ผลการใช้กรดเบนโซอิกเป็นอาหารเสริมต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

นายพิทยาธร ตัณฑวณิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2599-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF BENZOIC ACID AS FEED SUPPLEMENT ON GROWTH OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*

Mr. Pittayatorn Tantavanich

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-2599-6

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลการใช้กรดเบนโซอิกเป็นอาหารเสริมต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*
โดย	นายพิทยาธร ตัณฑวณิช
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

พิทยาธร ตัณฑวณิช: ผลการใช้กรดเบนโซอิกเป็นอาหารเสริมต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (THE EFFECT OF BENZOIC ACID AS FEED SUPPLEMENT ON GROWTH OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ หน้า. ISBN 974-14-2599-6

การเสริมกรดเบนโซอิกในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ในตู้กระจก และบ่อปูนซีเมนต์ พบว่ากรดเบนโซอิกไม่กระตุ้นการเติบโตของกุ้งกุลาดำในการเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 ครั้ง และไม่พบความแตกต่างของอัตราการเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้งระหว่างกุ้งกลุ่มที่ได้รับกรดเบนโซอิกและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับกรดเบนโซอิก จากการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในกุ้งหลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 และ 2 เป็นเวลา 90 วัน ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายสะสมของกุ้งทุกกลุ่ม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับบ่อปูนซีเมนต์โดยใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 เป็นชุดควบคุมบวก พบว่ากรดเบนโซอิกไม่สามารถกระตุ้นการเติบโตของกุ้งกุลาดำ โดยเมื่อกุ้งอายุครบ 45 วัน กุ้งกลุ่มที่ได้รับกรดเบนโซอิกมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยต่ำกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม และ กลุ่มควบคุมบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างของการรอดชีวิตของกุ้งระหว่างกลุ่มทดลอง จากการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 หลังการเลี้ยงกุ้ง 75 วัน เป็นเวลา 7 วัน พบอัตราการตายสะสมของกุ้งกลุ่มกรดเบนโซอิกสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค พบว่าก่อนเหนี่ยวนำ กุ้งกลุ่มกรดเบนโซอิกมีปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก และไม่พบความแตกต่างของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด ในขณะที่หลังการเหนี่ยวนำกุ้งกลุ่มกรดเบนโซอิกมีปริมาณเม็ดเลือดรวมและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดต่ำกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก โดยพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงจาก ~10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็น ~10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดสูงขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนการเหนี่ยวนำ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549

KEY WORDS: BENZOIC ACID/BACILLUS/PROBIOTICS/BLACK TIGER SHRIMP/FEED SUPPLEMENT / *Vibrio harveyi* 639

PITTAYATORN TANTAVANICH: THE EFFECT OF BENZOIC ACID AS FEED SUPPLEMENT ON GROWTH OF BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*
Advisor : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D.,pp. ISBN 974-14-2599-6

Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultivated in aquaria and cement tanks, were fed with commercial feed supplemented with benzoic acid in order to find out its influence on shrimp growth and survival. Growth rate and the survival of benzoic acid shrimp were not different compare to those of the control groups. Challenge tests on shrimp after being tainted with *Vibrio harveyi* strain 639 revealed that cumulative mortality of the benzoic acid fed shrimps cultivated after 90 days were not different compare to those of the control group. Recultivate using probiotic bacteria, *Bacillus* sp. S11, as the positive control was performed. Growth rate and the survival of 45 days cultivated-benzoic acid shrimp were significantly lower ($P<0.05$) than those of the control and the positive control groups. Thus, it can be concluded that benzoic acid cannot stimulate growth of the shrimp. However, the shrimp survival of benzoic acid treatment was not different compare to those of the controls. Challenge test on shrimp with *Vibrio harveyi* strain 639 showed the cumulative mortality of 75- days cultivated benzoic acid fed shrimp for 7 days were significantly higher ($P<0.05$) than those of the control group. Immunity testing of total hemocyte and antibacterial activity on shrimp before and after 2 days of challenge test was conducted. The total hemocyte count of the benzoic acid shrimp before challenging were lower than those of the controls, while antibacterial activity was not different. After the challenge test, the total hemocyte count and antibacterial activity of the benzoic acid shrimp were lower than those of the control and the positive control. Decrease in total hemocyte from ~10^8 cell ml^{-1} to ~10^7 cell ml^{-1} and increase in antibacterial activity after challenge tests among shrimp in every treatment were observed.

Department Microbiology Student's Signature.....
Field of Study Industrial Microbiology Advisor's Signature.....
Academic Year 2006

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้โดยได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยา รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆและน้องๆ ภาคจุลชีววิทยาทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ และช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและสารเคมีในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณเสรี ดอนเหนือ และเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลทุกๆท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

ขอขอบคุณ ศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย-ศรีนครินทร์วิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณสมบัติ รักประทานพร รวมทั้งพี่ทุกๆคนในห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความรู้เรื่อง immunohistochemistry และให้คำแนะนำช่วยเหลือในการทำวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา คุณปาริฉัตร ราวีศรี คุณไพฑูรย์ ทวีรุจิโรจน์ คุณพลพิสิฐ อุทิศวรรณกุล และเพื่อนพี่น้องทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือและสนับสนุน ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… จ
กิตติกรรมประกาศ……...ฉ
สารบัญ…… ช
สารบัญตาราง……..ซ
สารบัญภาพ……....ญ
บทที่
1 บทนำ
1.1 ความเป็นมา…….. ……..1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……..……3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
2 วารสารปริทัศน์
2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ……..……5
2.2 โรคของกุ้งกุลาดำและการป้องกันรักษา……..15
2.3 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน……..……21
2.4 กรดเบนโซอิก(Benzoic acid)……..……25
2.5 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…..……..……26
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง
3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ……..……28
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย……...……...29
3.3 สารเคมีสำหรับ Immunohistochemistry……29
3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....30
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย……30
4 ผลการทดลอง……..……..39
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง……..……...62
รายการอ้างอิง……..……..……68
ภาคผนวก ……..……...74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……..……137

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การส่งออกกุ้งของไทย เดือนมกราคม – ธันวาคม ปี 2547 และ ปี 2548	2
2	ปริมาณการใช้กรดเบนโซอิกเจือปนอาหาร	27
3	คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 1	42
4	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 1	42
5	คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 2	47
6	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 2	47
7	คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3	52
8	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3	53
9	ปริมาณแบคทีเรียในไส้กุ้งระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3	53
10	ปริมาณกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งในการทดลองครั้งที่ 2	83
11	ปริมาณ *Bacillus* sp. S11 ในอาหารกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3	84
12	ปริมาณกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3	84
13	อิทธิพลของกรดเบนโซอิก ต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila*	85
14	อิทธิพลของกรดเบนโซอิก ต่อการเจริญของ *Vibrio harveyi* 639	85
15	ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำ การทดลองครั้งที่ 1	86
16	ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำ การทดลองครั้งที่ 2	86
17	ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำ การทดลองครั้งที่ 3	87
18	การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำหลังจากทดลองครั้งที่ 1 และ 2	87
19	การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำหลังจากทดลองครั้งที่ 3	87
20	การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 1	88
21	การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 2	88
22	การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 3	89
23	ปริมาณเชื้อในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรคจากการทดลองครั้งที่ 1	89
24	ปริมาณเชื้อในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรคจากการทดลองครั้งที่ 2	90
25	ปริมาณเชื้อในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรคจากการทดลองครั้งที่ 3	90
26	ปริมาณ *Vibrio harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 3	90

ตารางที่ หน้า

27 ปริมาณเม็ดเลือด การทดลองครั้งที่ 3.....91
28 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในพลาสมากุ้งกุลาดำในการทดลองครั้งที่ 3.....91
29 รายละเอียดปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้ง การทดลองครั้งที่ 1 92
30 รายละเอียดปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้ง การทดลองครั้งที่ 2 93
31 รายละเอียดปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้ง การทดลองครั้งที่ 3 94
32 รายละเอียดคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1.....95
33 รายละเอียดคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2.....99
34 รายละเอียดคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3.....103
35 การวิเคราะห์ทางสถิติ การเติบโตของกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 1.....107
36 การวิเคราะห์ทางสถิติ การรอดชีวิตของกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 1.....113
37 การวิเคราะห์ทางสถิติ การตายสะสมของกุ้งหลังชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 1.....114
38 การวิเคราะห์ทางสถิติ การเติบโตของกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 2.....116
39 การวิเคราะห์ทางสถิติ การรอดชีวิตของกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 2.....119
40 การวิเคราะห์ทางสถิติ การตายสะสมของกุ้งหลังชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 2.....120
41 การวิเคราะห์ทางสถิติ การเติบโตของกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 3.....123
42 การวิเคราะห์ทางสถิติ การรอดชีวิตของกุ้ง ในการทดลองครั้งที่ 3.....128
43 การวิเคราะห์ทางสถิติ การตายสะสมของกุ้งหลังชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 3.....128
44 การวิเคราะห์ทางสถิติ ปริมาณเม็ดเลือดก่อนการชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 3.....131
45 การวิเคราะห์ทางสถิติ ปริมาณเม็ดเลือดหลังการชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 3.....132
46 การวิเคราะห์ทางสถิติ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อนการชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 3.....134
47 การวิเคราะห์ทางสถิติ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลังการชักนำให้เกิดโรค
ในการทดลองครั้งที่ 3.....135

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกทั่วไปของกุ้งกุลาดำ	6
2	วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ	10
3	สูตรโครงสร้างกรดเบนโซอิก	25
4	ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของกรดเบนโซอิกต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila*	39
5	ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของกรดเบนโซอิกต่อการเจริญของ *Vibrio harveyi* 639	40
6	น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดลองครั้งที่ 1	43
7	การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของการทดลองครั้งที่ 1	43
8	การตายสะสมของกุ้งกุลาดำหลังการชักนำให้เกิดโรค ของการทดลองครั้งที่ 1	45
9	ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค จากการทดลองครั้งที่ 1	45
10	น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดลองครั้งที่ 2	48
11	การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของการทดลองครั้งที่ 2	48
12	การตายสะสมของกุ้งกุลาดำหลังการชักนำให้เกิดโรค ของการทดลองครั้งที่ 2	50
13	ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค จากการทดลองครั้งที่ 2	50
14	น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดลองครั้งที่ 3	54
15	การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ของการทดลองครั้งที่ 3	55
16	การตายสะสมของกุ้งกุลาดำหลังการชักนำให้เกิดโรค ของการทดลองครั้งที่ 3	56
17	ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค จากการทดลองครั้งที่ 3	57
18	ปริมาณ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค จากการทดลองครั้งที่ 3	57
19	แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ในการทดลองครั้งที่ 3	59
20	ความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคจากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ในเลือดกุ้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 3	59

รูปที่ หน้า

21 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณตับ.....60
22 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณอวัยวะระบบน้ำเหลือง.....60
23 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณเหงือก.....61
24 โครมาโทแกรมของกรดเบนโซอิก 83

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากปัจจัยหลายๆ ประการทั้งทางด้านภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงและเพาะพันธุ์กุ้ง ตลอดจนทางรัฐบาลได้เล็งเห็นถึงความได้เปรียบข้อนี้ จึงสนับสนุนให้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์และวิธีการเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศมาโดยตลอด ในปัจจุบันประเทศไทยสามารถพัฒนากุ้งสายพันธุ์ใหม่ที่ง่ายต่อการเลี้ยง มีความต้านทานโรคสูง และเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ พัฒนากระบวนการเลี้ยงกุ้งตามมาตรฐานกรมประมง 2 แนวทางคือ แนวทางในการจัดการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ดี หรือ Good Aquaculture Practice (GAP) และแนวทางการจัดการสิ่งแวดล้อมเพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน หรือ Code of Conduct (COC) จนนำไปสู่ระบบ Biosecure System หรือเทคโนโลยีการเลี้ยงในระบบโรงเรือนปิดที่เน้นการควบคุมและจัดการเพื่อป้องกันมิให้โรคและพาหะนำโรคกุ้งทุกชนิดเล็ดลอดเข้าสู่ระบบการเลี้ยง ขั้นตอนการแปรรูปกุ้ง โรงงานผลิตกุ้งในประเทศไทยสามารถผลิตผลิตภัณฑ์กุ้งได้ตามมาตรฐานสากลไม่ว่าจะเป็น GMP, HACCP, ISO 9001: 2000, ISO 14001 ทำให้ผลิตภัณฑ์กุ้งของไทยสามารถตรวจสอบย้อนหลังกลับไปถึงแหล่งที่มา (Traceability) ได้อีกด้วย ประเทศไทยจึงได้ชื่อว่าเป็นประเทศผู้ผลิตกุ้งรายใหญ่ที่สุดในโลก และผลิตภัณฑ์กุ้งจากประเทศไทยยังจัดว่ามีคุณภาพระดับมาตรฐานสากล สร้างรายได้ให้แก่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยเป็นผลผลิตภัณฑ์จากกุ้งขาววานาไมประมาณ 90% และ กุ้งกุลาดำประมาณ 10%

ปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย คือ โรคระบาดอันเกิดจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เช่น โรคหัวเหลือง (Yellow Head Disease) จาก วายบีวีไวรัส (Yellowhead baculovirus), โรคตัวแดงดวงขาว (White spot disease) จาก เอสอีเอ็มบีวีไวรัส (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus), โรคเรืองแสง (Luminescent disease) จากเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.) เป็นต้น ซึ่งสร้างความเสียหายแก่ฟาร์มกุ้งเป็นอันมาก เกษตรกรนิยมให้สารปฏิชีวนะผสมอาหารกุ้งเพื่อป้องกันโรคเหล่านี้ ทำให้เกิดสารปฏิชีวนะจำพวกคลอแรมฟินิคอลและไนโตรฟูแรนตกค้างในเนื้อกุ้ง ส่งผลให้สินค้ากุ้งของไทยถูกกีดกันจากตลาดผู้นำเข้ากุ้งหลายประเทศโดยเฉพาะในปี 2545 ตลาดในสหภาพยุโรป (อียู) ซึ่งกำหนดนโยบาย ซีโร่ทอเลอแรนซ์ (zero tolerance) นั่นคือจะต้องไม่มีสารคลอแรมฟินิคอลและไนโตรฟูแรนตกค้างอยู่

ในเนื้อสัตว์เพื่อการบริโภคเลย ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์กุ้งส่งออกในช่วงนั้นเป็นอย่างมาก มูลค่าการส่งออกกุ้งของไทยในปีนั้นลดลงกว่า 30% แต่จากการดูแลเอาใจใส่และมาตรการที่เข้มงวดของภาครัฐ ในการห้ามนำเข้าสารปฏิชีวนะต้องห้ามและจับกุมผู้จำหน่ายสารปฏิชีวนะผิดกฎหมายอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงการร่วมมือกันของเหล่าบรรดาเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ทำให้ปัญหาที่เกิดดังกล่าวคลี่คลายไปในทางที่ดี ประเทศไทยต้องระมัดระวังและเข้มงวดเรื่องการใช้สารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งมาตั้งแต่นั้น

ปลายปี 2547 เกิดวิกฤตการณ์คลื่นสึนามิ พัดถล่มชายฝั่งทะเลอันดามันใน 6 จังหวัดภาคใต้ของไทย ก่อให้เกิดความสูญเสียในชีวิตและทรัพย์สินอย่างประเมินค่ามิได้ ในส่วนของอุตสาหกรรมกุ้ง สึนามิได้ถล่มโรงเพาะพักลูกกุ้ง ซึ่งถือเป็นต้นน้ำแหล่งผลิตลูกกุ้งของประเทศได้รับความเสียหายยับเยิน นอกจากนี้ในช่วงปี 2548 ผู้เลี้ยงกุ้งยังต้องเผชิญกับวิกฤตการณ์ราคากุ้ง ทั้งราคากุ้งกุลาดำและกุ้งขาวตกต่ำลงอย่างไม่เคยเป็นมาก่อนในประวัติการเพาะเลี้ยงกุ้งของไทย สืบเนื่องมาจากความไม่มั่นใจในภาษี เอดี ของสหรัฐ ซึ่งเก็บภาษีกุ้งนำเข้าจากไทยสูงถึง 5.95 % และยังต้องวางเงินค้ำประกันการนำเข้า ที่เรียกว่า คอนทินิวอัส บอร์น (Continuous bond) ในวงเงินที่สูงมาก (ข่าวกุ้ง, ธ.ค. 2548) ทำให้ผู้ส่งออกกุ้งหลายรายหยุดชะงักการส่งออกกุ้งเนื่องจากไม่สามารถนำเงินไปวางค้ำประกันได้ แต่ถึงกระนั้นก็ตาม ทั้งปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งในปี 2548 โดยรวมยังคงมากกว่าปี 2547 โดยในปี 2548 ประเทศไทยส่งออกกุ้งไปยังตลาดต่างประเทศทั้งหมด 282,932 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 71,582.00 ล้านบาท มากกว่าของปี 2547 ทั้งในแง่ปริมาณและมูลค่า โดยปริมาณเพิ่มขึ้น 17.48% ส่วนมูลค่าเพิ่มขึ้น 6.38% ดังแสดงในตารางที่ 1 (ข่าวกุ้ง, ม.ค.2549)

ตารางที่ 1 การส่งออกกุ้งของไทย เดือนมกราคม – ธันวาคม ปี 2547 และ ปี 2548

ประเทศ / กลุ่มประเทศ	ม.ค.47 - ธ.ค.47		ม.ค.48 - ธ.ค.48		% แตกต่าง	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
เอเชีย	**74,477**	**22,598**	**82,802**	**22,110**	**11.18**	**-2.16**
จีน	2,844	640	3,302	594	16.10	-7.19
ญี่ปุ่น	46,264	16,261	49,409	15,611	6.80	-4.00
อื่นๆ	25,369	5,697	30,091	5,905	18.61	3.65
สหรัฐอเมริกา	**131,691**	**35,794**	**158,185**	**39,370**	**20.12**	**9.99**
อียู	**8,001**	**2,130**	**11,686**	**2,804**	**46.06**	**31.64**
ออสเตรเลีย	**8,604**	**2,075**	**10,421**	**2,401**	**21.12**	**15.71**
อื่น ๆ	**18,068**	**4,692**	**19,838**	**4,897**	**13.51**	**6.69**
รวม	**240,841**	**67,289**	**282,932**	**71,582**	**17.48**	**6.38**

ที่มา : กรมศุลกากร, หน่วย: เมตริกตัน, มูลค่า: ล้านบาท

จากความเข้มงวดในการตรวจสอบสารตกค้างในเนื้อกุ้งดังกล่าว การเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นเสริมการเติบโต ความแข็งแรงและความต้านทานโรคให้แก่ตัวกุ้ง เช่น การให้วัคซีน สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ

กรดเบนโซอิก เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งมีสมบัติต้านการเจริญของรา ยีสต์ และแบคทีเรียหลายชนิด จึงมีการใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์กันอย่างแพร่หลาย (Bahruddin และคณะ, 2005) ในขนาดปริมาณ 200 – 3000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร (ตารางการใช้วัตถุเจือปนอาหารแนบท้ายประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร, 2547) อีกทั้งเป็นสารเสริมการเติบโตในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกร ไก่ หรือ โค โดยผสมกรดเบนโซอิกลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ เมื่อสัตว์กินเข้าไป กรดเบนโซอิกจะลดค่าความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้โอกาสในการติดเชื้อก่อโรคลดลงส่งเสริมให้สัตว์แข็งแรง และมีสุขภาพดี ถึงแม้ว่า กลไกการทำงานอย่างชัดเจนของกรดเบนโซอิกนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด และยังไม่มีรายงานผลการใช้กรดเบนโซอิกในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ แต่จากการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลองพบว่ากรดเบนโซอิกสามารถลดปริมาณเชื้อก่อโรคกุ้งกุลาดำซึ่งได้แก่ *Vibrio harveyi* และ *Aeromonas hydrophila* ดังนั้นกรดเบนโซอิกอาจเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อเสริมการเติบโตในกุ้งกุลาดำได้

