ที่เมตาบอไลด์ ซึ่ง gluatathione (GSH) ในเซลล์ตับจะถูกทำลาย โดยพบว่าสาหร่าย *Sargassum sp.* หลายตัวนั้นมีคุณสมบัติใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกิจกรรม antioxidant โดยในสาหร่าย *Sargassum polycystum* มีสารสกัดที่มีผลต่อ AP ที่จะทำลายตับ (Raghavendran et al., 2005) นอกจากนั้นยังใช้ในการป้องกันโรคในคน เช่น โรคเริม (Herpes simplex) เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ (Herpes simplex virus type2, HSV-2) และผิวหนังที่เป็นแผล (Herpes simplex virus type1, HSV-1) พบมากในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษามีราคาแพง และไม่สามารถรักษาในระยะยาวได้ เพราะจะทำให้เชื้อมีการดื้อยา ทำให้เกิดการแฝงของโรคต่างๆ (Zhu et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์อย่างอื่นอย่างแพร่หลายเช่นการนำมาสกัดแล้วผสมในยา โดยสารที่ได้จากการสกัดคือ sulfated polysaccharide นำมาผสมในยาหลายชนิดโดยใน sulfated polysaccharide จะมีสารalginate เป็นองค์ประกอบจึงได้มี การตรวจสอบ alginate ที่พบในสาหร่าย กลุ่ม *Sargassum* sp. (Sousa et al., 2007) ซึ่งใช้ในการกระตุ้นประสาท ประสาทเสื่อม ในด้านการเกษตรช่วยป้องกันโรคสัตว์ การเกิดโรคในกุ้ง โดยสาเหตุอาจเกิดจากการที่บ่อเลี้ยงกุ้งมีสภาพเสื่อมโทรมลง เป็นพื้นที่สะสมของเชื้อโรค มีการนำสาหร่าย *Sargassum duplicatum* มาใช้เนื่องจากในสาหร่ายจะมีสารพวก polysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบเอ็นไซม์ phenoloxidase (PO) เป็นเอ็นไซม์ที่ช่วยในการทำลายเชื้อโรค โดยจะทำลายเชื้อพวกแบคทีเรียแกรมลบ และ ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้ง (Yeh et al., 2006)

ลักษณะและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง

เซลล์เม็ดเลือดเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งในเรื่องของการต่อต้านเชื้อโรค ทำลายเซลล์และสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจำอนุภาคแปลกปลอมที่มีความซับซ้อนน้อยกว่าเชื้อโรค (Vargas et al., 2005) จากการศึกษาเม็ดเลือดของกุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง 3 ชนิด คือ เซลล์ ไฮยาลิน (hyaline cells) มีขนาดความยาว 6.8 - 8.3 ไมครอน มีลักษณะเซลล์ผิวเรียบ รูปร่างกลมแบน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไซโตพลาสซึมน้อย ไม่พบการสร้างซูโดโปรเดีย และไมโครวิลไลบนผนังเซลล์ ขณะที่เม็ดเลือดชนิดเซลล์เซมิกรานูล (semi-granulocytes) มีลักษณะเซลล์คล้ายรูปกระสวย มีขนาดความยาว 9.0 – 14.2 ไมครอน กว้าง 4.2 – 6.8 ไมครอน มีกรานูลขนาดเล็กในเซลล์เล็กน้อย มีการสร้างซูโดโปรเดีย และมีไมโครวิลไลบนผิวเซลล์เพียงเล็กน้อย และเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซลล์ลาร์จกรานูล (granulocytes) มีขนาดความยาว 12.2 – 14.6 ไมครอน กว้าง 7.2 – 7.8 ไมครอน มีกรานูลขนาดใหญ่ภายในเซลล์มาก มีการสร้างซูโดโปเดียและมีไมโครวิลไลบนผนังเซลล์จำนวนมาก (กิจการ และคณะ, 2543) ซึ่งจากการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus penicilatus, P. monodon และ P. japonicas* โดยใช้ flow cytometer ของ (Yip and Wong. 2002) พบว่ามีเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินประมาณ 20 – 30 เปอร์เซ็นต์ ชนิดเซมิกรานูลประมาณ 37 – 42 เปอร์เซ็นต์ และชนิดลาร์จกรานูลประมาณ 34 – 46 เปอร์เซ็นต์

เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเซลล์เม็ดเลือดที่มีกรานูลมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Destoumieux et al, 2000) พบ penaeidin ซึ่งเป็น antimicrobial peptides แสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้ง โดยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus vannamei* ซึ่งเก็บสะสมอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูล ส่วนใหญ่จะพบในเซลล์เม็ดเลือดชนิดลาร์จกรานูล และพบในเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลเพียงเล็กน้อย แต่ไม่พบในเซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลิน (Destoumieux et al, 2000) และนอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ในเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มี กรานูลของพวกครัซเตเชียน ซึ่งจาการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Litopenaeus vannamei, Farfantepenaeus californiensis และ Litopenaeus stylirostris* ของ (Vargas et al, 2005) พบว่ามีโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดชนิดลาร์จกรานูลถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลมี 25 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เกิดกิจกรรมของฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดชนิดลาร์จกรานูลสูงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้ง

1.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะโพสลาวา 15

1.2 ถังพลาสติกกลมขนาด 100 ลิตร

1.3 หัวทรายและสายลม

1.4 สายยางดูดตะกอน

1.5 อาหารกุ้งสำเร็จรูป

1.6 เครื่องวัดความเค็ม (Salinometer)

1.7 ชุดกรองน้ำ

1.8 ปั๊มลม

1.9 ปั๊มน้ำ

2. อุปกรณ์ในการเตรียมสารสกัด

2.1 สาหร่าย *Sargassum oligocystum*

2.2 เตาให้ความร้อน (hot plate)

2.3 ตู้อบ (hot air oven)

2.4 เครื่องแก้วขนาดต่างๆ (beaker)

2.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.6 เครื่องปั่นสาหร่าย

3. อุปกรณ์ในการเตรียมอาหาร

3.1 อาหารกุ้งสำเร็จรูป เบอร์ 3

3.2 สารสกัดที่ได้จากสาหร่าย *Sargassum oligocystum*

3.3 ถาดใส่อาหาร

3.4 กระบอกฉีดน้ำ

3.5 หัวเชื้อ อะมิโน

3.6 ตู้อบ (hot air oven)

4. อุปกรณ์ในการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง

4.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

4.2 เข็มฉีดยา (Syringe) เบอร์ 25 G

4.3 น้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 กระติกเก็บความเย็น

4.5 eppendorf

4.6 สไลด์นับจำนวนเม็ดเลือด

4.7 กล้องจุลทรรศน์

4.8 ไมโครปิเปต (Micropipette)

4.9 โซเดียมซิเตรท 10 เปอร์เซ็นต์

5. อุปกรณ์ในการเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ

5.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

5.2 เชื้อ *Vibrio harveyi*

5.3 เครื่องแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อ

5.4 เครื่องแก้วปรับปริมาตร

5.5 ไมโครปิเปต (Micropipette)

5.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design : CRD) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ใช้กุ้งทดลองถังละ 30 ตัว

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคลุม ให้กุ้งกินอาหารที่ไม่เคลือบสารสกัดจาก *Sargassum oligocystum*

ชุดการทดลองที่ 2 ให้กุ้งกินอาหารที่เคลือบสารสกัดจาก *Sargassum oligocystum* ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ให้กุ้งกินอาหารที่เคลือบสารสกัดจาก *Sargassum oligocystum* ที่ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ให้กุ้งกินอาหารที่เคลือบสารสกัดจาก *Sargassum oligocystum* ที่ระดับความเข้มข้น 100 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม

วิธีการทดลอง

1.การเตรียมสัตว์ทดลอง

1.1 นำกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ระยะโพสลาวา 15 มาเลี้ยงปรับสภาพในโรงเรือน เป็นเวลา 1สัปดาห์ ระหว่างการปรับสภาพให้กุ้งขาวกินอาหารสำเร็จรูปจนอิ่ม 3ครั้งต่อวัน แล้วเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายน้ำ 20 %ทุกวัน ความเค็มที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง 5ส่วนในพันส่วนตลอดการทดลอง เมื่อครบเวลาคัดขนาดกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาทดลอง

2. การสกัดสารจากสาหร่าย *Sargassum oligocystum*

2.1 ล้างทำความสะอาดสาหร่าย *Sargassum oligocystum* ในน้ำจืด ให้หมดความเค็ม นำสาหร่าย *Sargassum oligocystum* ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 นำสาหร่ายที่อบแล้ว มาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด

2.3 นำสาหร่ายไปต้มบน hot plate ที่เบอร์ 2 ครึ่ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ได้สารสกัด 50 มิลลิลิตร

2.4 นำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง

3. การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

3.1 นำสารกสัดที่ได้จากสาหร่าย ในระดับ 0 , 1, 10, 100 กรัมฉีดพ่นใส่อาหารที่เตรียมไว้

3.2 นำอาหารที่ฉีดสารสกัดแล้วมาผึ่งให้แห้ง

3.3 นำอาหารที่ฉีดสารสกัดแล้วมาฉีด (amino tonic) ซ้ำเพื่อดึงดูดให้กุ้งกินอาหาร

3.4 นำอาหารไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.5 นำอาหารที่ได้ไปให้กุ้งกินจนอิ่ม วันละ 3 มื้อ เป็นเวลา 2 เดือน

4. การตรวจสอบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

4.1 การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรท 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) ที่บรรจุในกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และใช้เข็มเบอร์ 25 G นำไปเจาะเลือดกุ้งที่ตำแหน่งโคนขาคู่ที่ 4 โดยใช้อัตราส่วนของเลือดกุ้งต่อสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัวเท่ากับ 1 ต่อ 1 แล้วเก็บในกระติกเก็บความเย็นทันที หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดซึ่งมีชนิด granulocyte และ hyaline ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยนำเชื้อมาจากสถาบันส่งเสริมวิทยาศาสตร์แห่งชาติ มาใช้ในการทดสอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 เพิ่มจำนวนเชื้อ *Vibrio harveyi* ใน Trypticase Soy Broth (TSB) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ผสมอยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง

4.2.2 ทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ของเชื้อในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่อยู่ใน TSB ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทอาหารทิ้ง แล้วล้างเชื้อด้วย 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหมอหนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นเติม 2 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตรเท่ากับของ TSB แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วย 2 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจาง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจางของเชื้อไปหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการหยดเชื้อ 10 จุด ใช้ปริมาตรจุดละ 10 ไมโครลิตร บน Nutrient agar (NA) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเชื้อประมาณ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ ทำการคำนวณหาจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตราฐานและหาสมการเส้นตรง

4.2.3 ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยการใช้เชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อ รุนแรงที่สุด (Mazumder et al., 2001) ทำการล้างเซลล์ของเชื้อตามวิธีการข้อ

4.2.2 หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรแล้วหาจำนวนเซลล์โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐานและทำการทดสอบดังนี้

4.2.3.1 นำถังพลาสติกขนาด 15 ลิตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้วมาใส่น้ำเค็มที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 10 ลิตรโดยใส่กุ้งที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่ายทะเล *Sargassum oligocystum* แล้วระยะเวลา 2 เดือน ถังละ 3 ตัว โดยทำ 4 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง ให้อากาศตลอดเวลา

4.2.3.2 นำเชื้อ *Vibrio harveyi* มาใส่ลงในถังให้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/ml จากนั้นสังเกตพฤติกรรม และบันทึกผลอัตราการรอดชีวิต ที่เวลา 24, 48, 72. 96 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งชนิด granulocyte, semi- granulocyte และ hyaline ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. บันทึกอัตราการรอกชีวิตของกุ้งหลังจากได้รับเชื้อ 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์และประเมินทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