Rengpipat และคณะ (1998, 2000, 2003) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 (BS11) ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดีจากอ่าวไทย จากการใช้ BS11 เสริมในอาหารกุ้งกุลาดำและเลี้ยงกุ้งทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับทดลองภาคสนามพบว่า BS11 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ทำให้น้ำหนักตัวและการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า BS11 ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยการตอบสนองผ่านเซลล์และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ ในการทดลองนี้จึงนำมาใช้เป็นชุดควบคุมบวก

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาผลการใช้กรดเบนโซอิกผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อสุขภาพกุ้งกุลาดำ โดยใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 เป็นชุดควบคุมบวก ทั้งนี้เพื่อประเมินผลการใช้กรดเบนโซอิก และนำไปประยุกต์ใช้จริงในฟาร์มต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ติดตามผลการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารกุ้งที่ผสมกรดเบนโซอิก
2. นำผลการทดลองที่ได้มาพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำกรดเบนโซอิก ไปประยุกต์ใช้จริงกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แนวทางการนำกรดเบนโซอิกมาเสริมการเติบโตในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแทนการใช้สารปฏิชีวนะในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

กุ้งกุลาดำมีชื่อเรียกภาษาอังกฤษทั่วไปว่า Giant Tiger Prawn มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* จัดเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae โดยแบ่งกลุ่มตามหลักวิทยาศาสตร์ได้ดังนี้

Phylum *Arthropoda*
Subphylum *Crustacea*
Class *Malacostraca*
Order *Decapoda*
Superfamily Penaeoidea
Family Penaeidae Rafinesque, 1815
Genus *Penaeus* Fabricius, 1798
Subgenus *Penaeus*
Species *monodon*

การจัดอนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*, Fabricius, 1798
(ที่มา : Brusca and Brusca, 1990)

ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำจัดเป็นกุ้งขนาดใหญ่ มีเปลือกหุ้มตัวลักษณะเรียบและมันเงาอยู่ภายนอก ลำตัวสีม่วงแดง โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ ถ้าจับจากทะเลลึกใหม่ๆจะเห็นลำตัวเป็นสีแดงสดและมีวงแหวนสีขาวสลับดำ ในแต่ละปล้องตลอดลำตัว เปลือกหุ้มส่วนหัวมีลักษณะเกลี้ยงหนวดมีสีเทาปนเขียวหรือน้ำตาลไม่มีลาย ระยางค์มักจะมีสีน้ำตาลและมีขนสีแดงอยู่โดยรอบ อย่างไรก็ตามสีของกุ้งนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปได้ตามการปรับตัวและสภาพแวดล้อม เช่น ความเค็มและความลึกของระดับน้ำ โดยมักจะพบว่ากุ้งในเขตน้ำกร่อยที่ไม่ลึกมากมีสีน้ำตาลเข้ม กุ้งที่

เลี้ยงในบ่อมีสีจางซีด นอกจากนี้สีของกุ้งจะเปลี่ยนแปลงตามระยะการลอกคราบด้วย โดยจะเห็นว่ากุ้งที่ลอกคราบใหม่ๆสีจะซีดไม่สดใส กุ้งที่กำลังลอกคราบสีก็จะจางลงกว่าปกติ เป็นต้น

ลำตัวกุ้งมีลักษณะเป็นข้อปล้องรวม 19 ปล้อง โดยแต่ละปล้องมีระยางค์หนึ่งคู่ ทำหน้าที่เฉพาะต่างกันออกไป ลำตัวกุ้งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง โดยส่วนหัวและส่วนอกจะรวมเป็นส่วนเดียวกันอยู่ภายใต้เปลือกคลุมหัว (ซึ่งโดยทั่วไปจะเรียกรวมๆ ว่าส่วนหัว) ซึ่งมีอวัยวะภายในต่างๆเรียงตัวกันอยู่

ระยางค์ที่ส่วนหัว มี 5 คู่ประกอบด้วย

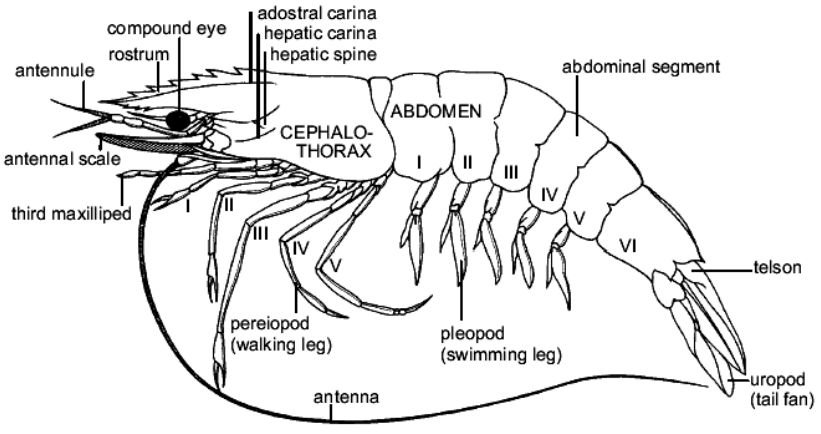
1. หนวดคู่สั้น (antennule) มีปลาย 2 แฉก มีหน้าที่ทำความสะอาดตา
2. หนวดคู่ยาว (antenna) ซึ่งใช้สัมผัสรับความรู้สึกหาทิศทางในการว่ายน้ำและ ช่วยในการหาอาหารด้วย
3. ระยางค์ส่วนปาก ขากรรไกรบนล่างใช้ขบเคี้ยวบดอาหารมีรวม 3 คู่

ระยางค์ส่วนนอกมี 8 คู่ประกอบด้วย

1. แมกซิลิเปต (maxillipeds) 3 คู่แรก ทำหน้าที่ช่วยในการจับและกินอาหาร
2. ขาเดิน หรือเพอริโอพอด (periopods) มี 5 คู่ ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่และต่อสู้ป้องกันตัว โดยขาเดิน 3 คู่แรก ปล้องส่วนปลายจะมีลักษณะเป็นก้าม ส่วน 2 คู่หลังมีปลายแหลมตามปกติ

ระยางค์ส่วนท้อง มี 6 คู่

ระยางค์ส่วนท้องนี้เรียกรวมกันว่า "ขาว่ายน้ำ" ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ พัดโบกให้เคลื่อนที่ มี 5 คู่ในแต่ละปล้องแต่คู่สุดท้ายจะเปลี่ยนสภาพไปเป็นแพนหาง (uropod) ติดกับหาง (telson) ทำหน้าที่กำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของกุ้ง ดังแสดงรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกทั่วไปของกุ้งกุลาดำ (ที่มา: Primavera, 1990)

วิวัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกุ้งกุลาดำระยะวัยอ่อน

1. **ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะหนึ่ง (ระยะนอเพลียส)** ลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ จะมีขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้งดังต่อไปนี้

นอเพลียสที่ 1 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม หัวโตเรียวเล็กไปทางด้านหาง มีระยางค์ 3 คู่ มีตาอันเดียวอยู่ระหว่างระยางค์คู่ที่ 1

นอเพลียสที่ 2 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.30 - 0.36 มิลลิเมตร ระยางค์เริ่มแบ่งออกเป็นปล้อง หนามปลายหางใหญ่ และยาวออก

นอเพลียสที่ 3 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.36 – 0.38 มิลลิเมตร เริ่มปรากฏฐานของระยางค์ท้อง ปลายหางเรียวเล็ก มีหนาม 3 คู่

นอเพลียสที่ 4 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.36 – 0.40 มิลลิเมตร ปลายของระยางค์ท้องแยกออกเป็นสองแฉก มีหนามที่ปลายหาง 4 คู่

นอเพลียสที่ 5 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.40 – 0.44 มิลลิเมตร เริ่มมีเปลือกหัวขากรรไกรกลม ลำตัวยาวออก ปลายหางแยกเป็น 2 แฉก

นอเพลียสที่ 6 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.42 – 0.50 มิลลิเมตร เปลือกหัวใหญ่ขึ้นขากรรไกรยาวออกมีหนามที่ปลายหาง 7 คู่

การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดจะเกิดขึ้นภายในเวลา 40 – 50 ชั่วโมง โดยในระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร อาหารส่วนใหญ่จะได้จากถุงอาหารที่ติดตัวมาและจะมีชีวิตส่วนใหญ่อยู่ตามหน้าดิน

2. **ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สอง (โปรโตซูเอีย)** ในระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและเริ่มกินอาหาร โดยอาหารของลูกกุ้งส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงก์ตอนพืชเล็กๆ ลูกกุ้งจะเดินทางเข้าหาฝั่งและจะอยู่ในระยะที่สองประมาณ 4 วัน ในช่วง 4 วันนี้ลูกกุ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงลอกคราบสามครั้ง โดยแต่ละครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างดังนี้คือ

โปรโตซูเอียที่ 1 ขนาดลำตัวยาว 0.85 – 1.00 มิลลิเมตร ลำตัวแบ่งออกเป็นสามส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนอกแยกเป็น 6 ปล้อง ส่วนหัวมีเปลือกคุมตลอด ตายังอยู่ภายในเปลือกมองเห็นเป็นจุดดำ แยกออกเป็น 2 ตา แต่ยังไม่มีก้านตา ระยางค์คู่ที่ 3 เปลี่ยนหน้าที่จากการช่วยในการว่ายน้ำมาทำหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ปลายหางมีหนาม 7 คู่ ระบบทางเดินอาหารเห็นได้ชัดเจนตลอดลำตัว

โปรโตซูเอียที่ 2 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 1.20 – 1.40 มิลลิเมตร ตาโผล่พ้นเปลือกหัว มีก้านตายาว กรีแหลมยื่นไปข้างหน้า ระหว่างตามีหนาม 1 คู่ บนเปลือกหัว เปลือกหัวเริ่มขยาย

ออกคลุมส่วนอกและที่ส่วนท้องเริ่มแบ่งเป็น 5 ปล้อง ส่วนหางแยกเป็นสองแฉกและมีขนข้างละเจ็ดเส้น

โปรโตซูเอียที่ 3 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 1.50 – 2.00 มิลลิเมตร แพนหางชั้นนอกมีขนาดใหญ่กว่าแพนหางชั้นใน รอบๆแพนหางมีขน มีระยางค์ว่ายน้ำเกิดขึ้นที่ปล้องอกทั้ง 5 ปล้อง

3. **ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สาม (ระยะไมซิส)** ลูกกุ้งในระยะนี้สามารถมองเห็นได้ชัดเจนและมีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น ระยะนี้กินเวลาประมาณ 7 วัน และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบ่งย่อยอีก 3 ระยะ คือ

ไมซิสที่ 1 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกัน ระยางค์อกยังคงทำหน้าที่ว่ายน้ำ ปลายระยางค์แบ่งเป็น 2 แฉก ส่วนท้องแบ่งออกเป็น 6 ปล้อง หนามบนปล้องท้องที่ 1 และ 2 หายไป ปลายหางมีหนาม 8 คู่ หนวดคู่ที่ 1 แบ่งเป็น 3 ปล้อง ปลายหางเป็นสองแฉก ลำตัวมีความยาวประมาณ 2.50 – 3.00 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 2 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ มีเปลือกหัวคลุมตลอดระยางค์คู่ที่ 1 ถึง 3 ตรงปลายเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ ระยางค์ว่ายน้ำที่ปล้องท้องเจริญขึ้น หนามบนปล้องที่ 3 หายไป หางเว้าเล็กน้อย ลำตัวมีความยาวประมาณ 3.00 – 3.45 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 3 ขาว่ายน้ำเจริญขึ้น แบ่งออกเป็น 2 ปล้อง มีฟันกรี 1-2 อัน ที่สันกรีบน ลำตัวมีความยาวประมาณ 4.04 – 4.50 มิลลิเมตร

4. **ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สี่ (ระยะโพสลาวา)** เป็นระยะตัวอ่อนขั้นสุดท้าย ลำตัวของลูกกุ้งจะยาวประมาณ 5.50 มิลลิเมตร มีระยางค์ครบเหมือนตัวเต็มวัยและมีวิวัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น โดยแบ่งเป็น 25 ระยะ ภายใน 25 วัน เรียกว่าโพสลาวาที่ 1 (พี 1) เรื่อยไปถึงโพสลาวาที่ 25 (พี 25) หลังการลอกคราบแต่ละครั้งรูปร่างลักษณะจะเปลี่ยนแปลงสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ลูกกุ้งจะมีสีเหลืองใส มีลายหรือจุดเกิดขึ้น หนามบนลำตัวหายไปหมด

การลอกคราบ เปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้ ดังนั้นในการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน เรียกขั้นตอนนี้ว่า "การลอกคราบ" กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และจะลอกคราบไปตลอดชีวิต กุ้งก่อนที่จะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งตัวโดยเร็ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมด ลำตัวจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 3-8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งอยู่ภายใต้การควบคุมของระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมน 2 ชนิดที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น แต่โดยทั่วไปนั้นการลอกคราบของกุ้งมักขึ้นกับปัจจัยหลายๆ ด้านด้วย เช่น วัยของกุ้ง อาหาร แสง และอุณหภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับกุ้งจะลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 20 – 30 วัน

ลักษณะนิสัยของกุ้งกุลาดำ

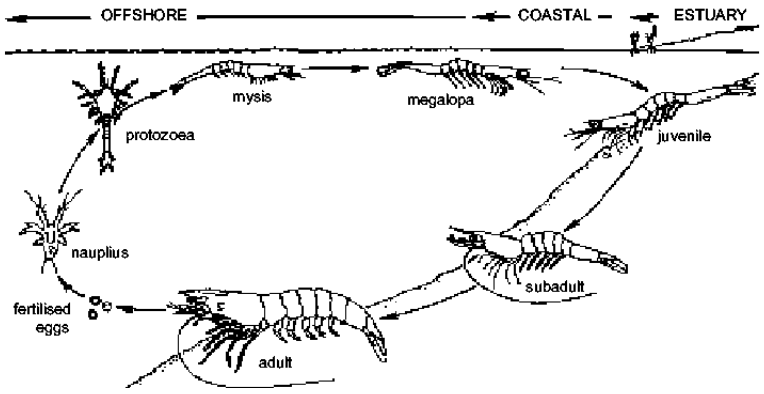
กุ้งกุลาดำสามารถเลี้ยงในบ่อให้โตได้ถึง 150 – 200 กรัม โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในระยะเวลา 3 –4 เดือน กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำในบ่อได้เร็ว และอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีช่วงความเค็มค่อนข้างกว้าง คือประมาณ 0.2 – 70 ส่วนในหนึ่งพัน แต่จะโตเร็วในน้ำที่มีช่วงความเค็มระหว่าง 15 – 30 ส่วนในหนึ่งพัน

กุ้งกุลาดำสามารถกินอาหารได้ทั้งที่เป็นพืชและสัตว์ แต่ชอบที่จะกินเนื้อสัตว์มากกว่าโดยมีประสาทรับกลิ่นคือหนวด กุ้งจะกินอาหารที่อยู่บริเวณหน้าดินโดยใช้ขาเดินคู่ที่ 1 หรือ 2 จับอาหารและแทะกิน ดังนั้นอาหารกุ้งจึงควรมีลักษณะที่จมน้ำละลายน้ำได้ช้า กุ้งกุลาดำไม่ใช่สัตว์สังคมมีนิสัยยึดครองอาหารไม่แบ่งปันกัน นอกจากนี้ในช่วงเวลาที่กุ้งลอกคราบกุ้งจะหยุดกินอาหารและจะกินมากหลังจากที่ลอกคราบเสร็จใหม่ๆ

วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำมีอายุประมาณ 18 – 24 เดือน โดยแม่กุ้งวางไข่ในน้ำทะเลลึก 30 – 40 เมตร ใกล้กับพื้นดิน ไข่ของกุ้งกุลาดำที่ผสมแล้วจะเป็นไข่จมมีสีน้ำตาลแกมเขียว โปร่งแสง รูปร่างกลมรี มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.27-0.31 มิลลิเมตร และฟักออกเป็นตัวอ่อนขั้นนอเพลียส (nauplius) ภายในเวลา 10-15 ชั่วโมง ในช่วงนี้ลูกกุ้งจะอยู่ในสภาพของแพลงตอนไม่กินอาหาร ล่องลอยไปตามกระแสน้ำประมาณ 2 วัน และมีขนาดประมาณ 0.3-0.33 มิลลิเมตร มีการลอกคราบ 6 ครั้ง ดังที่กล่าวมาในข้อ 3. และเมื่อสิ้นสุดระยะนี้ลูกกุ้งมีขนาดประมาณ 0.6 มิลลิเมตร เปลี่ยนเป็นระยะโปรโตซูเอีย (protozoea) หรือเรียกสั้นๆว่า ซูเอีย (zoea) มีขนาดประมาณ 1-3.3 มิลลิเมตร เริ่มกินอาหารประเภทแพลงตอนพืช มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน และจึงเติบโตเป็นระยะ ไมซิส (mysis) มีขนาดประมาณ 3.3-5.0 มิลลิเมตร เริ่มกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ขนาดเล็ก ในช่วงนี้ลูกกุ้งจะแขวนตัวอยู่ในน้ำ ห้อยหัวลง ส่วนปลายหางชี้ขึ้นผิวน้ำ มีการลอกคราบ 3 ครั้งในระยะเวลา 3-4 วัน แล้วเข้าสู่ระยะวัยอ่อนหรือเรียกว่า โพสลาวา (postlarva) หรือ P1 ต่อจากนั้นลูกกุ้งระยะ P1 จะไม่เรียกตามระยะเวลาลอกคราบแต่จะเรียกตามจำนวนวันที่เจริญเติบโตจนกระทั่งประมาณวันที่ 20-21 กุ้งจะมีขนาดตั้งแต่ 2-3 เซนติเมตรขึ้นไป เรียกว่ากุ้งวัยรุ่น (juvenile) ซึ่งมีลักษณะต่างๆสมบูรณ์จะเดินทางเข้ามาใกล้ฝั่งทะเล ระยะนี้สามารถแยกเพศจากลักษณะของอวัยวะช่วยสืบพันธุ์ภายนอกได้ แต่ยังไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ และเมื่อกุ้งเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (subadult) สามารถผสมพันธุ์ได้แล้ว ขนาดของตัวเมียจะเริ่มใหญ่กว่าตัวผู้ โดยการผสมพันธุ์สามารถเกิดได้ในเขตน้ำกร่อยหรือเขตชายฝั่งไหล่ทวีป ก่อนที่จะอพยพไป

ยังเขตทะเลลึก และเจริญต่อไปเป็นกุ้งโตเต็มวัย(adult) ซึ่งอาจแพร่กระจายถึงที่ลึกกว่า 150 เมตร และอาจมีน้ำหนักมากถึง 300 กรัม และมีรายงานว่าตัวใหญ่สุดเท่าที่พบมีน้ำหนัก 600 กรัม (Primavera, 1990; Motoh, 1984) วงจรชีวิตของกุ้งกุลาลาดำดังแสดงรูปที่ 2



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ (ที่มา: Motoh, 1984)

รูปแบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย

1. **การเลี้ยงแบบธรรมชาติ** (Traditional farming หรือ Extensive farming) (วัลลภ คงเพิ่มพูล, 2534)

การเลี้ยงแบบธรรมชาติเป็นการเลี้ยงแบบดั่งเดิม บ่อมีขนาดตั้งแต่ 20-60ไร่ ขุดแบบมีขาวัง กว้าง 10-20 เมตร ลึก 30-60 เซนติเมตร ตรงกลางเป็นพื้นที่ราบใช้วิธีดันน้ำเข้านาหรือเปิดน้ำเข้านาเมื่อเวลาน้ำขึ้น เพื่อให้ลูกกุ้งและอาหารธรรมชาติที่ติดเข้ามากับน้ำทะเล แล้วเก็บกักน้ำไว้ประมาณ 1-2 เดือน เพื่อให้ลูกกุ้งเจริญเติบโตโดยกินอาหารจากธรรมชาติ ไม่มีการให้อาหารหรือทำลายศัตรูกุ้ง การเลี้ยงวิธีนี้ผลผลิตไม่สามารถควบคุมได้ เพราะลูกกุ้งที่เข้าไปกับน้ำมีปริมาณที่ไม่แน่นอน อัตรารอดตายมีเปอร์เซ็นต์ต่ำ ผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงกุ้งแบบนี้จึงขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติโดยทั่ว ไป ให้ผลผลิตต่ำประมาณ 60-100 กิโลกรัม ต่อไร่ต่อปี

2. **การเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา** (Semi-intensive farming) (วัลลภ คงเพิ่มพูล, 2534)

การเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา เป็นการเลี้ยงที่สามารถควบคุมการผลิตได้บางส่วน มีการปรับปรุงนากุ้งแบบดั่งเดิมหรือแบบธรรมชาติให้มีขนาดแปลงเล็กลงเหลือแปลงละ 6-20 ไร่ ขุดขาวังให้ลึกมากขึ้นเป็น 0.80-1.20 เมตร มีความลาดชันเพื่อความสะดวกในการจับ ความหนาแน่นของลูกกุ้งมากขึ้นโดยรวบรวมจากแหล่งธรรมชาติเพิ่มเติมจากที่ได้รับเวลาเปิดน้ำเข้า หรือปล่อยลูกกุ้งจากการเพาะฟักเสริมกุ้งจากธรรมชาติ 5-10 ตัวต่อตารางเมตร หรือ 8,000-10,000 ตัวต่อไร่ ให้อาหารสมทบ ไม่มีเครื่องให้อากาศหรืออาจจะมีก็ได้ ดัดแปลงประตูน้ำให้แข็งแรง มีการ

จัดการที่ดีในเรื่องการป้องกันกำจัดศัตรูกุ้ง การเปลี่ยนถ่ายน้ำ ใส่ปุ๋ย การควบคุมโรค ใช้เวลาเลี้ยงครั้งหนึ่งๆ นานประมาณ 5 เดือนจึงจับขาย ผลผลิตจะอยู่ระหว่าง 200-600 กิโลกรัมต่อไร่

3. **การเลี้ยงแบบพัฒนา** (Intensive farming) (วัลลภ คงเพิ่มพูล, 2534)

การเลี้ยงแบบพัฒนานี้ได้ขยายตัวไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากผลตอบแทนที่ได้รับในการเลี้ยงแต่ละรุ่น ใช้เวลาในการเลี้ยง 4 เดือน การเลี้ยงแบบพัฒนาจะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงขนาดพื้นที่ประมาณ 4 ไร่ แต่ละบ่อมีความลึกประมาณ 1.5-2.0 เมตร ลูกกุ้งที่นำมาจากโรงเพาะฟักทั้งหมด ซึ่งปริมาณกุ้งที่ปล่อยหนาแน่นมาก ประมาณ 20-40 ตัวต่อตารางเมตร แล้วแต่ความต้องการของเกษตรกร มีการให้อาหารอย่างเต็มที่ มีอุปกรณ์และมีเทคนิคในการจัดการเลี้ยงที่ทันสมัย มีเครื่องตีน้ำหรือพ่นน้ำเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำ มีการใช้สารเคมีชนิดต่างๆ ทั้งรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ซึ่งเกษตรกรเชื่อว่าจะช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำ นอกจากนี้การใช้ยาและสารเคมีต่างๆ เพื่อป้องกันและรักษาโรค รวมทั้งให้อาหารเสริม และใช้ยาผสมกับอาหาร การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนานี้ เมื่อระบายน้ำออกจากนากุ้งสู่แหล่งน้ำธรรมชาติแล้วจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อม เนื่องจากคุณภาพของน้ำที่ระบายออกจะมีคุณสมบัติแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ ความเค็ม ปริมาณสารเคมี ยาต่างๆ จะมีปริมาณสูง ปริมาณออกซิเจนในน้ำจะต่ำ และของเหลือที่ย่อยสลายไม่หมดที่อยู่ที่ก้นบ่ออีกเป็นจำนวนมาก

4. **การเลี้ยงแบบหนาแน่นพิเศษ** (Ultra-intensive หรือ Super-intensive Growout System) (อรุณ ธัญญนันท์, 2544)

เป็นการเลี้ยงที่ควบคุมปัจจัยการผลิตทั้งหมด ใช้เทคโนโลยีสูงและผู้เลี้ยงที่ชำนาญการเป็นพิเศษ บ่อที่ใช้ในการเลี้ยงมีขนาดน้อยกว่า 0.25 เอเคอร์ บ่อเลี้ยงมีรูปร่างแบบเดียวกันความลึกของน้ำไม่แน่นอน ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงได้จากโรงเพาะฟักซึ่งมีการควบคุมทั้งชนิดและขนาด อัตราความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยงมากกว่า 100 ตัวต่อ ตร.ม. ให้อาหารสำเร็จรูปโดยโดยอาหารที่ให้ต้องมีคุณภาพสูงและสารอาหารครบสมบูรณ์เพราะเป็นแหล่งอาหารเพียงแหล่งเดียวที่กุ้งจะได้รับ ให้อากาศโดยใช้เครื่องให้อากาศและเปลี่ยนถ่ายน้ำซึ่งมีอัตราการเปลี่ยนถ่ายน้ำมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ของบ่อเลี้ยงกุ้งต่อวัน กุ้งที่เลี้ยงจะมีอัตราการรอด 80-90 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตที่ได้ประมาณ 30,000 – 150,000 กิโลกรัมต่อเฮคแตร์ต่อปี และสามารถเลี้ยงได้มากกว่า 3 ครั้งต่อรอบปี แม้ว่าการเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะให้ผลผลิตสูงกว่าวิธีเลี้ยงแบบอื่น แต่ก็มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมากเช่นกัน

การให้อาหารกุ้งกุลาดำ (กลุ่มบัณฑิตก้าวหน้า, 2531)

ปริมาณอาหาร จากพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งจะรู้ว่าปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ สภาพพื้นที่บ่อ คุณภาพน้ำ มีผลต่อการกินอาหารของกุ้ง นอกจากนี้กุ้งที่มีขนาดแตกต่างกัน การกินอาหารก็จะแตกต่างกันไปด้วย กุ้งที่มีน้ำหนัก 5-9 กรัมหรือขนาด 111-200 ตัวต่อกิโลกรัม จะกินอาหารเท่ากับ 0.30-0.45 กรัมต่อวัน โดยคิดจาก 5-6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ในขณะที่กุ้งที่มีน้ำหนัก 18-22 กรัม หรือขนาด 45-56 ตัวต่อกิโลกรัมจะกินอาหารเท่ากับ 0.63-0.73 กรัมต่อวัน (คิดจาก 3.3-3.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว) ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากุ้งที่มีขนาดต่างกัน ปริมาณอาหารที่กุ้งต้องการจะต่างกันด้วย

การให้อาหาร กุ้งเมื่ออายุ 1-2 สัปดาห์ ควรให้อาหารวันละ 2-3 ครั้ง เมื่อกุ้งอายุมากขึ้น การกินอาหารในแต่ละวันจะมากขึ้น ทำให้จำนวนครั้งในการให้อาหารจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เพื่อไม่ให้อาหารแต่ละครั้งมากเกินไป หลักในการเพิ่มครั้งอาหารให้คิดอาหารรวมแต่ละวันแล้วหารด้วยจำนวนครั้ง โดยการให้อาหาร 4 ครั้งๆละ 25 กิโลกรัม รวมวันละ 100 กิโลกรัม จะเปลี่ยนการให้อาหารเป็น 5 ครั้งๆละ 20 กิโลกรัม รวมวันละ 100 กิโลกรัมซึ่งมีปริมาณเท่าเดิม แต่เปลี่ยนเป็น 5 ครั้งต่อวัน ส่วนเวลาในการให้อาหาร จะให้อาหารครั้งแรกในเวลา 6.00 นาฬิกา และการให้อาหารในครั้งถัดไปจะเว้นระยะให้ห่างเป็นเวลาเท่าๆ กัน

การปรับเปลี่ยนเบอร์อาหาร อาหารกุ้งมีทั้งหมด 6 เบอร์ แต่ละเบอร์มีขนาดไม่เท่ากัน เพื่อให้กุ้งสามารถจับอาหารได้อย่างสะดวก เหมาะสมกับกุ้งแต่ละขนาด หลักการสำคัญในการปรับเปลี่ยนเบอร์อาหาร คือ ต้องสุ่มตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบขนาดของกุ้งในบ่ออย่างต่อเนื่อง การปรับเปลี่ยนเบอร์อาหารจะทำได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมตลอดการเลี้ยง ก่อนการเปลี่ยนเบอร์อาหาร ต้องผสมอาหารระหว่างเบอร์เก่าและเบอร์ใหม่ทุกครั้งด้วย เช่น เมื่อสุ่มตัวอย่างพบว่า กุ้งมีขนาดเฉลี่ย 14 กรัม ใช้อาหารเบอร์ 4 หากต้องการเปลี่ยนเบอร์ ควรเริ่มผสมอาหารเบอร์ 4 และเบอร์ 5 เป็นต้น และก่อนการเปลี่ยนเบอร์อาหารทุกครั้ง ควรผสมอาหารเป็นเวลา 7-15 วัน ทั้งนี้แล้วแต่การเจริญเติบโตของกุ้งและการยอมรับอาหารเบอร์ใหม่ด้วย การเปลี่ยนเบอร์อาหารทันทีหรือการผสมอาหารในระยะสั้นๆ อาจมีผลให้กุ้งชะงักการเจริญเติบโต หรือทำให้กุ้งมีขนาดแตกต่างกันได้

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

1. **อุณหภูมิ** กุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็นไม่สามารถรักษาอุณหภูมิในร่างกายให้คงที่ได้เหมือนสัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำในระหว่าง 25 – 30 องศา

เซลเซียส โดยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำตามธรรมชาติแบบค่อยเป็นค่อยไปอย่างช้าๆ จะไม่มีผลต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง แต่หากอุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดลงต่ำมากเกินไป กุ้งอาจตายได้เช่นกัน

2. **ความเค็มของน้ำ** ความเค็ม หมายถึง ปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ที่ละลายในน้ำ หรือหมายถึงปริมาณเกลือทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำทะเล นิยมวัดเป็นกิโลกรัมของน้ำ มีหน่วยเป็น พี.พี.ที. (ppt) หรือส่วนพัน น้ำทะเลในนากุ้งเมืองไทยมีความเค็มอยู่ระหว่าง 5 – 38 ส่วนในหนึ่งพัน ในกรณีที่น้ำในนากุ้งมีความเค็มสูงกว่าความเค็มของเลือดในตัวกุ้ง น้ำในตัวกุ้งจะซึมออกจากตัวกุ้งอยู่ตลอดเวลา ทำให้กุ้งสูญเสียน้ำจนกุ้งเสียชีวิต แต่กุ้งแก้ปัญหาด้วยวิธีดื่มน้ำเค็มเข้าทางปาก น้ำจืดส่วนหนึ่งจะถูกดึงกลับเข้าไปทดแทนในร่างกายทำให้กุ้งมีชีวิตอยู่ต่อได้ ส่วนในกรณีที่น้ำในนากุ้งมีความเค็มต่ำกว่าความเค็มในเลือดกุ้ง กุ้งจะมีปัญหาที่ตรงกันข้ามกับกรณีแรก คือน้ำจากภายนอกจะไหลเข้าในตัวกุ้ง ทำให้เลือดภายในตัวกุ้งจืดจาง ซึ่งในกรณีหลังนี้กุ้งจะต้องขับน้ำส่วนเกินออกจากร่างกาย เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของเลือดให้คงที่ ทำให้กุ้งมีชีวิตอยู่ได้ การปรับความเค็มเป็นแบบค่อยเป็นค่อยไป กุ้งจะเจริญเติบโตช้าลงเมื่อความเค็มสูงกว่า 25 ส่วนในหนึ่งพัน และการเปลี่ยนความเค็มอย่างรวดเร็วอาจทำให้กุ้งช็อคตายได้

3. **ออกซิเจน** ออกซิเจนในน้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่จะช่วยให้น้ำในนากุ้งมีสภาพดี นอกจากกุ้งจะใช้ออกซิเจนเพื่อการหายใจโดยตรงแล้ว ออกซิเจนยังช่วยในการย่อยสลายเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายต่างๆ ในนากุ้งด้วย ออกซิเจนในบ่อได้มาจากบรรยากาศและขบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ตัวการอื่นๆ เช่น ลม หรือพายุ มีส่วนทำให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงออกซิเจนในน้ำกับบรรยากาศมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และการใช้เครื่องตีน้ำก็มีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำด้วย

ปริมาณของออกซิเจนในน้ำนี้มีความสำคัญต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของกุ้ง กุ้งต้องการปริมาณออกซิเจนในน้ำไม่น้อยกว่า 3 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งขนาดเล็กต้องการออกซิเจนสูงกว่ากุ้งขนาดใหญ่ และกุ้งจะใช้ออกซิเจนสูงกว่าปกติในระยะที่ลอกคราบ กุ้งจะไม่กินอาหารถ้าน้ำในบ่อมีออกซิเจนต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นอกจากนี้ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำกุ้งจะเบื่ออาหารและลดการเคลื่อนไหวลง กล้ามเนื้อส่วนหางของกุ้งจะเป็นสีขาว เพราะกล้ามเนื้อส่วนนั้นสลายตัว

4. **ความเป็นกรดเป็นด่างของดินและน้ำ** ความเป็นกรดเป็นด่างหรือเรียกกันว่า พีเอช (pH) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0 – 14 ระดับพีเอชของน้ำผันแปรตามระดับพีเอชของดินบริเวณนั้น ถ้าดินมีสภาพเป็นกรดน้ำก็มีสภาพเป็นกรดตามไปด้วย โดยทั่วไปพีเอชในนากุ้งอยู่ระหว่าง 7.5 – 8.5 ซึ่งเป็นพีเอชของน้ำทะเลทั่วไป และเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตเติบโตของกุ้ง แม้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรด-ด่างจะมีอยู่ตลอดเวลาแต่ในสภาพของน้ำกร่อยจะมีคุณสมบัติ

ในการต้านไม่ให้สภาพของความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยน ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างจะไม่ต่ำกว่า 6 หรือสูงกว่า 9 สภาพความเป็นกรด-ด่างจึงไม่ค่อยมีปัญหากับการเลี้ยงกุ้ง

5. **ไฮโดรเจนซัลไฟด์** เป็นก๊าซที่เกิดขึ้นในนากุ้ง ถ้าหากปริมาณออกซิเจนในน้ำหมดไป โดยมีแบคทีเรียบางชนิดเป็นตัวกลางดึงออกซิเจนออกไปใช้ แล้วทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในที่สุด ก๊าซชนิดนี้มีกลิ่นเหมือนไข่เน่า เกิดจากการทับถมของมูลสัตว์น้ำและเศษอาหารที่เหลือตามพื้นบ่อ หากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์มีมากเกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ส่งผลให้กุ้งเสียการทรงตัว เป็นอัมพาตและตายได้ วิธีการแก้ปัญหาอาจทำได้โดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำและทำการเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงในน้ำ โดยเฉพาะในระดับบริเวณก้นบ่อ

6. **แอมโมเนีย** (NH_3) ปริมาณแอมโมเนียจะมาจากเศษอาหาร สิ่งขับถ่ายของกุ้งตลอดจน ซากแพลงตอนที่ตายทับถมในบ่อ เมื่อกุ้งโตขึ้นปริมาณของเสียต่างๆ ก็มีปริมาณมากขึ้น แบคทีเรียในพื้นบ่อจะทำการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย แอมโมเนียในบ่อกุ้งนั้นมีอยู่ทั้งในรูปของก๊าซแอมโมเนียและของแอมโมเนียไอออน

$$NH_3 + H_2O \longrightarrow NH_4OH \longrightarrow NH_4^+ + OH^-$$

ปฏิกิริยาทางเคมีของก๊าซแอมโมเนียในบ่อกุ้ง

แอมโมเนียที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำคือก๊าซแอมโมเนีย หากพีเอชของน้ำสูง ความเป็นพิษของแอมโมเนียก็จะสูงตามไปด้วย ปริมาณของแอมโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธีแก้ปัญหาที่นิยมคือการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และควบคุมปริมาณอาหารที่ให้กุ้ง ให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

7. **ไนเตรท** (NO_3^-) เป็นสารประกอบที่ให้ธาตุไนโตรเจนแก่แพลงก์ตอนพืช และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของอาหารธรรมชาติในบ่อ ได้แก่ แพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ สัตว์หน้าดิน ไนเตรทมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำต่ำมาก จึงไม่มีความสำคัญทางด้านนี้ อย่างไรก็ตามการสะสมไนเตรทในน้ำในปริมาณสูงๆ อาจแสดงให้เห็นถึงภาวะในแหล่งน้ำและในบางสภาวะที่ขาดออกซิเจน ไนเตรทอาจถูกเปลี่ยนกลับไปอยู่ในรูปไนไตรท์ในกรณีที่เกิดภาวะขาดออกซิเจนในบ่อ

8. **ไนไตรท์** (NO_2^-) การสะสมไนไตรท์ในน้ำนี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีการเน่าสลายของสารอินทรีย์ และปล่อยแอมโมเนียออกมามาก ในสภาวะที่มีออกซิเจนแอมโมเนียจะเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์และในกรณีที่มีค่าพีเอชในน้ำสูงกว่า 8.0 ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนไนไตรท์ไปเป็นไนเตรทจะลดลงทำให้เกิดการสะสมไนไตรท์ในน้ำ ซึ่งไนไตรท์ถูกดูดซึมเข้าสู่สัตว์น้ำผ่านทางเหงือก และจะไปทำปฏิกิริยากับฮีโมโกบินในเลือดทำให้การขนส่งออกซิเจนลดลง เลือดจะเป็นสีน้ำตาล ความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีแอมโมเนียสูง

9. **ธาตุอาหารในน้ำ** ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และพวกซิลิกา จะเป็นตัวเร่งให้แพลงก์ตอนต่างๆเจริญได้รวดเร็วและเป็นการช่วยปรับสภาพน้ำไปในตัวด้วย แต่หากพวกอาหารมีมากเกินไปก็อาจทำให้แพลงก์ตอนขยายพันธุ์รวดเร็วมาก ทำให้น้ำเน่าเสียได้เช่นกัน

10. **ความขุ่นใสของน้ำ** ความขุ่นในบ่อกุ้งเกิดจากการละลายของดินและเลนตะกอนต่างๆ รวมทั้งปริมาณของแพลงก์ตอนในน้ำด้วย ความขุ่นที่เกิดเนื่องจากดินเลนมากเกินไป อาจทำให้บ่อตื้นเขิน และความขุ่นมากอาจทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตลดลง ในนากุ้งไม่ควรมีความขุ่นเกิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะเช่นนี้น้ำในบ่อกุ้งจะมีสีน้ำตาลอ่อนๆ

11. **สภาพพื้นบ่อ** เมื่อเลี้ยงกุ้งไปนานๆ เศษอาหารที่เหลือและสิ่งปฏิกูลต่างๆ จะหมักหมมตามพื้นบ่อ ถ้าทิ้งไว้พื้นบ่อจะมีสีดำและมีกลิ่นเหม็น เป็นพิษต่อกุ้ง การแก้ไขสภาพของน้ำที่เน่าเสียหรือแก้ไขสภาพพื้นบ่อในขณะเลี้ยงกุ้งนั้นทำได้ยาก ดังนั้นจึงควรหาทางป้องกันไม่ให้พื้นบ่อเน่าเสีย โดยการดูแลควบคุมอาหารที่ให้ และควบคุมปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อ

2.2 โรคของกุ้งกุลาดำและการป้องกันรักษา

ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำหากมีการจัดการไม่ดีแล้ว ผลที่ตามมาคือกุ้งประสบปัญหาเรื่องโรค ซึ่งทำให้ส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตที่ได้ โรคกุ้งที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีสาเหตุที่สำคัญจากไวรัสและแบคทีเรียและมีส่วนน้อยที่มีสาเหตุมาจากราและโปรโตซัว (Lightner และ Redman, 1998)

2.2.1โรคจากไวรัส

2.2.1.1 โรคจากโมโนดอน แบคคิวโลไวรัส หรือ เอ็มบีวี (Monodon Baculovirus)