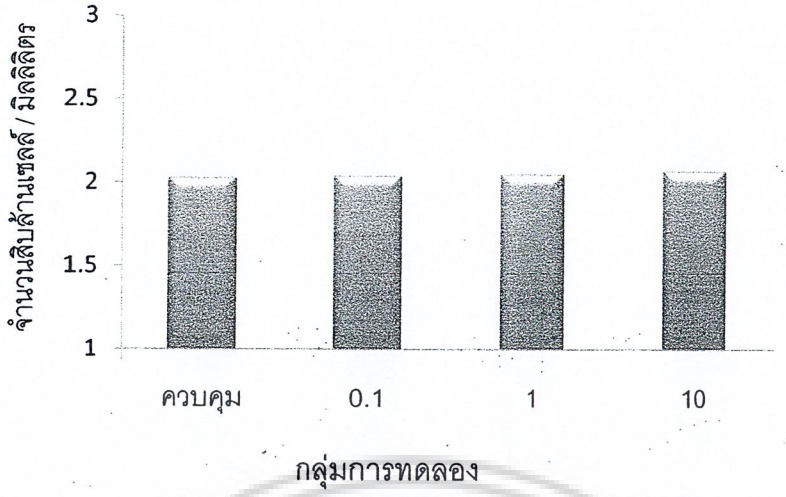
จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวชนิด hyaline ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ที่ความเข้มเข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ โดยมีปริมาณ 4.42 ± 0.03 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (17.56 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ซึ่งมีปริมาตรสูงกว่ากลุ่มควบคุมคือปริมาณ 0.7±0.01 (3.86 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) และ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือปริมาณ 1.3±0.02 (5.99 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือปริมาณ 3.1±0.02 (15.42 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวชนิด granulocyte ของทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) คือในกลุ่มควบคุมมีปริมาตร 2.03±0.22 (96.2 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือปริมาตร 2.04±0.18 (94.1 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด)กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือปริมาตร 2.05±1.50 (83.95 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือปริมาณ 2.07±0.17 (82.44 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด) ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3) และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวของกลุ่มที่ได้สารสกัดเข้มข้น 10 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) คือมีปริมาตร 2.10±0.23, 2.17±0.19, 2.36±0.29 และ 2.51±0.15 ล้านเซลล์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 1 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

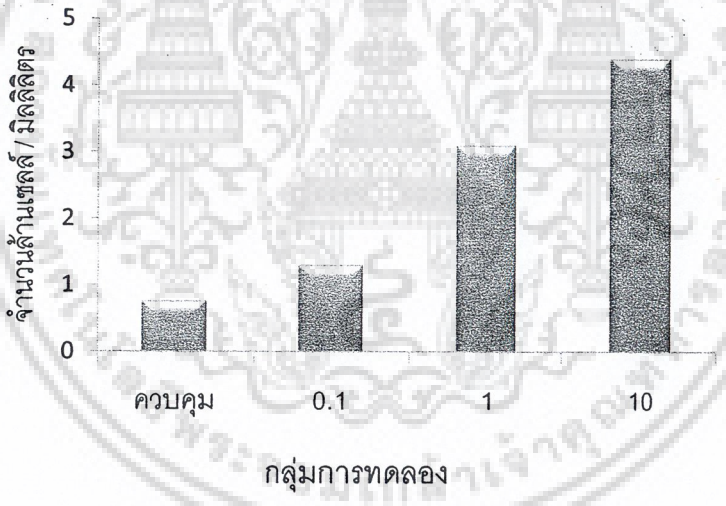
กลุ่มการทดลอง	จำนวนเซลล์ ($x10^7$เซลล์) / มิลลิลิตร		
	Hyaline	Granulocyte	รวม
ควบคุม	0.7±0.01[a]	2.03±0.22[a]	2.10±0.23[a]
0.1	1.3±0.02[a]	2.04±0.18[a]	2.17±0.19[a]
1	3.1±0.02[b]	2.05±1.50[a]	2.36±0.29[a]
10	4.4±0.03[c]	2.07±0.17[a]	2.51±0.15[a]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