พบได้ในทุกระยะของการเลี้ยงกุ้ง แต่พบมากในกุ้งระยะ PL 20 จนถึงอายุ 3 เดือน โดยระยะที่มีผลกระทบมากที่สุดคือกุ้งในระยะวัยอ่อน กุ้งในบ่อเลี้ยงที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อาจยังไม่แสดงอาการให้เห็น จนกระทั่งเมื่อสภาพแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงในทางที่แย่ลง ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียด ทำให้กุ้งตายได้ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อได้ผ่านทางขี้กุ้ง หรือเมื่อกุ้งกินซากกุ้งที่ติดเชื้อ วิธีป้องกันที่ดีที่สุดคือ คัดเลือกกุ้งก่อนนำมาเลี้ยง (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

2.2.1.2 โรคจากเฮปพาโตแพนครีเอติก พาโว-ไลค์ไวรัส (Hepatopancreatic Parvo-like virus)

พบระบาดในกุ้งกุลาดำในช่วงต้นปี 2537 และพบเชื้อชนิดนี้ได้ในกุ้งที่มีอายุเดือนครึ่งขึ้นไป กุ้งที่ติดเชื้อกินอาหารลดลง ตับและตับอ่อนจะบวม กุ้งไม่โตและตายในที่สุด

ปัจจุบันนี้ยังไม่มียาหรือสารเคมีใดๆที่สามารถรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ได้ ดังนั้น การป้องกันทำได้โดยการจัดการบ่อที่ดี ควบคุมคุณภาพน้ำ คัดเลือกลูกกุ้งก่อนนำมาเลี้ยงและป้องกันให้กุ้งเกิดความเครียดน้อยที่สุด (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

2.2.1.3 **โรคจากไวรัสหัวเหลือง หรือวายบีวี** (Yellow-head Baculovirus **หรือ** YBV)

ไวรัสหัวเหลืองเป็นไวรัสที่มีความรุนแรงมาก และก่อความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมากที่สุด สามารถพบได้ตั้งแต่ปล่อยกุ้งลงบ่อเลี้ยงจนจับขาย ลักษณะอาการคือ กุ้งจะกินอาหารมากขึ้นกว่าปกติในช่วงแรก และจะค่อยๆลดลง กุ้งจะลอยตัวอยู่ผิวหน้าน้ำ บริเวณส่วนหัวจะมีสีเหลืองโดยเฉพาะตับและตับอ่อนจะมีสีเหลืองและบวมโต เหงือกมีสีเหลือง และจะตายอย่างรวดเร็ว

ปัจจุบันนี้ยังไม่มียาหรือสารเคมีที่รักษาโรคหัวเหลืองได้ ดังนั้นการป้องกันทำได้โดยการจัดการบ่อที่ดี ควบคุมคุณภาพน้ำ คัดเลือกลูกกุ้งก่อนนำมาเลี้ยง และป้องกันให้กุ้งเกิดความเครียดน้อยที่สุด (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

2.2.1.4 **โรคจากไวรัสวีเชพ หรือวีวี** (V-shaped virus)

พบในช่วงต้นปี 2537 ไวรัสชนิดนี้มีขนาดเล็กว่าไวรัสวายบีวี ลักษณะของโรคคือ กุ้งจะทยอยขึ้นมาตาย และพบแบคทีเรียบริเวณกล้ามเนื้อ ตับละตับอ่อนร่วมด้วย

ปัจจุบันนี้ยังไม่มียาหรือสารเคมีที่รักษาโรคหัวเหลืองได้ ดังนั้นการป้องกันทำได้โดยการจัดการบ่อที่ดี ควบคุมคุณภาพน้ำ คัดเลือกลูกกุ้งก่อนนำมาเลี้ยง และป้องกันให้กุ้งเกิดความเครียดน้อยที่สุด (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

2.2.1.5 **โรคตัวแดงดวงขาว** (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus **หรือ** SEMBV)

ไวรัสชนิดนี้ระบาดอย่างกว้างขวางในทวีปเอเชีย และพบในประเทศไทยครั้งแรกช่วงปลายปี 2537 ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีจุดขาวในเนื้อเยื่อใต้ชั้นเปลือกที่บริเวณส่วนหัว กุ้งบางตัวอาจมีสีแดง แต่ส่วนใหญ่จะมีสีปกติ สามารถพบการติดเชื้อได้ในกุ้งทุกระยะ กุ้งที่ติดเชื้อจะตายหมดภายใน 7 – 10 วัน

ปัจจุบันนี้ยังไม่มียาหรือสารเคมีที่รักษาโรคตัวแดงดวงขาวได้ ดังนั้นวิธีคที่ดีที่สุดคือป้องกันพาหะของโรค อันได้แก่ ปูชนิดต่างๆ นก แมลง นำไวรัสชนิดนี้มาปะปนในระบบการเพาะเลี้ยง และควรมีการจัดการบ่อและสภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงให้ดีอยู่เสมอ (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2539)

2.2.2โรคจากแบคทีเรีย

2.2.2.1 โรคเรืองแสง (Luminescent disease)

โรคนี้มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงในน้ำทะเล มักเป็นกับกุ้งวัยอ่อนจนถึงระยะก่อนเข้าไมซิส ลักษณะของกุ้งที่ติดโรคจะมีลำตัวขุ่นขาว ไม่ค่อยว่ายน้ำ ถ้าติดเชื้อมากบริเวณหลังจะหักงอและจมลงไปก้นบ่อ สามารถทำให้กุ้งตายได้ ถ้าสังเกตในเวลากลางคืนจะสามารถเห็นการเรืองแสงของกุ้งที่ติดโรค วิธีรักษาโรคนี้คือทำการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำที่ใช้เลี้ยงด้วยฟอร์มาลีน 37 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจใช้ คลอรีน 20 กรัมต่อน้ำ 1 ตัน พร้อมกับให้อากาศตลอดเวลา ทิ้งไว้ประมาณ 3 วัน

2.2.2.2 โรคเรืองแสงที่เกิดจาก *Vibrio harveyi* (Luminescent disease from *Vibrio harveyi*)

V. harveyi เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างเป็นท่อนสั้นโค้ง มีแฟลกเจลลา (flagella) 1 เส้นพบที่ด้านข้างของเซลล์ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างซีสต์ สามารถเจริญได้ดีในน้ำทะเลช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7-9 และในช่วงความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานในการเจริญ การก่อโรคของแบคทีเรียนี้ คือเข้าไปเจริญในตัวกุ้งและทำให้กุ้งเกิดการเรืองแสง ซึ่งเป็นลักษณะที่สังเกตได้ง่ายของโรคนี้ ตัวกุ้งจะเปล่งแสงสีเขียวแกมเหลือง หรือแสงสีเขียวแกมฟ้าออกมา

เมื่อกุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* นี้แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ไปอาศัยอยู่ในตับ (hepatopancreas) ทำให้ตับมีอาการอักเสบ นอกจากนี้แบคทีเรียนี้ยังกระจายตัวเข้าสู่กระแสเลือดของกุ้งและทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) กุ้งที่ติดโรคเรืองแสงจะกินอาหารน้อยลง มีทิศทางการว่ายน้ำไม่แน่นอน จนในที่สุดกุ้งตาย กุ้งกุลาดำที่ตายจากโรคเรืองแสงจะมีเปลือกหัวและลำตัวสีแดง กล้ามเนื้อขุ่น และสามารถสังเกตการเรืองแสงได้ในที่มืด

2.2.2.3 โรคจุดดำหรือเสี้ยนดำ

สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับโรคเรืองแสงที่มีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ และพบตามปกติในตัวกุ้ง แต่จะทำอันตรายต่อกุ้งเมื่อสภาวะแวดล้อมเสื่อมโทรมหรือกุ้งเกิดบาดแผลขึ้น โดยเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายกุ้งแล้วถูกกระบวนการป้องกันตัวของกุ้งห่อเอาไว้จนเกิดลักษณะอาการคล้ายเสี้ยนดำทิ่มแทงในกล้ามเนื้อ โรคเสี้ยนดำนี้พบมากในฤดูฝน ซึ่งน้ำในบ่อกุ้งมีความเค็มลดลง ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและอ่อนแอ ประกอบกับการเลี้ยงกุ้งในบ่ออย่างหนาแน่นจึงทำให้กุ้งติดโรคได้ง่ายขึ้น

วิธีป้องกันและแก้ไขคือ ตรวจสอบดูว่ากุ้งมีจุดดำหรือเสี้ยนดำตามเปลือกหรือไม่ ในช่วงแรกที่พบถ้าหากมีการกระตุ้นให้กุ้งลอกคราบ เสี้ยนดำนี้จะหลุดออกไปพร้อมกับการลอกคราบ หรือใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาด้วย แต่ถ้าปล่อยไว้จนเสี้ยนดำฝังตัวลึกเข้าไปในเนื้อกุ้งแล้ว การแก้ไขคงเป็นไปได้ยาก ส่วนแนวทางป้องกันคือ พยายามรักษาความเค็มให้มากกว่า 20 ส่วนในหนึ่งพัน และวิธีที่ดีที่สุดคือหลีกเลี่ยงการเลี้ยงอย่างหนาแน่น ซึ่งนอกจากจะเป็นการป้องกันอาการเสี้ยนดำแล้วยังช่วยป้องกันโรคอื่นอีกด้วย อย่างไรก็ตามกุ้งกุลาดำที่ติดโรคเสี้ยนดำเชื้อแบคทีเรียนี้จะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคแต่อย่างใด เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถถูกทำลายด้วยความร้อนสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

2.2.2.4 โรคเหงือกกร่อน โรคหางเปื่อย ขาเปื่อยดำ หรือเปลือกเปื่อยดำ

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยมักเป็นกับพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่เลี้ยงไว้นานๆ อาการของโรคจะเห็นได้ชัดเจน โดยครั้งแรกบริเวณที่ติดเชื้อจะมีสีน้ำตาล และสีจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ ถ้าเป็นที่ระยางค์หาง หรือขา หรือหนวดจะเปื่อยกุดทีละน้อย กุ้งบางตัวอาจกินอาหารน้อยลงและหากเป็นมากๆก็จะตายในที่สุด

วิธีป้องกันคือเมื่อจับกุ้งมาครั้งแรกควรจะแช่ในยาปฏิชีวนะ เช่น ออกซิเตตราไซคลิน ในอัตรา 20 กรัมต่อน้ำหนึ่งตัน โดยแช่เป็นระยะเวลานาน 1 วัน หากกุ้งที่เลี้ยงไว้ติดเชื้อควรแยกกุ้งที่เป็นโรคออกจากบ่อ ทำการรักษากุ้งที่เป็นโรคโดยการแช่น้ำยาฟอร์มาลินผสมน้ำ ในอัตราส่วนฟอร์มาลิน 150 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ตัน แล้วแช่กุ้งนาน 20 นาที จากนั้นนำไปแช่ในยาปฏิชีวนะในอัตราส่วนยา 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ตัน เป็นเวลา 3 วัน

2.2.2.5 โรคตัวขุ่นขาวในกุ้งวัยอ่อน

เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย มักเป็นกับลูกกุ้ง อาการที่สังเกตได้ง่ายคือ ลูกกุ้งจะอ่อนแอ ไม่ค่อยกินอาหาร ว่ายน้ำช้าลง และจมลงก้นบ่อ เมื่อตรวจดูในเวลากลางคืนจะไม่พบการเรืองแสง มักจะเกิดในช่วงฤดูหนาว หรือช่วงที่อุณหภูมิต่ำ

2.2.3โรคจากรา

2.2.3.1 โรคเหงือกดำ

เกิดจากการติดเชื้อรา *Fusarium* sp. มักพบเป็นกับกุ้งโตเต็มวัย โดยเชื้อรานี้จะเข้าเกาะทำลายอยู่ภายในซี่เหงือกของกุ้ง ลักษณะที่สังเกตง่ายๆ คือเหงือกจะมีสีดำ ลักษณะอาการของกุ้งที่เป็นโรคนี้เริ่มแรกจะมีอาการอ่อนแอกินอาหารน้อยลงและซี่เหงือกจะมีสีดำคล้ายมีดินโคลนติดอยู่ แต่จะล้างไม่ออกเนื่องจากในซี่เหงือกมีเส้นใยของเชื้อฟูซาเรียมเข้าทำลาย ถ้ามีอาการหนักจะ

ว่ายน้ำมาตายที่ชานบ่อ และจะทยอยตายมากขึ้นเรื่อยๆ กุ้งที่เป็นโรคนี้จะตายในเวลาประมาณ 7 – 10 วัน

โรคนี้สามารถป้องกันได้โดยการระวังเรื่องการให้อาหารกุ้งให้พอดี เพราะการตกค้างของอาหารจะทำให้สภาพของน้ำเสียหรือการใช้ปุ๋ยเคมีในปริมาณมากและติดต่อกันเป็นเวลานาน จนสภาพของพื้นบ่อเสีย อันเป็นเหตุทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอและติดโรคได้ง่าย แต่หากเกิดการติดเชื้อขึ้นแล้ว วิธีรักษาที่ดีที่สุดคือให้จับกุ้งขึ้นให้หมด แล้วล้างบ่อทำลายสปอร์ของเชื้อรา โดยใช้คลอรีนผงโรยให้ทั่วบ่อ ตากบ่อให้แห้ง จากนั้นก็ปล่อยน้ำเข้าหลายๆครั้งเพื่อปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้พอดีก่อนทำการเลี้ยงครั้งต่อไป ซึ่งจะช่วยยับยั้งการระบาดของสปอร์ราได้ หรืออาจรักษาได้โดยการแยกกุ้งที่เป็นโรคแช่ในน้ำยาฟูราโซลิโคน เข้มข้น 1 – 3 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน เป็นเวลา 48 – 96 ชั่วโมง

2.2.3.2 โรคเน่าตกพื้นบ่อ

สาเหตุเกิดจากเชื้อราเข้าเกาะทำลายตัวกุ้ง โดยมักจะเกิดกับลูกกุ้งในระยะไมซีส จนถึงในระยะโพสลาวาต้นๆ และจะเกิดในช่วงที่อุณหภูมิต่ำ คือ ระหว่างเดือนพฤศจิกายนจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ มีอัตราการตายประมาณ 10-20% พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อราจะจมลงไปนอนก้นบ่อ ตัวมีสีครีม หรือมีจุดสีน้ำตาลอ่อน ถ้าส่องด้วยกล่องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะเชื้อราเป็นเส้นๆ เต็มตัวกุ้ง

2.2.3.3 โรคราดำ

สาเหตุเกิดจากการติดเชื้อราที่เข้ามาเกาะทำลายตามเปลือก และปลายระยางค์ของกุ้ง มักพบในกุ้งที่เลี้ยงแบบหนาแน่น หรือแบบพัฒนา และให้อาหารสำเร็จรูป ลักษณะที่สังเกตได้ชัดคือบริเวณเปลือกแก้มและปลายระยางค์ขาว่ายน้ำมีสีดำ ปลายขอบบางแห่งโป่งพอง เมื่อเจาะดูจะมีเนื้อตายยุ่ยสีดำ นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นเส้นใยของเชื้อรา กุ้งที่ติดเชื้อจะมีอาการอ่อนแอ ลอยหัวขึ้นมาขอบบ่อ และทยอยกันตาย

2.2.4 โรคจากโปรโตซัว

2.2.4.1 โรคเหงือกแดงหรือโรคแก้มแดงหรือโรคลอยหัว

เกิดจากโปรโตซัว (Zootamnium เชื้อนี้จะเข้าเกาะในเหงือกกุ้ง ทำให้เกิดอาการอักเสบ เหงือกทำงานไม่สะดวก และถ้าโปรโตซัวเพิ่มปริมาณมากขึ้นจะทำให้เหงือกยุ่ย เนื้อเยื่อเหงือกตายลง ทำให้แก้มเหงือกมีสีแดงกว่าปกติ กุ้งจะว่ายขึ้นมาตามขอบบ่อและทยอยตายลงเรื่อยๆ โดยเฉพาะเวลาเช้ามืดจะเห็นกุ้งลอยหัวขึ้นมาตามขอบบ่อจำนวนมาก

โรคนี้สามารถป้องกันได้โดยให้อาหารในปริมาณที่พอเหมาะ เพื่อป้องกันการตกค้างของอาหาร รักษาคุณภาพน้ำในบ่อให้ดีอยู่เสมอ มีการถ่ายเทน้ำในบ่อเลี้ยงทุกวัน กำจัดตะกอนสาหร่ายออกจากบ่อกุ้งเป็นระยะๆ ก่อนการเลี้ยงกุ้งครั้งต่อไปควรล้างและตากบ่อเสียก่อน แต่หาก

กุ้งในบ่อเกิดการติดเชื้อขึ้นแล้ววิธีรักษา คือ ใช้ฟอร์มาลีน 30 มิลลิลิตรต่อน้ำหนึ่งตัน โดยผสมฟอร์มาลีนในถังน้ำแล้วสาดให้ทั่วบ่อ หรือใช้กากชาประมาณ 30 กรัมต่อน้ำหนึ่งตันแทนก็ได้

2.2.4.2 โรคตัวขุ่นมีเส้นใย หรือโรคซูโอเทียมเนียม

เกิดจากการของพยาธิโปรโตซัว Zootamnium เกาะกันอย่างหนาแน่นที่ลำตัวกุ้ง ลักษณะที่เห็นชัดเจนคือ ตัวกุ้งจะมีสีขุ่น เมื่อใช้แก้วใสตักขึ้นมาดูจะเห็นเส้นใยบางๆ รอบตัวกุ้งทำให้กุ้งว่ายน้ำไม่สะดวก ถ้าถูกเกาะมากๆ จะว่ายน้ำไม่ได้ และเชื้อที่เกาะเป็นอุปสรรคต่อการลอกคราบ กุ้งจะจมลงใต้บ่อ และตายในที่สุด กุ้งที่เป็นโรคนี้จะลอกคราบไม่ค่อยหลุด กินอาหารน้อยลง และโตช้ากว่าปกติ โรคนี้เกิดขึ้นรวดเร็วและใช้ระยะเวลาประมาณ 3-4 วัน ถ้าไม่มีการรักษากุ้งจะตายเป็นจำนวนมาก

2.2.4.3 โรคโปรโตซัว เอซิเนดต้าโตโกไฟรา และจำพวกวอล์เซลล่า หลายชนิด

เกิดจากโปรโตซัวเข้าทำลายเนื้อเยื่อกุ้ง ส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่มีรากหรือลำต้นฝังอยู่ตามเปลือกกุ้ง บางครั้งหยั่งรากลงไปจนถึงกล้ามเนื้อ อาการที่เห็นได้ชัดคือ กุ้งจะอ่อนแอ กินอาหารน้อยลง อัตราการลอกคราบลดลง เคลื่อนไหวช้า มักจะลอยอยู่ได้ด้วยแรงลมเป่าที่ให้ในบ่อ ภายใน 2-3 วันจะทยอยตายไปเรื่อยๆ

2.2.4.4 โรคกุ้งหลังขาว

เกิดจากโปรโตซัว โดยกุ้งจะกินสปอร์ของโปรโตซัวเข้าไป และโปรโตซัวจะเจาะผนังลำไส้เข้าไปฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อรอบๆ ลำไส้ตามแนวหลังกุ้ง ทำให้กล้ามเนื้อตายมีลักษณะขุ่นขาว ครั้งแรกเริ่มจากส่วนต้นของปล้องแรก และลามไปเรื่อยๆ จนถึงปล้องสุดท้ายจรดส่วนหาง ทำให้สันหลังมีสีขุ่นขาว กุ้งจะอ่อนแอ ว่ายน้ำช้าลง ชอบว่ายน้ำตามขอบบ่อ เมื่อลอกคราบจะตาย และมักถูกกุ้งตัวอื่นกิน ทำให้สปอร์ติดเข้าในกุ้งตัวอื่นๆ ได้อีก

2.2.5 โรคจากสาเหตุอื่น ๆ

2.2.5.1 โรคขาดสารอาหาร

เกิดจากการขาดธาตุอาหารพวกกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหรือขาดวิตามินซี ซึ่งจะเป็นกับกุ้งที่เลี้ยงในระบบปิด ในบ่อซีเมนต์หรือในตู้ และมีการให้อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงกุ้ง กุ้งที่เป็นโรคจะมีสีดำ และบริเวณที่มีสีดำนี้จะลามจากส่วนผิวหุ้มลำตัวไป กล้ามเนื้อกระเพาะอาหาร ลำไส้ เหงือก รวมทั้งก้านตาและโดยเฉพาะเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้เปลือกบริเวณรอยต่อและลำตัวกับระยางค์ส่วนต่างๆ ถ้ากุ้งขาดสารอาหารอย่างรุนแรง จะทำให้อันตรายถึงตายได้

โรคนี้สามารถป้องกันได้โดยเลี้ยงกุ้งในบ่อที่มีสาหร่ายขึ้นด้วย หากไม่สามารถเลี้ยงในบ่อสาหร่ายได้ ควรหาสาหร่ายมาเป็นอาหารให้กุ้งกิน แต่หากเกิดโรคขึ้นแล้วสามารถรักษาได้โดยการผสมวิตามินซีหรือกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายลงในอาหารกุ้งให้เพียงพอกับความต้องการของกุ้ง เนื่องจากวิตามินซีมีความคงตัวต่ำสามารถถูกทำลายได้ในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารกุ้ง ดังนั้นจึงต้องใช้วิตามินซี 2,000 – 3,000 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2.2.5.2 โรคกุ้งหลังหักและกุ้งตัวแดง

สาเหตุยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน อาจเกิดจากการติดเชื้อราที่ขึ้นตามเปลือกกุ้ง หรืออาจเกิดจากสาเหตุอื่นๆ เช่น ความหนาแน่นในการเลี้ยงมากเกินไป ความเครียดที่เกิดจากการตกใจหรืออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงกะทันหัน มักพบในกุ้งกุลาดำในระยะตั้งแต่ออกจากไข่จนถึงระยะวัยรุ่น อาการที่เกิดกับลูกกุ้งวัยอ่อนระยะแรก คือ ลูกกุ้งจะอ่อนแอไม่กินอาหาร ว่ายน้ำช้าลง และจมลงไปนอนที่ก้นบ่อ และลูกกุ้งวัยรุ่นจะมีอาการหลังหักตัวงอและลำตัวจะเปลี่ยนเป็นสีแดงผิดปกติ การเคลื่อนไหวช้าลง ในบางครั้งจะว่ายน้ำวนเวียนไปมาเหมือนอาการควงสว่าน ซึ่งถ้าเป็นกับลูกกุ้งวัยอ่อนลูกกุ้งจะตายจนหมดบ่อภายใน 2 – 3 วัน

โรคนี้ยังไม่มีวิธีป้องกันที่แน่นอนนัก อาจทำได้โดยรักษาสภาพแวดล้อมในบ่ออนุบาลให้เหมาะสม มีสภาพดีอยู่เสมอ เช่น การให้อาหารในปริมาณที่พอเหมาะไม่มากจนเกินไป รักษาคุณภาพน้ำให้ดีอยู่เสมอ

2.3 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเซียน

การป้องกันสิ่งแปลกปลอมของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ระบบการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอมโดยธรรมชาติ ซึ่งมีเปลือกห่อหุ้มตัวที่มีลักษณะแข็งสามารถป้องกันสิ่งแปลกปลอมได้ และระบบการป้องกันภายในโดยระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งระบบการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยภูมิคุ้มกัน พบได้ทั้ง การป้องกันโดยใช้เซลล์เพียงเซลล์ชนิดเดียว การป้องกันโดยเซลล์หลายชนิด และการใช้สารน้ำที่สร้างจากเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ ได้แก่ กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซีส การสร้างโนดูล การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม การแข็งตัวของเลือด ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส ระบบการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แอคกลูตินิน สารคล้ายไซโตไคน์ โมดูเลเตอร์ สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจะทำงานร่วมกันเพื่อป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกที่เข้าสู่ตัวเซลล์ (Millar and Ratcliffe, 1994)

2.3.1 ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)

ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ตัวเซลล์ และการตอบสนองที่เกิดขึ้นเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific defense) ไม่ต้องการการชักนำ

2.3.1.1 การแข็งตัวของเลือด

การแข็งตัวของเลือด เป็นกระบวนการแรกหลังจากการได้รับบาดแผลเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านบาดแผล โดยเป็นการทำงานร่วมกันระหว่าง เซลล์เม็ดเลือด ไฮยาลินเซลล์ (hyaline) และโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารน้ำ โดยเม็ดเลือดจะทำหน้าที่เก็บหลั่งเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (TGase) เมื่อถูกกระตุ้น ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันของอิเล็กตรอนในโมเลกุลรอบข้าง โดยมีแคลเซียม (Ca^{2+}) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่น (Polymerization) ของโปรตีนในพลาสมาเกิดการแข็งตัวพร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบฟีนอลออกซิเดส (Kopacek et al., 1993; Yeh et al., 1998)

2.3.1.2 กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซีส

กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซีส เป็นกระบวนการที่สำคัญของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก ที่มีลักษณะเล็ก ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่เข้าสู่ร่างกาย การทำงานของกระบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมจะมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยใช้อนุมูลอิสระของออกซิเจนเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม (Munoz et al., 2000) คือ เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าไปเกาะบริเวณเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือด เซลล์เม็ดเลือดจะยื่นไซโตพลาสซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม และเพิ่มการนำออกซิเจนเข้าสู่ตัวเซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์ เป็นซูปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion; O_2^-) ด้วย NADPH oxidase หลังจากนั้น O_2^- จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) เปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถเปลี่ยนเป็น น้ำและ ออกซิเจน โดยเอนไซม์แคทาเลส (Catalase) และ เพอร์ออกซเดส (Peroxidase) ตามธรรมชาติซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน(O_2^-) อาจถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ ซิงเกล็ทออกซิเจน (singlet oxygen; $^1O_2$) ได้เองโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ นอกจากนี้ O_2^- อาจทำปฏิกิริยาร่วมกับ H_2O_2เกิดเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; •OH) (Torbjörn และ Söderhäll, 1999)

จากข้างต้นพบว่า O_2^- , H_2O_2 , $^1O_2$ และ •OH มีบทบาทในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์เกิดได้ทั้งเซลล์เม็ดเลือด ในระบบหมุนเวียนเลือดและเซลล์ที่อยู่กับที่ (fixed cell) บริเวณเหงือก ที่เรียกว่า nephrocytes โดยกระบวนการกลืนทำลายที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแต่

ละชนิดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซีส (%phago-cytosis) ยังเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด และพบว่าสารน้ำแอคกลูตินินในน้ำเลือด สามารถกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้ เรียกว่า อ๊อพโซนิน (opsonin) (Thörnqvist และ Söderhäll, 1997)

2.3.1.3 การสร้างโนดูล

การสร้างโนดูล เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเข้าเซลล์เป็นจำนวนมาก เกินความสามารถของกระบวนการกลืนทำลาย เซลล์เม็ดเลือดจะรวมกันเป็นกลุ่มก้อนล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายไป และพบการสร้างโนดูลบริเวณเหงือก และตับ พร้อมกับการเกิดเม็ดสีดำ (melanin production) ในระบบฟีนอลออกซิเดส (Johansson และ Söderhäll, 1989)

2.3.1.4 การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม

การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเกิดในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร เช่น พยาธิ เชื้อรา และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ โดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมจับกระจายหุ้มสิ่งแปลกปลอม เซลล์เม็ดเลือดเซมิแกรนูลาเซลล์ (semigranular cell) และแกรนูลาเซลล์ (granular cell) ทำหน้าที่ห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ซึ่งกลไกลการฆ่าสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มอาศัยองค์ประกอบในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส พร้อมกับมีการเกิดเม็ดสีดำ และพบว่าโปรตีน 76 kDa ในน้ำเลือดจะกระตุ้นให้เม็ดเลือดยึดเกาะกับสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น (Johansson และ Söderhäll, 1989)

2.3.1.5 ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส

ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส เป็นระบบที่มีเอนไซม์ต่างๆ เป็นองค์ประกอบ โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลา และแกรนูลาเซลล์ ซึ่งเป็นแหล่งสร้าง และเก็บเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยกลไกการเกิดขึ้นจาก เซลล์เม็ดเลือด และพลาสมาโปรตีน จะจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ และถูกกระตุ้นโดยองค์ประกอบของเซลล์จำพวกคาร์โบไฮเดรต (Torbjörn และ Söderhäll, 1999)

2.3.2. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

ซีรัมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จะมีองค์ประกอบหลายชนิดที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แอคกลูตินิน สารคล้ายไซโตไคน์ โมดูเลเตอร์ และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ซึ่งองค์กระกอบเหล่านี้จะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรืออาจถูกชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งการถูกชักนำนี้ จะไม่แสดงคุณสมบัติของอินมูโนโกลบุลินที่สามารถจดจำแอนติเจน และตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ เมื่อพบแอนติเจนเป็นครั้งที่สองอย่างเฉพาะเจาะจงได้เช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Ratcliffe และคณะ, 1985; สมบัติ รักประทานพร, 2542)

2.3.2.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สามารถพบได้ทั้งในส่วนของพลาสมา ซีรัม และส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดแตก ได้แก่ แบคเทอริซิดิน (bactericidin) และพีเนียดิน (penaeidins) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อ ไม่ทนความร้อนและโซเดียมคลอไรด์ ประสิทธิภาพสูงที่พีเอชต่ำ (5.2-6.0) มีความจำเพาะต่อเชื้อบางส่วน มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์แบคทีเรีย แต่ไม่ทำให้เซลล์แตก และไม่ได้เกิดจากฟีนอลออกซิเดสที่พบในเม็ดเลือด จากการศึกษาในปู *Carcinus maenas* ของ Schnapp และคณะ (1996) พบการทำงานของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์แบคทีเรียเป็นโปรตีนขนาด 6.5 kDa ประเภทโพรลีน-ริช (proline-rich) จากปลาย N-terminus (Torbjörn และ Söderhäll, 1999)

2.3.2.2 แอคกลูตินิน

แอคกลูตินิน เป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของเม็ดเลือดแดงในสัตว์มีกระดูกสันหลัง แบคทีเรีย และโปรโตซัว พบในเลือดของครัสเตเชียน นอกจากจะทำให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้วยังทำหน้าที่เป็นอ๊อพโซนินกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซีส ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์อีกด้วย

2.3.2.3 สารคล้ายไซโตไคน์

พบโปรตีนขนาด 76 kDa ในเลือดกุ้งแสดงสมบัติสารคล้ายไซโตไคน์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีหน้าที่กระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซีส ช่วยการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมขณะเกิด การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม และส่งเสริมการทำงานของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส โดยช่วยให้เม็ดเลือดชนิดเซมิแกรนูลา และแกรนูลา ปล่อยเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดสออกมากำจัดเชื้อโรคมากขึ้น

2.3.2.4 โมดูเลเตอร์

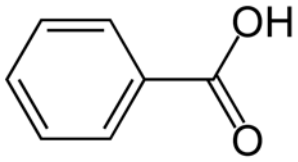
เป็นตัวควบคุมระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม ได้แก่ proteinase inhibitor และ α-macroglobulin ยับยั้ง เซอรีนโปรติเอส ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสให้อยู่ในระดับที่สมดุล

2.3.2.5 สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด

โคแอคกลูโลเจน เป็นโปรตีนในพลาสมาที่มีบทบาทป้องกันการสูญเสียเลือดและการบุกรุกของเชื้อโรค จากการศึกษาพบโปรตีนขนาด 210 kDa ทำหน้าที่ให้เกิดการแข็งตัวของโรคในพลาสมากุ้งนาง (Torbjörn และ Söderhäll, 1999)

2.4 กรดเบนโซอิก (Benzoic acid)

ลักษณะทั่วไปและสมบัติของกรดเบนโซอิก



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของกรดเบนโซอิก

กรดเบนโซอิก(C_6H_5COOH) (รูปที่ 3) มีชื่ออื่นคือ กรดเบนซีน-คาร์บอกซีลิก หรือ กรดเฟนิลคาร์บอกซีลิก เป็นต้น เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งมีลักษณะเป็นผลึกแข็งไม่มีสีไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่ 122.4 องศาเซลเซียส มีจุดเดือดที่ 249 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรด (pK_a) เท่ากับ 4.21 ละลายน้ำได้น้อย (ที่ 25 องศาเซลเซียส ละลายได้ 2.9 กรัมต่อลิตร) แต่ละลายในเมธานอล หรือไดเอทิลอีเทอร์

การใช้ประโยชน์จากกรดเบนโซอิก

เนื่องจากกรดเบนโซอิกมีสมบัติต้านการเจริญของรา ยีสต์ และแบคทีเรียหลายชนิด (http://en.wikipedia.org/wiki/Benzoic_acid [Online] [6 กย.49]) จึงมีการใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์กันอย่างแพร่หลาย (Bahruddin และคณะ, 2005) ตามข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ใช้กับอาหารมนุษย์ได้ในขนาดปริมาณ 200 – 3000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร (ตารางที่ 2)

นอกจากนี้ Knarreborg และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองหาผลของกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอมิก กรดโพรพิโอนิก กรด บิวทิริก กรดแลกติก กรดเบนโซอิก และกรดฟูมาริก ต่อจุลินทรีย์ในหลอดทดลองซึ่งทำให้มีสภาพแวดล้อมเหมือนในทางเดินอาหารของลูกสุกร พบว่ากรดอินทรีย์สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Coliforms ได้ และมีการใช้กรดเบนโซอิกเสริมสุขภาพสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกร ไก่ หรือ โค กันอย่างแพร่หลาย โดยผสมกรดเบนโซอิกลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์(Mode of action) ของกรดอินทรีย์นั่นยังไม่มีใครทราบแน่ชัด (Knarreborg และคณะ, 2002) แต่ได้มีการสันนิษฐานว่าเมื่อสัตว์ได้รับกรดเบนโซอิกผ่านทางการกิน กรดเบนโซอิกจะลดค่าความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้ปริมาณเชื้อก่อโรค

ลดปริมาณลง ส่งผลให้โอกาสในการติดเชื้อก่อโรคลดลงด้วย สัตว์จึงมีสุขภาพแข็งแรง และมีสุขภาพดี (Heres และคณะ, 2004)

ตัวอย่างของงานวิจัยที่เสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์เศรษฐกิจ

Castillo และคณะ (2004) อธิบายถึงการใช้กรดอินทรีย์ได้แก่ กรดมาลิก และ กรดฟูมาริก ผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงโค แทนการใช้สารปฏิชีวนะโมเนนซิน ซึ่งพบว่าสามารถใช้แทนสารโมเนน-ซินได้

Heres และคณะ (2004) ทำการทดลองโดยใช้กรดอินทรีย์ซึ่งได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก ผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ในอัตราส่วน 5.7% และ 0.7% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความไวต่อการติดเชื้อกับไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามปกติพบว่า ไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมกรดอินทรีย์มีความไวต่อการติดโรคจาก *Campylobacter* ต่ำกว่า

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณการใช้กรดเบนโซอิกเจือปนอาหาร ตามข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปน-อาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ชนิดของอาหาร	**ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ (มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม)**
ขนมหวานที่ทำจากนม เช่น ไอศกรีม พุดดิ้ง โยเกิร์ตปรุงแต่งหรือผสมผลไม้ เป็นต้น	- 300 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
เนยเทียม	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์น้ำผสมน้ำมัน (อิมัลชั่น) ที่มีปริมาณน้ำมันต่ำกว่าร้อยละ 80 เช่น มินารีน	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์อิมัลชั่นอื่น ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์อิมัลชั่นที่ใช้แต่งหน้าขนม เป็นต้น	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ขนมหวานที่ทำจากไขมันอื่นที่มิใช่ไขมันนม เช่น ไอศกรีมดัดแปลง เป็นต้น	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลไม้ในน้ำส้มสายชู น้ำมัน หรือน้ำเกลือ	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์ป้ายขนมที่ทำจากผลไม้ ยกเว้นแยม เยลลี่ และมาร์มาเลด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลไม้กวน	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์ผลไม้บด ผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่ใช้ราดหน้า และรวมทั้งกะทิ	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ขนมหวานที่ทำจากผลไม้ เช่น ขนมเยลลี่ เป็นต้น และรวมทั้ง ขนมหวานชนิดน้ำที่มีผลไม้เป็นส่วนประกอบ เช่น ผลไม้ลอยแก้ว เป็นต้น	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลไม้ดอง	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่ใช้ทำไส้ขนม	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลไม้ปรุงสุกหรือผลไม้ทอด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์ผักหรือสาหร่ายในน้ำส้มสายชู น้ำเกลือ หรือซีอิ๊ว	- 2,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์ป้ายขนมที่ทำจากผัก หรือถั่วหรือเมล็ดพืชอื่น ๆเช่น เนยถั่ว	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากผักบด ถั่วบด หรือเมล็ดพืชบด เช่น ซอสผัก ผักกวนหรือแช่อิ่ม เป็นต้น แต่ไม่รวมผลิตภัณฑ์ที่ใช้ป้ายขนม เช่น เนยถั่ว เป็นต้น	- 3,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผักดอง	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ผักหรือสาหร่ายปรุงสุกและผักหรือสาหร่ายทอด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
ซุปและซุปใส	- 500 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
เครื่องดื่ม	- 200 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก

ที่มา : http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntf/DirtyFood3Attach.html [Online]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 บริษัท Beckman, Germany
2. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G650E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA
4. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany
6. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น PT 1200 ของบริษัท Sartorius, Germany
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA
8. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 2100 บริษัท Innova, USA
9. สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)
10. ชุดเครื่องมือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
    - Liquid chromatography รุ่น LC-10ADvp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - UV-visible detecter รุ่น SPD-10Avp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - Auto injector รุ่น SIL-10ADvp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - Column oven รุ่น CTO-10ASvp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - Column : Inertsil® ODS-3 ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตรของ GL Sciences Inc. Japan.
    - Degasser รุ่น DGU-14A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - System controller รุ่น SCL-10Avp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
    - โปรแกรม Class-VP

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Eiken chemical, Japan
3. ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ ของบริษัท Sera, Germany
4. อาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ของบริษัทโภคภัณฑ์สตาร์ฟีด จำกัด
5. กรดเบนโซอิก Vivo-Vitall® ของบริษัท DSM
6. เมทิลแอลกอฮอล์ 99% (Absolute methanol) ของ Merck, Germany.
7. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของ Merck, Germany.