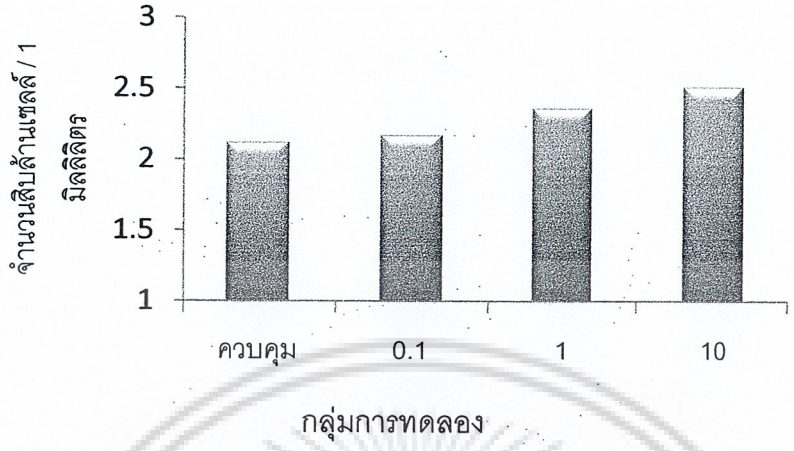


ภาพที่ 2 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิด granulocyte



ภาพที่ 3 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวชนิด hyaline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวรวมทั้งหมด

จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่าที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ กุ้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิตที่ 100.00±00, เปอร์เซ็นต์ หลังจากใส่เชื้อ 72 ชั่วโมง กุ้งในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิต 80.00±0.11, 100.00±00, 100.00±00 และ 100.00±00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากใส่เชื้อ 96 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ กุ้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิต 80.00±0.11, 100.00±00, 100.00±00 และ 100.00±00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannmei*) ที่เวลาต่างๆกันหลังจากการใส่เชื้อ *Vibrio harveyi*

กลุ่มการทดลอง	อัตราการรอดเฉลี่ย (%) ที่เวลา (ชั่วโมง)			
	24	48	72	96
ควบคุม	100±0.00[a]	100±0.00[a]	80.0±0.11[a]	80.0±0.11[a]
0.1	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[b]	100±0.00[b]
1	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[b]	100±0.00[b]
10	100±0.00[a]	100±0.00[a]	100±0.00[b]	100±0.00[b]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

การเจริญเติบโตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannmei*) ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S.oligocystum* ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวหลังสิ้นสุดการทดลองเป็น 1.05±0.11, 1.02±0.10, 0.86±0.03 และ 0.85±0.03 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	น้ำหนักกุ้งขาว (กรัม) / ตัว	
	เริ่มต้นการทดลอง	สิ้นสุดการทดลอง
ควบคุม	0.07±0.00[a]	1.05±0.11[a]
0.1	0.06±0.01[a]	1.02±0.10[a]
1	0.06±0.00[a]	0.86±0.03[a]
10	0.06±0.01[a]	0.85±0.03[a]

*ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์น้ำในกลุ่มครัสเตเชียนอย่างกุ้ง จะมีเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันตัวเอง คือโปรฟีนอลออกซิเดส ที่พบมากในฮีโมไซท์ และเอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้เมื่อได้รับ Polysaccharide พวก β-glucan จากยีสต์ (Sung et al., 1994) ลามินารินจากสาหร่าย (Hernandez-Lopez et al., 1996) ด้วยผลการทดลองที่พบว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย จะมีความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้กินสารสกัด ในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรมีการตรวจวัดปริมาณ โปรฟีนอลออกซิเดส ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) พบว่ากุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ที่ความระดับ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดมากที่สุดและชนิดของเซลล์เม็ดเลือดที่พบจากการตรวจนับเป็นชนิด granulocyte และ hyaline

จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาว พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* ที่ความระดับ 0.1, 1 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายเท่ากัน คือไม่มีการตายจากการทดลองการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ ทั้ง 96 ชั่วโมง ส่วนการเจริญเติบโตของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองนี้จึงสามารถกล่าวได้ว่าผลของการเสริมอาหาร จากสารสกัดจากสาหร่าย *Sargassum oligocystum* ทุกระดับ สามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi* ดีที่สุด และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูล ให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudolf Hoffmann. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : III : การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ) : 589-596.