3.3 สารเคมีสำหรับ Immunohistochemistry

1. เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 70%, 80%, 90%, 95% BDH
2. N-butyl alcohol Univar
3. ไซลีน (Xylene) Carlo Erba
4. Formaldehyde Carlo Erba
5. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
6. สารละลาย P1+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10) (วิธีเตรียมดูภาคผนวกข)
7. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ Sigma (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)
8. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) 30 % Sigma
9. อิโอซิน (Eosin Y) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮออล์ 95 % Harleco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
10. ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข) Harleco
11. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) Sherwood
12. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) Difco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
13. Davidson's fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , NaOH)	Riedel-de Haen
15. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl)	Merck
16. Permount	Ficther Scientific

17. โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Phianphak, 2005) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1 *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 (BS 11)

3.4.2 *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 จากหน่วยวิจัยกุ้ง CENTEX ประเทศไทย

3.4.3 *Aeromonas hydrophila* จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 ทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อเชื้อก่อโรคกุ้งในหลอดทดลอง

3.5.1.1 ทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อ *Aeromonas hydrophila* ในหลอดทดลอง

ตรวจสอบผลกระทบต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* ในสภาวะที่มีกรดเบนโซอิก โดยการนำสารละลายกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับ *Aeromonas hydrophila* ที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.25 แมคฟาร์แลน (McFarland) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยวิธี Total plate counts (CFU/ml, CFU/g) ดูจำนวนแบคทีเรียโดยนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic Soy Agar)

3.5.1.2 ทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในหลอดทดลอง

ตรวจสอบผลกระทบต่อการเจริญของ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในสภาวะที่มีกรด เบนโซอิก โดยการนำสารละลายกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.25 แมคฟาร์แลน (McFarland) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยวิธี Total plate counts

(CFU/ml, CFU/g) ดูจำนวนแบคทีเรียโดยนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อแข็งไทโอซัลเฟต-ซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (Thiosulfate Citrate Bile-salt Sucrose Agar)

3.5.2 เตรียมอาหารกุ้งกุลาดำ

3.5.2.1 อาหารกุ้งกุลาดำผสมกรดเบนโซอิก

นำอาหารกุ้งมาผสมกับกรดเบนโซอิกให้ได้ความเข้มข้น 0, 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมของอาหารกุ้ง

3.5.2.2 อาหารกุ้งกุลาดำผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 (BS11)

เลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 ในอาหารเลี้ยงอาหารเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 (รายละเอียดในภาคผนวก ก) เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียม-คลอไรด์ 2 % ผสมเซลล์สดกับอาหารกุ้งในอัตราส่วน 1:3 เพื่อให้ได้ปริมาณโพรไบโอติก 10^{10} CFU ต่อกรัมของอาหารกุ้ง (พิสมัย โพธิ์เวชกุล, 2547) คลุกอาหารกุ้งและเซลล์ BS11 ให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้แห้ง และไม่ติดกันเป็นก้อน เก็บใส่ภาชนะที่สะอาด เก็บในตู้เย็น

3.5.3 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

3.5.3.1 การเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ Postlarvae-60 (PL-60) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ทำการปรับสภาพความเค็มโดยเลี้ยงในน้ำเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) บรรจุในบ่อซีเมนต์ขนาด 0.8 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นค่อยๆลดความเค็มลงจนได้ความเค็มประมาณ 20 ppt เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ เลี้ยงปรับสภาพให้กุ้งคุ้นเคยกับอาหารปกติ ในตู้กระจกที่บรรจุน้ำ 0.03 ลูกบาศก์เมตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้งกุลาดำบ่อละ 20 ตัว จำนวน 7 ตู้ต่อกลุ่มการทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมกรดเบนโซอิก
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม

ให้อากาศตลอดเวลา กรองน้ำโดยใช้ระบบหมุนเวียนแบบปิด ให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน เวลา 8:00, 12:00 และ 18:00 น. ทำการศึกษาทุกๆ 15 วัน เป็นเวลา 90 วันโดยแต่ละครั้งทำการตรวจนับปัจจัยดังนี้ คือ

1 น้ำหนักตัว (กรัม)

2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยวิธี plate count

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *Vibrio* spp.ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส

3 ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนี้

- แอมโมเนียม (NH_4^+) (mg/l) หาค่าด้วย Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
- ไนไตรท์ (NO_2^-) (mg/l) (mg/l(หาค่าด้วย Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
- ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) (mg/l) หาค่าด้วย Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อุณหภูมิ (^oC) วัดด้วย thermometer
- ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) (mg/l) วัดด้วย DO meter
- พีเอช วัดด้วย pH meter
- ความเค็ม (ppt) วัดโดย Refractometer

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบตามกำหนด นับจำนวนกุ้งที่เหลือเพื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต (%) ระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

3.5.3.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ Postlarvae-60 (PL-60) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทราที่ทำการปรับสภาพความเค็มโดยเลี้ยงในน้ำเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) บรรจุในบ่อซีเมนต์ขนาด 0.3 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นค่อยๆลดความเค็มลงจนได้ความเค็มประมาณ 20 ppt เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ เลี้ยงปรับสภาพให้กุ้งคุ้นเคยกับอาหารปกติ ในบ่อที่บรรจุน้ำ 0.3 ลูกบาศก์เมตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้งกุลาดำบ่อละ 10 ตัว จำนวน 3 บ่อต่อกลุ่มการทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมกรดเบนโซอิก
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม

- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม

ให้อากาศตลอดเวลา กรองน้ำโดยใช้ระบบหมุนเวียนแบบปิด ให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน เวลา 8:00, 12:00 และ 18:00 น. ทำการศึกษาทุกๆ 15 วัน เป็นเวลา 90 วันโดยแต่ละครั้งทำการตรวจนับปัจจัยดังนี้ คือ

1 น้ำหนักตัว (กรัม)

2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยวิธี plate count

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *Vibrio* spp.ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส

3 ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนี้

- แอมโมเนียม (NH_4^+) (mg/l) หาค่าด้วย Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
- ไนไตรท์ (NO_2^-) (mg/l) (mg/l(หาค่าด้วย Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
- ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) (mg/l) หาค่าด้วย Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อุณหภูมิ (^oC) วัดด้วย thermometer
- พีเอช วัดด้วย pH meter
- ความเค็ม (ppt) วัดโดย Refractometer

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบตามกำหนด นับจำนวนกุ้งที่เหลือเพื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต (%) ระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

3.5.3.3 การเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ Postlarvae-75 (PL-75) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ทำการปรับสภาพความเค็มโดยเลี้ยงในน้ำเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) บรรจุในบ่อซีเมนต์ขนาด 0.3 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นค่อยๆลดความเค็มลงจนได้ความเค็มประมาณ 20 ppt เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ เลี้ยงปรับสภาพให้กุ้งคุ้นเคยกับอาหารปกติ ในบ่อที่บรรจุน้ำ 0.3 ลูกบาศก์เมตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้งกุลาดำบ่อละ 20 ตัว จำนวน 3 บ่อต่อกลุ่มการทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมกรดเบนโซอิก

- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้นที่พิจารณาจากการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 และ 2

- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11

- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้นที่พิจารณาจากการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 และ 2 และ โพรไบโอติกแบคทีเรีย

ให้อากาศตลอดเวลา กรองน้ำโดยใช้ระบบหมุนเวียนแบบปิด ให้อาหาร 3 มื้อต่อวันเวลา 8:00, 12:00 และ 18:00 น. ทำการศึกษาทุกๆ 15 วัน เป็นเวลา 75 วันโดยแต่ละครั้งทำการตรวจนับปัจจัยดังนี้ คือ

1 น้ำหนักตัว (กรัม)

2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยวิธี plate count

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *Vibrio* spp.ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส

3 ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนี้

- แอมโมเนียม (NH_4^+) (mg/l) หาค่าด้วย Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
- ไนไตรท์ (NO_2^-) (mg/l) (mg/l(หาค่าด้วย Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
- ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) (mg/l) หาค่าด้วย Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อุณหภูมิ (^oC) วัดด้วย thermometer
- พีเอช วัดด้วย pH meter
- ความเค็ม (ppt) วัดโดย Refractometer

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบตามกำหนด นับจำนวนกุ้งที่เหลือเพื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต (%) ระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

3.5.4 ติดตามปัจจัยแสดงภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ ในกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

3.5.4.1 การนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (total hemocyte count)

เจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Alsever's solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยดเลือด 100 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือดนับเม็ดเลือดทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.5.4.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) ในพลาสมากุ้ง

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยเพาะเลี้ยง *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทริปติกซอย ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในช่วงลอกเฟส (log phase) ปรับค่าโอดีที่ความถี่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml โดยเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างโอดี 660 นาโนเมตรกับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 (พิศมัย โพธิ์เวชกุล, 2547) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 $^{\circ}$C 10 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่าเดิม เพื่อปรับให้ได้ 10^4 CFU/ml

หาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในพลาสม่ากุ้ง โดยเจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Van Harrevald's salt 1.4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บส่วนพลาสม่าไปกรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอน บ่มส่วนพลาสม่าที่ปราศจากเชื้อ กับ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนแรกในอัตราส่วน 1:1 ที่ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปต 50 ไมโครลิตร กระจายเชื้อ (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเทรตบายซอลท์ซูโครส นำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ได้

3.5.5 ทดสอบความสามารถของกุ้งกุลาดำในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

เตรียม *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/ml ในน้ำเลี้ยงกุ้ง ในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 ใช้กุ้งแต่ละกลุ่มทดลองหลังการเพาะเลี้ยง กลุ่มละ 6 ตัวต่อตู้ ในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 ใช้กุ้งแต่ละกลุ่มทดลองหลังการเพาะเลี้ยง กลุ่มละ 6 ตัวต่อบ่อ และในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3 ใช้กุ้งแต่ละกลุ่มทดลองหลังการเพาะเลี้ยง กลุ่มละ 9 ตัวต่อบ่อทดสอบความต้านทานต่อการชักนำให้เกิดโรค โดยติดตามผลดังนี้

3.5.5.1 อัตราการตายสะสม (cumulative mortality) นับติดตามผลทุกวัน

3.5.5.2 ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในน้ำเลี้ยงด้วยวิธี plate count โดย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส ติดตามผลทุก 2 วัน

3.5.5.3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอยเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ส่วน *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลส์ซูโครส

3.5.5.4 ตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำจากข้อ 3.5.4 ในกุ้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสง

3.5.6 ตรวจสอบพยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจาก *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ด้วยวิธี Immunohisto chemistry (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sithigorngul et al., 2000)

3.5.6.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

นำตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากการทดลองหลังจาก challenge ด้วย *V. harveyi* 639 นำมาตัดหัวและแยกลำไส้ออก แช่น้ำยา Davidson's fixative ให้คงรูป ล้างออกโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในเอทิล-แอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเปลี่ยนมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ข้ามคืน แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมกับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ในนอร์มัลบิวทิล-แอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนนำสารใหม่เข้ามาแทนที่ (clearing) นำออกไปแช่ไซลีน จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ1 ชั่วโมง

ขั้นตอนการแช่ให้แข็งตัว (impregnation) ในพาราพลาสต์ แช่ในไซลีนที่ผสมกับพารา-พลาสต์หลอมเหลวปริมาณ 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 45 นาที

ขั้นตอนการฝังพาราพลาสต์ (embedding) นำส่วนหัวของกุ้งและลำไส้แต่ละตัวจัดเรียงในก้นพิมพ์สี่เหลี่ยม จัดให้อวัยวะอยู่ตรงกลาง จากนั้นเทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงไปให้เต็มพิมพ์ ปิดด้วยกรอบพลาสติกด้านบนที่ต้องนำไปใช้ในการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม รอจนแข็งตัวจึงแกะพิมพ์ออก

ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ฝังในพาราพลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน เรียงต่อกัน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำ

กลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น ให้พอดีกับขนาดเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตึงเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.6.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี Indirect peroxidase immunohistochemistry

ขั้นตอนการเอาพาราพลาสต์ออก (deparaffination) นำสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นวางบนตะกร้า (slide basket) แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ,5 และ 5 นาที ตามลำดับ

ขั้นตอนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydration) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในไซลีนที่ผสมนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที นอร์มัลบิวทิล-แอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอ-ฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิล-แอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที น้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที สารละสายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 1 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยให้ปั๊มสูญญากาศ หยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ โดยวางสไลด์ในกล่องที่ปิดฝาภายในบุด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้นเพื่อรักษาความชื้นตลอดเวลา ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเนื้อเยื่อออก ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ 2 ให้เป็นเนื้อเยื่อควบคุม หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ในเนื้อเยื่อที่ 1 เก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 2 โดยการล้างแอนติบอดีที่ 1 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ หยดแอนติบอดีที่ 2 ได้แก่ Goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเนื้อเยื่อเก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการใส่ซับสเตรต โดยการล้างแอนติบอดีที่ 2 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อแต่ละสไลด์มาทำปฏิกิริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ15 มิลลิกรัม และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ10 ไมโครลิตร ที่ละลายใน

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ถึงขั้นนี้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ให้ผลบวกจะสามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีนโดยนำเนื้อเยื่อ 3 แผ่นแรก หรือ 1 ชุด มาย้อมสีฮีมาทอก-ไซลีน แต่ในอีก 1 ชุดย้อมสีอิโอซินเพียงอย่างเดียวทำได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนนี้นำเนื้อเยื่อย้อมสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 10 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินออกอย่างรวดเร็ว แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้เนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีน้ำเงินจาง แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยแช่ในเอทิลแอ-ลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีทับ (counterstain) ในเนื้อเยื่อด้วยสีอิโอซิน 0.02 เปอร์เซ็นต์ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอ-ฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที และไซลีน จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3.5.6.3 ขั้นตอนการทำเป็นสไลด์ถาวร

ทำโดยการผนึกสไลด์ (mount) โดยหยดเปอร์เม้าท์ (permount) ประมาณ 3 หยด บนสไลด์ นำกระจกสไลด์มาปิดโดยแตะขอบด้านหนึ่งเอียงทำมุม 45 องศาเซลเซียสแล้วค่อยๆวางลงโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดส ในบริเวณต่างๆของเนื้อเยื่อกุ้ง

3.5.7 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

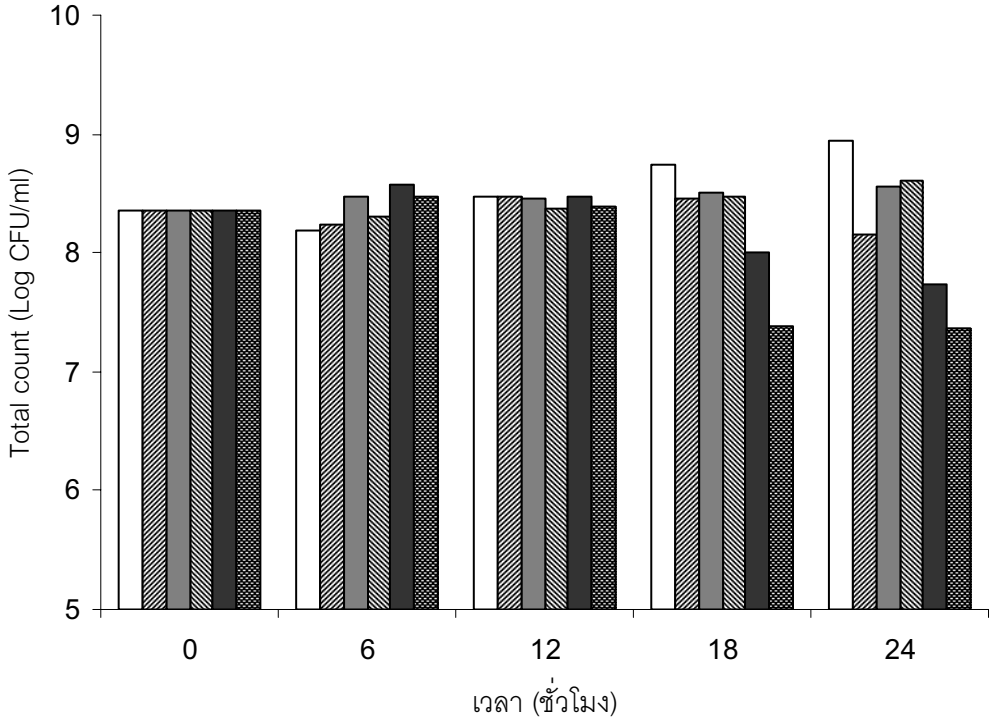
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อเชื้อก่อโรคกุ้งในหลอดทดลอง

4.1.1 ทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อ *Aeromonas hydrophila* ในหลอดทดลอง

เมื่อถ่าย *Aeromonas hydrophila* ที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.25 แมคฟาร์แลน (McFarland) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเชื้อในหลอดทดลองเท่ากับ 8.95, 8.16, 8.56, 8.61, 7.73 และ 7.36 CFU/ml ตามลำดับ (รูปที่ 4) สามารถสรุปได้ว่า กรดเบนโซอิกสามารถลดปริมาณ *Aeromonas hydrophila* ได้ และ สารละลายกรดเบนโซอิกความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อได้ดีที่สุด

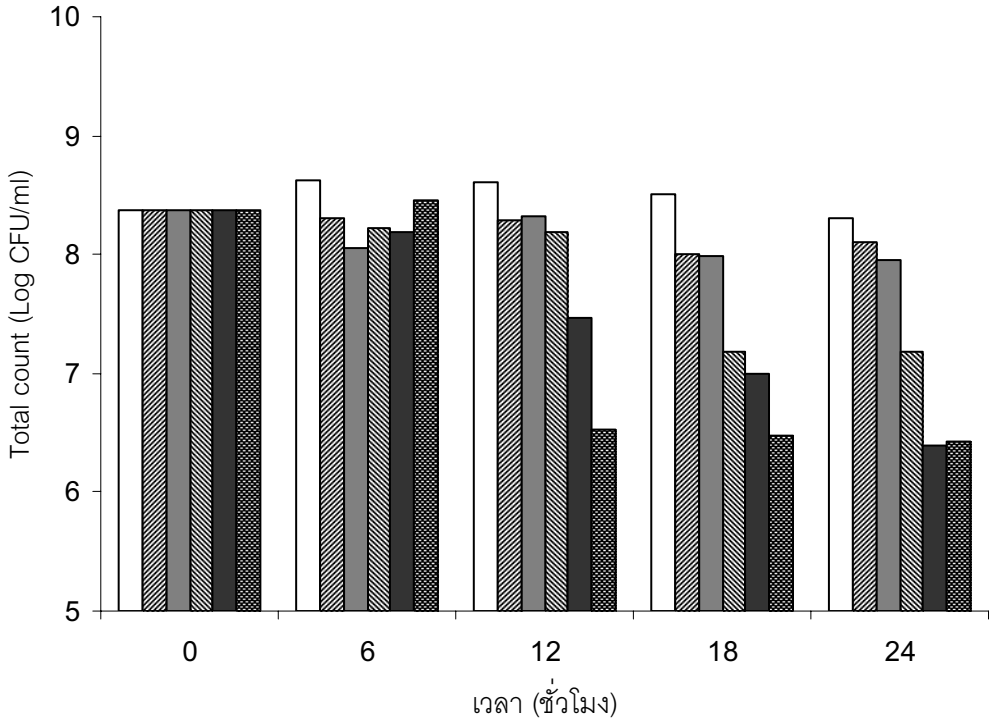


หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น0(□),1(▨),2 (■),3(▩), 10(■) และ 20(▩) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่อเวลา (ชั่วโมง)

4.1.2 ทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในหลอดทดลอง

เมื่อถ่าย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.25 แมคฟาร์แลน (McFarland) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเชื้อในหลอดทดลองเท่ากับ 8.30, 8.10, 7.95, 7.18, 6.40 และ 6.42 CFU/ml ตามลำดับ (รูปที่ 5) สามารถสรุปได้ว่า กรดเบนโซอิกสามารถลดปริมาณ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ได้ และ สารละลายกรดเบนโซอิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อได้ดีที่สุด



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น0(□),1(▨),2 (■),3(▩), 10(■) และ 20(▩) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการเจริญของ *Vibrio harveyi* 639 เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่อเวลา (ชั่วโมง)

4.2 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

4.2.1 เปรียบเทียบผลของกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งความเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ ในตู้กระจก

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 90 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 7 ตู้) คือ

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมกรดเบนโซอิก
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ โพสลาวา 60 (PL60) ในตู้กระจกที่บรรจุน้ำ 0.05 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 20 ตัวต่อตู้ ติดตามผลการเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของกุ้งทั้ง 4 กลุ่มทดลอง (รูปที่ 6) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยที่คุณภาพน้ำในบ่ออยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 3)

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio spp.* ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 4) พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 8.36×10^{2} - 1.16×10^{4} CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 5.09×10^{1} - 6.52×10^{2} CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.85×10^{2} - 1.66×10^{4} CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 4.38×10^{1} - 1.18×10^{3} CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 6.31×10^{2} - 1.31×10^{4} CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 6.55×10^{1} - 9.29×10^{2} CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.82×10^{2} - 1.26×10^{4} CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 6.77×10^{1} - 1.54×10^{3} CFU/ml

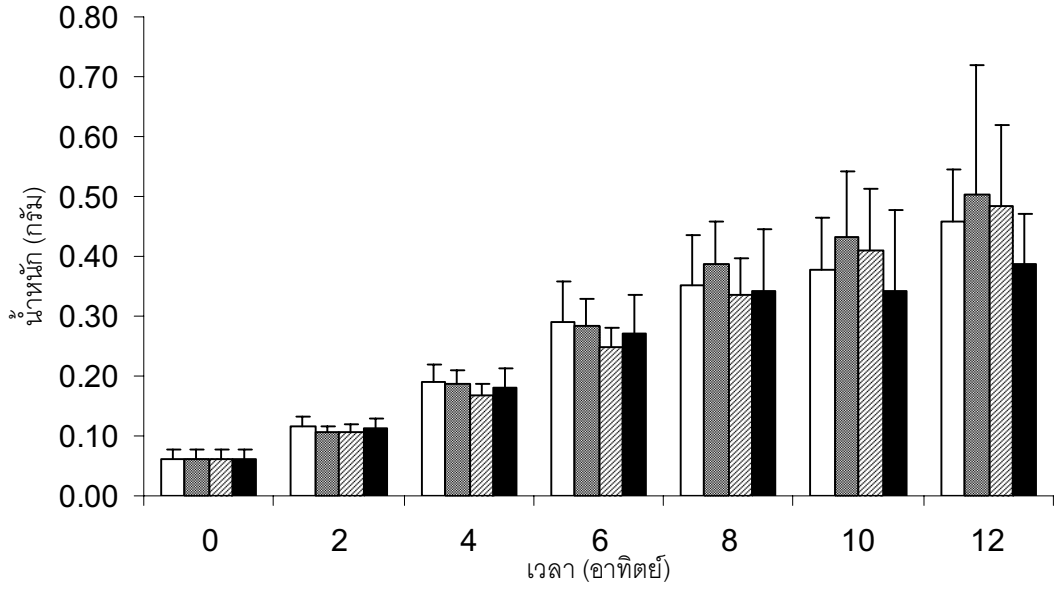
หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน พบว่าการรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 13.57% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ 12.86% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ 9.29% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ 14.29% ตามลำดับ (รูปที่ 7)

ตารางที่ 3. คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 1

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิก		
		3 มก./ ก.	10 มก./ ก.	20มก./ ก.
แอมโมเนีย (mg/l)	0.00-0.08	0.00-0.10	0.00-0.08	0.00-0.08
ไนไตรท์ (mg/l)	0.00-0.50	0.00-0.50	0.00-0.50	0.10-2.00
ฟอสเฟต(mg/l)	0.10-≥2.00	0.10-≥2.00	0.10-2.00	0.00-0.50
อุณหภูมิ(°C)	26.10-31.20	25.20-29.80	25.20-29.80	25.40-29.50
พีเอช (pH)	7.70-7.98	7.70-7.96	7.71-7.95	7.70-7.98
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ(mg/l)	6.54-7.80	6.70-7.90	6.44-7.90	6.30-7.90
ความเค็ม(ppt)	19.10-25.40	19.20-24.20	19.50-25.60	19.20-24.00

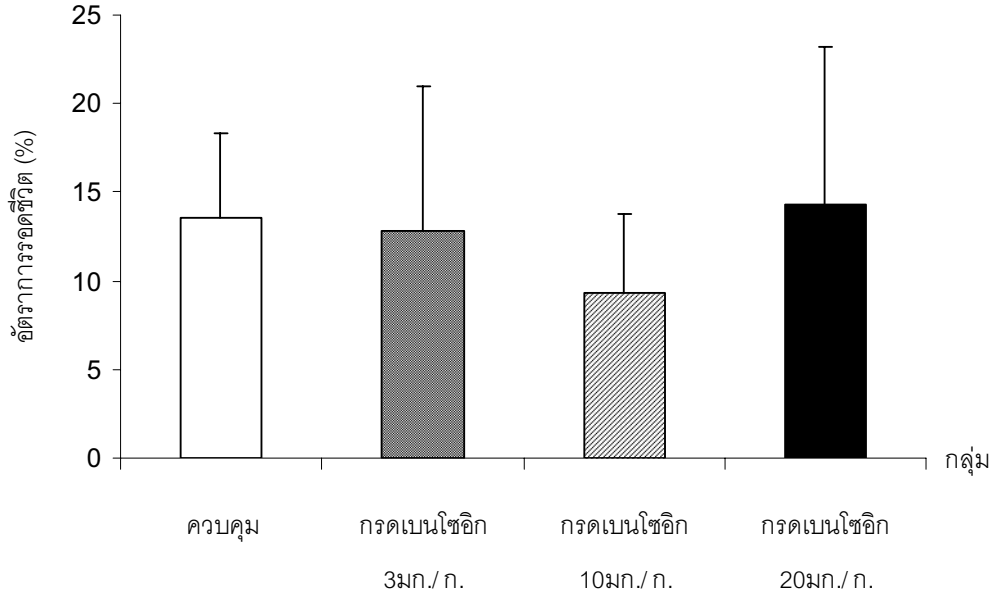
ตารางที่ 4. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิก		
		3 มก./ ก.	10 มก./ ก.	20มก./ ก.
ปริมาณแบคทีเรียรวม	2.92-4.06	2.89-4.22	2.80-4.12	2.89-4.10
Vibrio spp.	1.71-2.81	1.64-3.07	1.82-2.97	1.83-3.19



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 6 น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม (□) และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3(▩), 10(▨) และ 20(■) มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ระหว่างการทดลองครั้งที่ 1



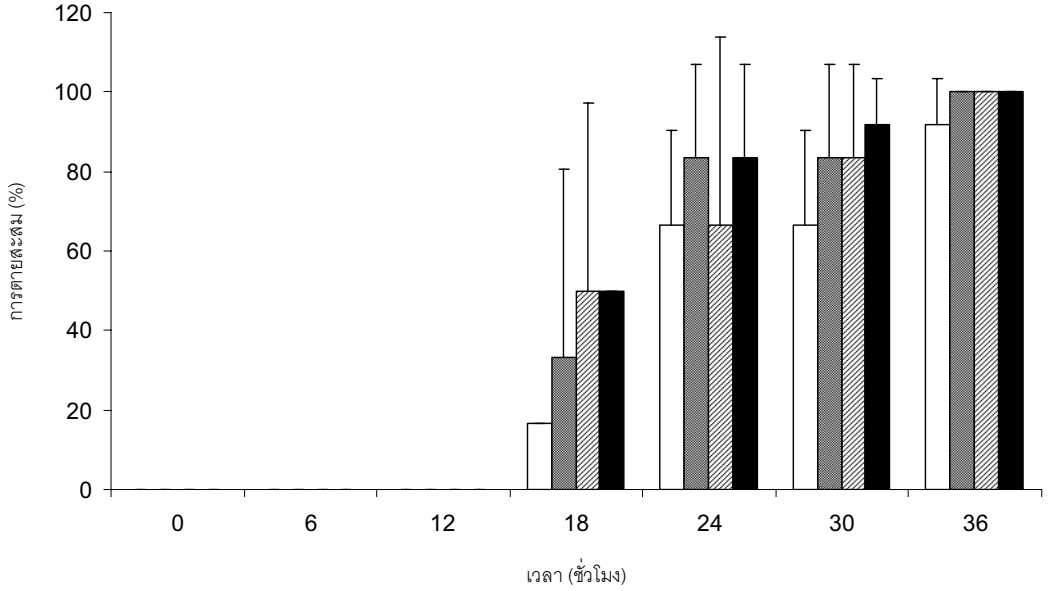
หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 7 การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 90 วัน ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ของการทดลองครั้งที่ 1

4.2.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

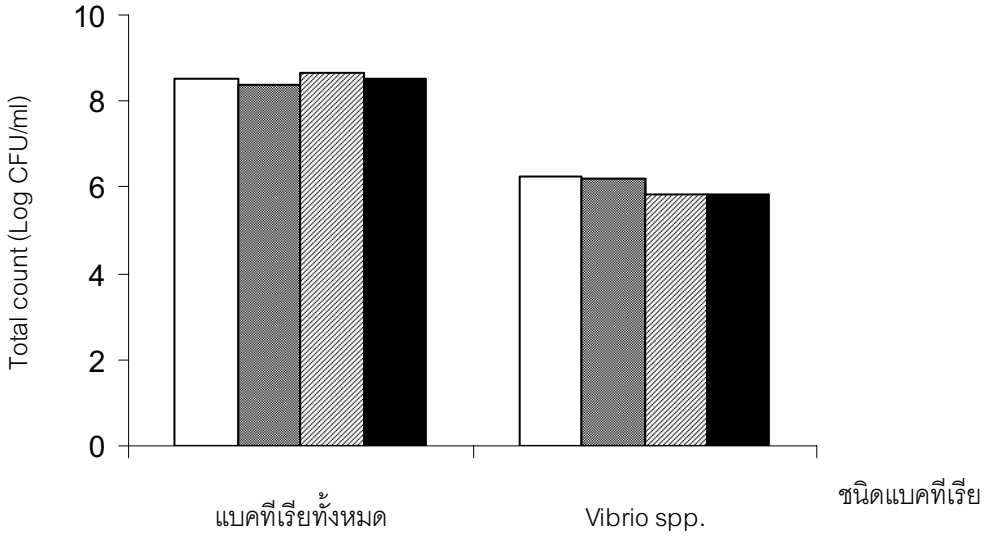
รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 90 วัน ในแต่ละกลุ่มทดลองมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเชื้อก่อโรค และใช้กุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันมาทดสอบ โดยการแช่กุ้งในแต่ละกลุ่มกลุ่มละ 6 ตัว ในน้ำที่มี *Vibrio harveyi* 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่ากุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ มีการตายสะสมมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในชั่วโมงที่ 36 (รูปที่ 8) โดยกุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสม 91.67% ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีอัตราการตายสะสม 100, 100 และ 100 % ตามลำดับ

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 9) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 3.45×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 1.81×10^6 CFU/ml กุ้งกลุ่มให้อาหารกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 2.32×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 1.61×10^6 CFU/ml กุ้งกลุ่มให้อาหารกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 4.68×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 6.48×10^5 CFU/ml และ กุ้งกลุ่มให้อาหารกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 3.24×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 6.62×10^5 CFU/ml ตามลำดับ



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 8 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม (□) และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรด-เบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3(▩), 10(▨) และ 20(■) มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากการทดลองครั้งที่1 หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639



รูปที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาดำกลุ่มควบคุม (□) และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3(▩), 10(▨) และ 20(■) มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 36ชั่วโมง จากการทดลองครั้งที่ 1

4.3 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

4.3.1 เปรียบเทียบผลของกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งความเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ ในบ่อซีเมนต์

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 90 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 3 บ่อ) คือ

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมกรดเบนโซอิก
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ โพสลาวา 60 (PL60) ในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำ 0.8 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 40 ตัวต่อบ่อ ติดตามผลการเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราเฉลี่ยของการเติบโตของกุ้งทั้ง 4 กลุ่มทดลอง (รูปที่ 10) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยที่คุณภาพน้ำในบ่ออยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 5)

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio spp.* ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 6) พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.31×10^3 - 1.11×10^4 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 3.12×10^2 - 6.59×10^2 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.94×10^3 - 4.48×10^3 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 1.86×10^2 - 4.01×10^2 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 9.11×10^2 - 7.75×10^3 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 1.17×10^2 - 7.98×10^2 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.06×10^3 - 5.96×10^3 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 1.18×10^2 - 9.89×10^2 CFU/ml

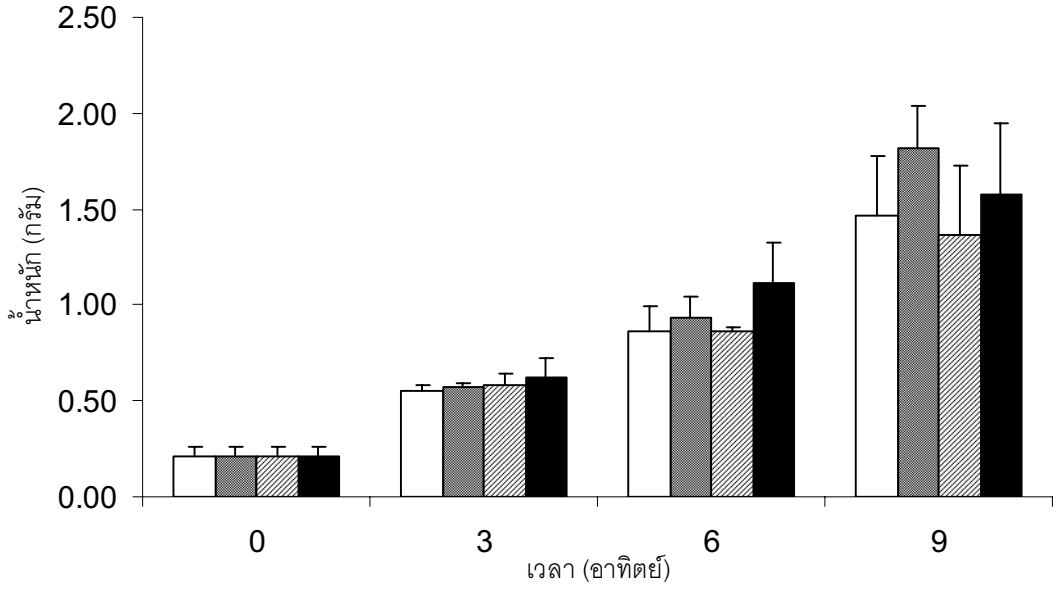
หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน พบว่าการรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P> 0.05) โดยกลุ่มควบคุมมีการรอดชีวิตประมาณ 18.52% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ14.81% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ 28.89% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ 23.70% ตามลำดับ (รูปที่ 11)

ตารางที่ 5. คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 2

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิก		
		3 มก./ ก.	10 มก./ ก.	20มก./ ก.
แอมโมเนีย (mg/l)	0.00	0.00	0.00	0.00
ไนไตรท์ (mg/l)	0.00-0.10	0.00-0.05	0.00-0.05	0.00-0.10
ฟอสเฟต(mg/l)	1.00-2.00	1.00-2.00	1.00-2.00	1.00-2.00
อุณหภูมิ(°C)	24.80-29.00	24.90-29.00	24.50-28.40	24.40-28.10
พีเอช (pH)	7.82-8.08	7.85-8.10	7.91-8.05	7.91-8.08
ความเค็ม(ppt)	17.90-23.70	16.60-25.60	20.30-23.60	21.70-25.80

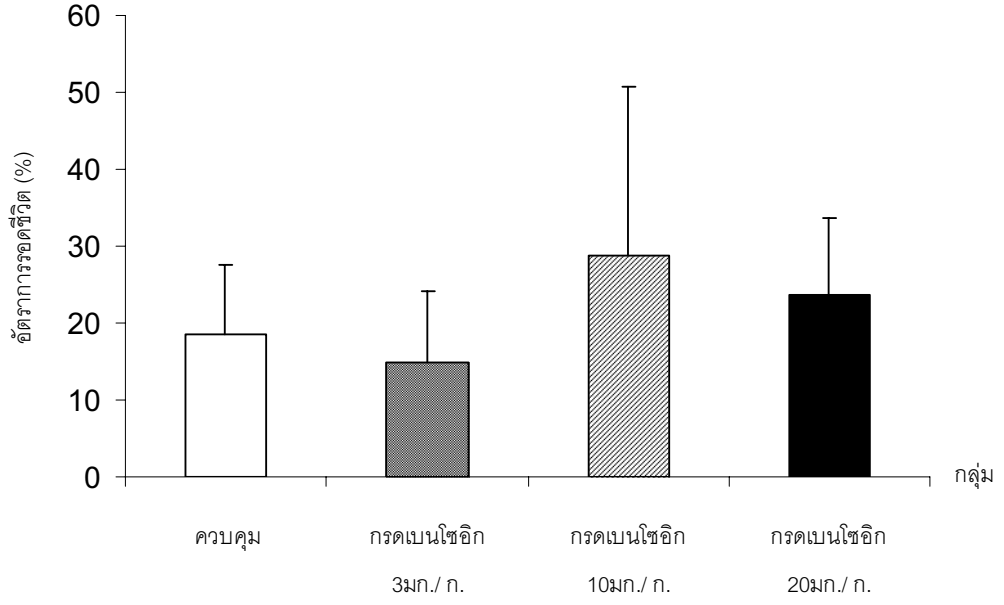
ตารางที่ 6. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิก		
		3 มก./ ก.	10 มก./ ก.	20มก./ ก.
ปริมาณแบคทีเรียรวม	3.36-4.05	3.60-3.65	2.96-3.89	3.03-3.78
Vibrio spp.	2.49-2.82	2.27-2.60	2.07-2.90	2.07-3.00



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 10 น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม (□) และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3(▨), 10(▨) และ 20(■) มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ระหว่างการทดลองครั้งที่ 2



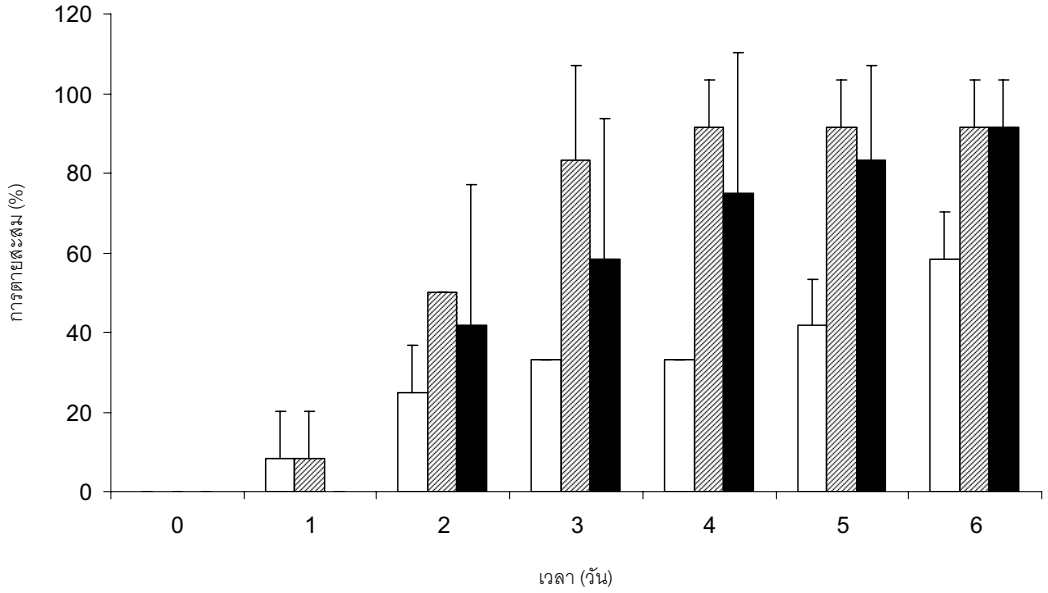
หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 11 การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 90 วัน ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ของการทดลองครั้งที่ 2

4.3.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

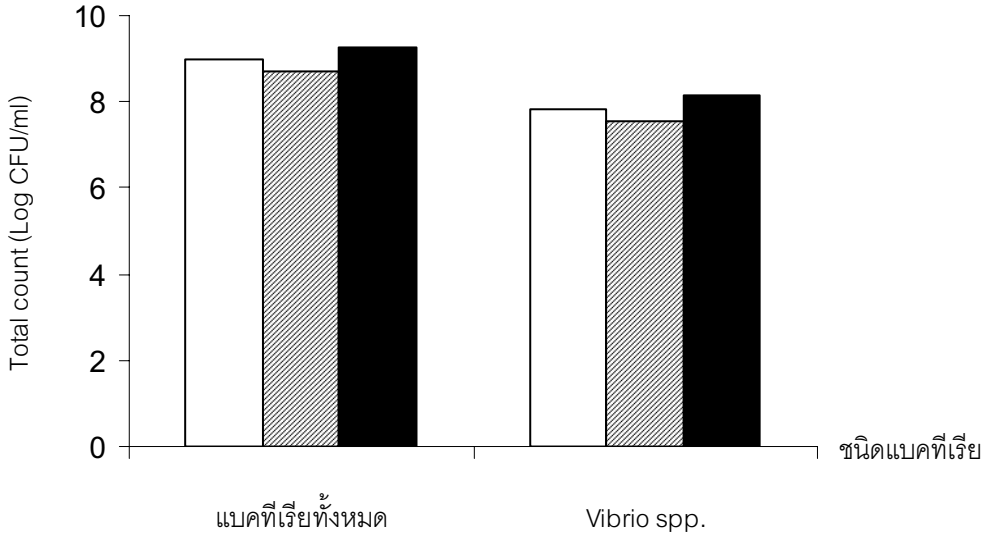
รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 90 วัน ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเชื้อก่อโรค และใช้กุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันมาทดสอบ โดยการแช่กุ้งในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ในน้ำที่มี *Vibrio harveyi* 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่ากุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ มีการตายสะสมมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในวันที่ 6 (รูปที่ 12) โดยกุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสม 58.33% ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีอัตราการตายสะสม 91.67 และ 91.67 % ตามลำดับ

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 13) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 9.56×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 6.40×10^7 CFU/ml กุ้งกลุ่มให้อาหารกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 5.10×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 3.36×10^7 CFU/ml และ กุ้งกลุ่มให้อาหารกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.91×10^9 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 1.35×10^8 CFU/ml ตามลำดับ