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนท์. 2527. สาหร่าย. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 205-206.

Destoumieux, D., M. Munoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps, and E. Bachere. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Cell Science 113:461-469.

Glombitza, K-W., and M. Keusgen. 1995. Fuhalols and deshudroxyfuhalols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. Phytochemistry. 38:987-995.

Hernandez-Lopez, J., T. Galvan, and F. Vargas-Alborea. 1996. Activation of the prophendoxidase system of the brown shrimp (Penaeus califoniensis Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology. 1130:61-66.

Khanjanapar, L., and H. ogawa. 1995. Commom Seaweed and seagrasses of Thailand. Faculty of Fisheries Kasetsart University. 82-84.

Keusgen, M., K-W. Glomeitza. 1995. Phlorethols, fuhalols and their derivatives from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. Phytochemistry. 38:985-985.

Keusgen, M., Falk, J. A. Waltert, and K. –W. Glomeitaz. 1997. A phloroglucinol derivative from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. Phytochemistry. 46:341-345.

Mazumder, R., K. Ganguly, S. G. Dastidae, A. N. Chakrabarty. 2001. Trifluoperazine: a broad spectrum bactericide especially active on Staphylococci and Vibrios. Antimicrobial Agents 18:403-406.

Noiraksa, T., T. Ajisaka, and C. Kaewsuralikhit. 2006. Species of Sargassum in the East Coast of the Gulf of Thailand. Science Asia. 32:99-106.

Raghavendran, H. R. B., A. Sathivel, and T. Devaki. 2005. Antioxidant effect of *Sargassum polycystum* (phaeophyceae) against acetaminophen induced changes in hepatic mitochondrial enzymes during toxic hepatitis Chemosphere 61:276-281.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sousa, A. P. A., M. R. Torres, C. Pessoa, M. O. Moraes, F. D. R. Fillho, A. P. N. N. Alves and L. V. C. –Lotufo. 2007. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. Carbohydrate Polymer. 69:7-13.

Sung, H. H., G. H. Kou, and Y. L. Sung. 1994. Vibriosis resistance induced by qlucan treatment in tiger shrimp (Penaeus monodon). Fish Pathology. 29:11-17.

Vargas-Albores, F., T. Gollas-Galvan, and J. Hemandez-Lopez. 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis, Litopenaeus vannamei and L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. Aquaculture Resesearch 36:352-360.

Yeh, S.-T., C.-S. Lee, and J.-C. Chen. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed sargasum duplicatum via immersion and injection enchanecs the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 20:332-345.

Yip, E. C. H., and J. T. Y. Wong. 2002. Fluorescence activates cell-sorting of haemocytes in Penaeid prawns. Aquaculture 204:25-31.

Zhu, W., L. C. M. Chiu, V. E. C. Ooi, P. K. S. Chan, and P. O. Ang, Jr. 2004. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. International Lournal of Antimicrobial Agents. 24:81-85.

http://media.photobucket.com/image/Sargassum/Reneecoles/sargassum.jpg 19 May 2009.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ไม่ได้รับสารสกัด *Sargassum oligocystum* (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มควบคุม	จำนวนเซลล์($x10^5$)ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		
	Granulocyte	Hyaline	รวม
1	203	12	215
2	186	1	187
3	233.5	9.5	243
4	188.5	8.5	197

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัด *Sargassum oligocystum* เข้มข้น 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

1 กรัม	จำนวนเซลล์($x10^5$)ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		
	Granulocyte	Hyaline	รวม
1	130	7	137
2	239.5	16	255.5
3	253	10.5	263.5
4	212.5	19.5	232

ตารางผนวกที่ 3 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัด *Sargassum oligocystum* เข้มข้น 1กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

10 กรัม	จำนวนเซลล์($x10^5$)ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		
	Granulocyte	Hyaline	รวม
1	214.5	26.5	241
2	170.5	30.5	187
3	190.5	41	231
4	77	36	109

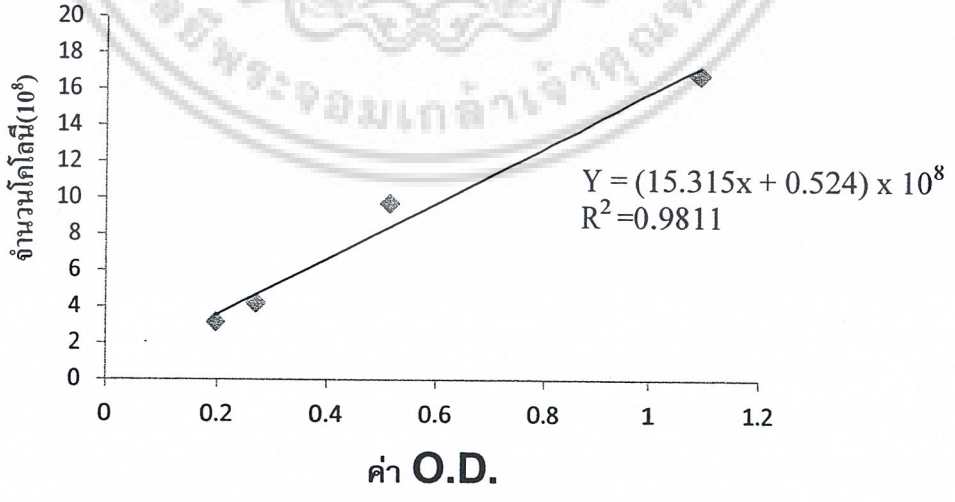
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับสารสกัด *Sargassum oligocystum* เข้มข้น 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

100 กรัม	จำนวนเซลล์($x10^5$)ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร		
	Granulocyte	Hyaline	รวม
1	368	28.5	396.5
2	479	32	511
3	231	19	250
4	443	29	472

ตารางผนวกที่ 5 ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อ *Vibrio harveyi* และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

ค่า O.D.	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย ($x10^8$)
0.197	3.16
0.272	4.2
0.515	9.7
1.09	16.8



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Vibrio harveyi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) หลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่เวลาต่างๆกัน

กลุ่มการทดลอง	อัตราการรอด (%) ที่เวลา (ชั่วโมง)			
	24	48	72	96
ควบคุม (1)	100	100	66	66
ควบคุม (2)	100	100	100	100
ควบคุม (3)	100	100	66	66
ควบคุม (4)	100	100	100	100
0.1 กรัม (1)	100	100	100	100
0.1 กรัม (2)	100	100	100	100
0.1 กรัม (3)	100	100	100	100
0.1 กรัม (4)	100	100	100	100
1 กรัม (1)	100	100	100	100
1 กรัม (2)	100	100	100	100
1 กรัม (3)	100	100	100	100
1 กรัม (4)	100	100	100	100
10 กรัม (1)	100	100	100	100
10 กรัม (2)	100	100	100	100
10 กรัม (3)	100	100	100	100
10 กรัม (4)	100	100	100	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว *(Litopenaeus Vannamei)* เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	น้ำหนักกุ้งขาว (กรัม)	
	เริ่มต้น	สุดท้าย
ควบคุม (1)	0.07	0.79
ควบคุม (2)	0.06	1.26
ควบคุม (3)	0.06	0.92
ควบคุม (4)	0.09	1.26
0.1 กรัม (1)	0.07	1.34
0.1 กรัม (2)	0.06	1.01
0.1 กรัม (3)	0.03	0.88
0.1 กรัม (4)	0.09	0.87
1 กรัม (1)	0.05	0.93
1 กรัม (2)	0.07	0.86
1 กรัม (3)	0.07	0.76
1 กรัม (4)	0.05	0.91
10 กรัม (1)	0.03	0.83
10 กรัม (2)	0.1	0.89
10 กรัม (3)	0.06	0.94
10 กรัม (4)	0.08	0.77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้