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 12 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม (☐) และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรด-เบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10(▨) และ 20(■) มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ จากการทดลองครั้งที่2 หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639



รูปที่ 13 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาดำกลุ่มควบคุม (☐) และกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10(▨) และ 20(■) มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 6 วันจากการทดลองครั้งที่ 2

4.4 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

4.4.1 เปรียบเทียบผลของกรดเบนโซอิก, โพรไบโอติก (BS11) และ กรดเบนโซอิกและโพรไบโอติก ต่อการเติบโตของกุ้งกุลาดำ ในบ่อซีเมนต์

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 75 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 3 บ่อ) คือ

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมกรดเบนโซอิก
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ โพสลาวา 75 (PL75) ในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำ 0.8 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 20 ตัวต่อบ่อ ติดตามผลการเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราเฉลี่ยของการเติบโตของกุ้งทั้ง 4 กลุ่มทดลอง (รูปที่ 14) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยที่คุณภาพน้ำในบ่ออยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 7)

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio spp.* ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 8) พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.54×10^3 - 1.08×10^4 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 7.23×10^2 - 1.08×10^3 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.43×10^3 - 2.61×10^4 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 2.42×10^2 - 1.55×10^3 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.62×10^3 - 1.29×10^4 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 2.46×10^2 - 1.46×10^3 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.79×10^3 - 2.73×10^4 CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 4.73×10^2 - 1.69×10^3 CFU/ml

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio spp.* ในลำไส้กุ้ง (ตารางที่ 9) พบว่าในลำไส้กุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.12 \times 10^5 - 6.92 \times 10^7$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $5.39 \times 10^4 - 3.86 \times 10^5$ CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.12 \times 10^5 - 3.73 \times 10^7$ CFU/ml *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S 11 อยู่ในช่วง $0.00 - 2.73 \times 10^5$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $5.39 \times 10^4 - 1.18 \times 10^6$ CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.12 \times 10^5 - 9.33 \times 10^6$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $5.39 \times 10^4 - 9.14 \times 10^4$ CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.12 \times 10^5 - 4.99 \times 10^6$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $5.39 \times 10^4 - 2.39 \times 10^5$ CFU/ml

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 75 วัน พบว่าการรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีการรอดชีวิตประมาณ 94.74% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 มีการรอดชีวิตประมาณ 94.74% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการรอดชีวิตประมาณ 96.49% กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 มีการรอดชีวิตประมาณ 94.74% ตามลำดับ (รูปที่ 15)

ตารางที่ 7. คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรไบโอติก	กลุ่มกรดเบนโซอิก10 มก./ ก.	กลุ่มกรดเบนโซอิก10 มก./ ก. และโพรไบโอติก
แอมโมเนีย (mg/l)	0.00-0.05	0.00-0.05	0.00-0.05	0.00-0.05
ไนไตรท์ (mg/l)	0.00-0.50	0.00-0.25	0.00	0.00-0.25
ฟอสเฟต(mg/l)	0.00-1.00	0.00-1.00	0.00-0.25	0.00-0.25
อุณหภูมิ(°C)	28.20-29.20	28.30-29.60	28.70-29.70	28.00-29.50
พีเอช (pH)	7.67-7.98	7.70-7.99	7.70-7.98	7.68-7.91
ความเค็ม(ppt)	17.40-20.10	18.10-21.90	18.20-22.90	17.10-21.00

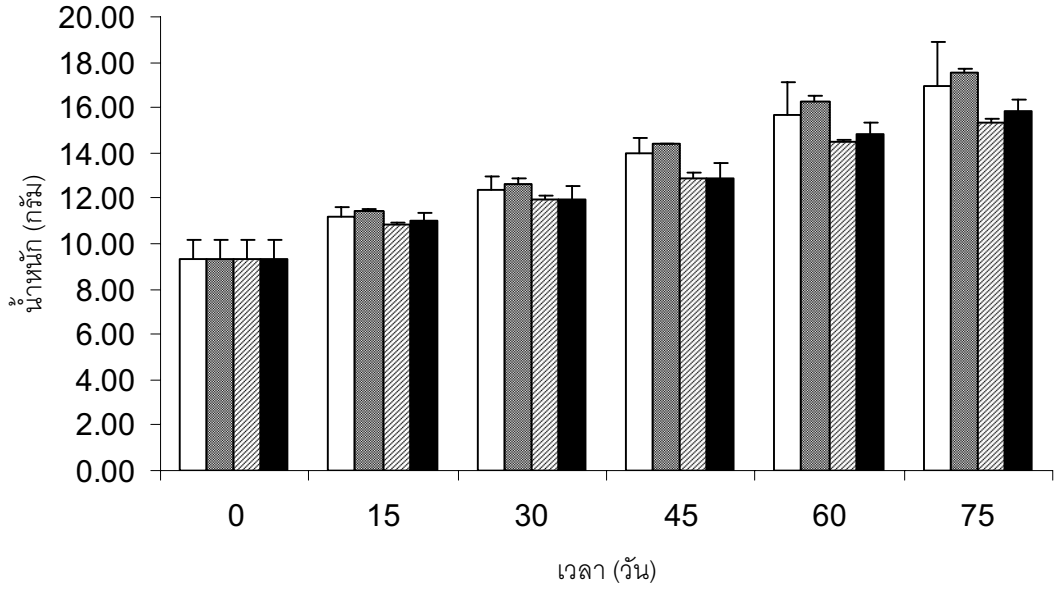
ตารางที่ 8. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่ม โพรไบโอติก	กลุ่มกรด เบนโซอิก10 มก./ ก.	กลุ่มกรด เบนโซอิก10 มก./ ก. และ โพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	3.40-4.03	3.87-4.42	3.21-4.11	3.45-4.44
Vibrio spp.	2.86-3.03	2.38-3.19	2.39-3.16	2.67-3.23

ตารางที่ 9. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในลำไส้กุ้งระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3

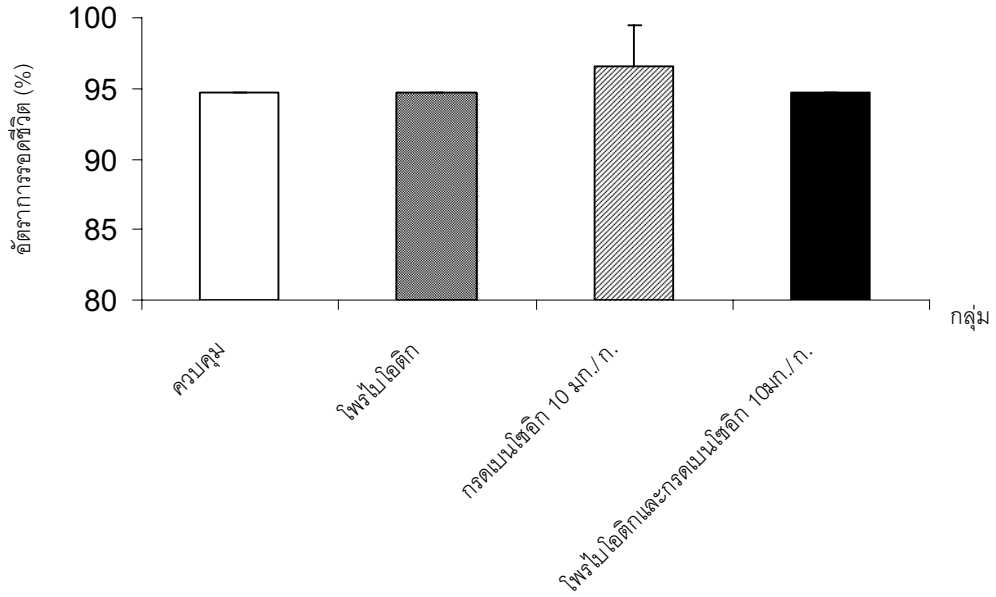
ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่ม โพรไบโอติก	กลุ่มกรด เบนโซอิก10 มก./ ก.	กลุ่มกรด เบนโซอิก10 มก./ ก. และ โพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	5.33-7.84	5.33-7.57	5.33-6.97	5.33-6.70
BS 11	ND	ND-5.44	ND	ND
Vibrio spp.	4.73-5.59	4.73-6.07	4.73-4.96	4.73-5.38

หมายเหตุ : ND หมายถึงตรวจไม่พบ



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 14 น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม (□) กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (▩), กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม (▨) และ กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (■) ตามลำดับ ระหว่างการทดลองครั้งที่ 3



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 15 การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 75 วัน ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย, กรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ของการทดลองครั้งที่ 3

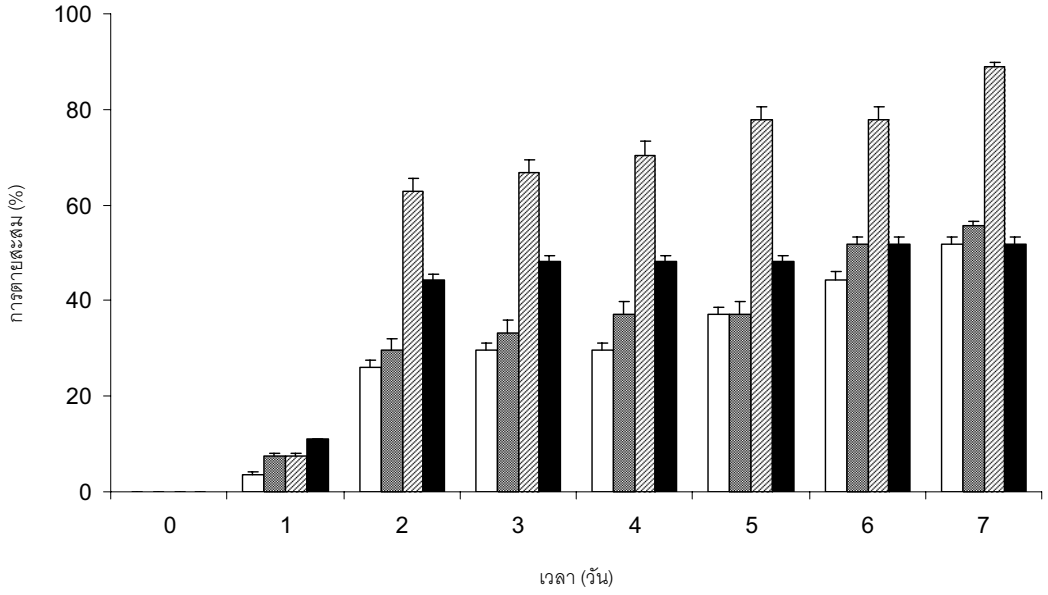
4.4.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 75 วัน ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง มาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเชื้อก่อโรค และใช้กุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันมาทดสอบ โดยการแช่กุ้งในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 9 ตัว ในน้ำที่มี *Vibrio harveyi* 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่ากุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย , กรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีการตายสะสมมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในวันที่ 7 (รูปที่ 16) โดยกุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสม 51.85% ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย , กรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีอัตราการตายสะสม 55.56, 88.89 และ 51.85 % ตามลำดับ

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 17) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สาย-

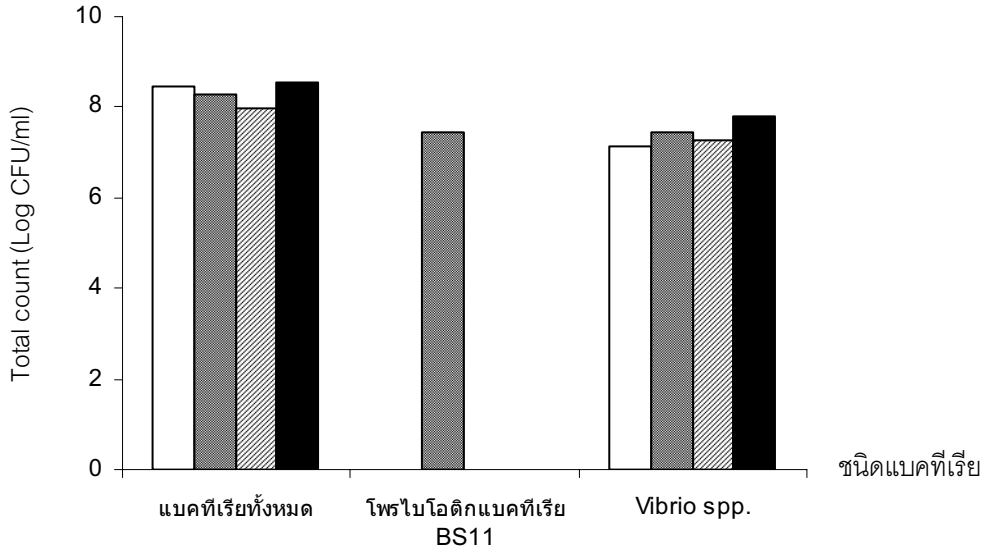
พันธุ์ 639 พบว่าลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 2.99 x 10^8 CFU/ml และ *Vibrio* spp. 1.41 x 10^7 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 1.86 x 10^8 CFU/ml *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S 11 2.68 x 10^7 CFU/ml และ *Vibrio spp.* 2.68 x 10^7 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 9.73 x 10^7 CFU/ml และ *Vibrio spp.* 1.79 x 10^7 CFU/ml กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ โพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 3.60 x 10^8 CFU/ml และ *Vibrio spp.* 6.45 x 10^7 CFU/ml

ติดตามจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 18) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าน้ำเลี้ยงกุ้งในแต่ละแต่ละกลุ่มการทดลองมีจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 1.14 x 10^4 – 5.10 x 10^7 CFU/ml

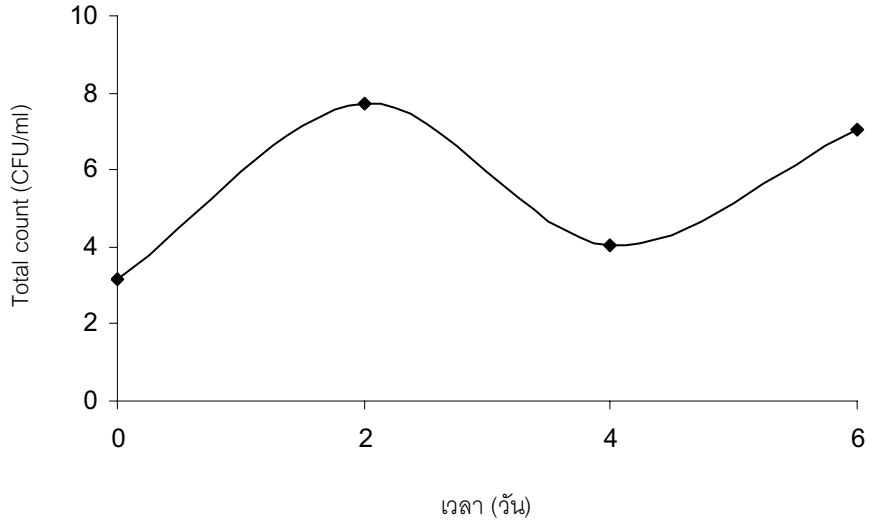


หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 16 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุม (□) กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (▩), กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม (▨) และ กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (■) ตามลำดับ จากการทดลองครั้งที่ 3 หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639



รูปที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาดำ กลุ่มควบคุม (□), กลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (▩), กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม (▨) และ กลุ่มทดลองโดยให้อาหารที่ผสมกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (■) ตามลำดับ หลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 7 วันจากการทดลองครั้งที่ 3

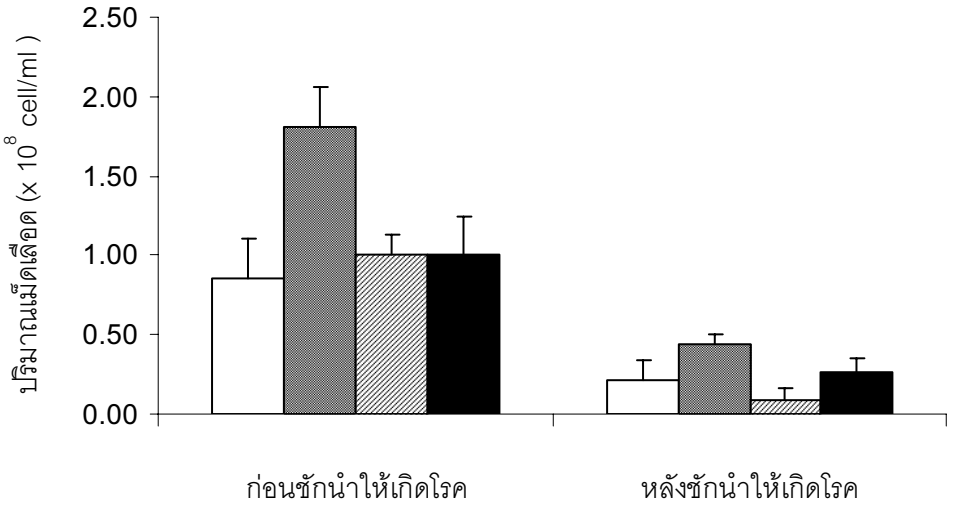


รูปที่ 18 ปริมาณ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 6 วัน จากการทดลองครั้งที่ 3

4.4.3 การตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

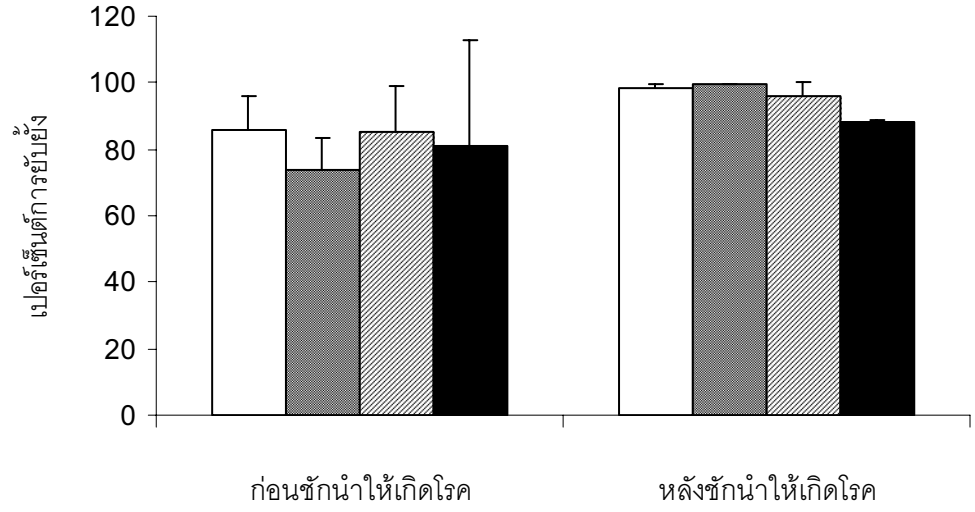
จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งแต่ละกลุ่มทดลอง หลังการเลี้ยงกุ้งอายุ 75 วัน และหลังจากการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 เป็นเวลา 2 วัน จากการทดลองปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดรวม ~$8.48x10^7$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ ~$2.14x10^7$ cell/ml กลุ่มโพรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวม ~$1.81x10^8$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ ~$4.44x10^7$ cell/ml กลุ่มกรดเบนโซอิกมีปริมาณเม็ดเลือดรวม ~$1.01x10^8$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ ~$8.56x10^6$ cell/ml กลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกมีปริมาณเม็ดเลือดรวม ~$1.01x10^8$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ ~$2.68x10^7$ cell/ml (รูปที่ 18)

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ โดยเปรียบเทียบจากความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค จากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 เมื่อกุ้งอายุ 75 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่กลุ่มกรดเบนโซอิก และ กลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคกุ้งกลุ่มควบคุมสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 85.67 และ 98.32 เปอร์เซ็นต์ กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 73.76 และ 99.65 เปอร์เซ็นต์ กุ้งกลุ่มกรดเบนโซอิกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 85.09 และ 95.70 เปอร์เซ็นต์ กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 80.90 และ 88.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 19)



หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 19 แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งกลุ่มควบคุม (□), กลุ่มโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (▩), กลุ่มกรดเบนโซอิก (▨) และ กลุ่มกรดเบนโซอิกและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (■) ตามลำดับ ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 3 เมื่อกุ้งอายุ 75วัน



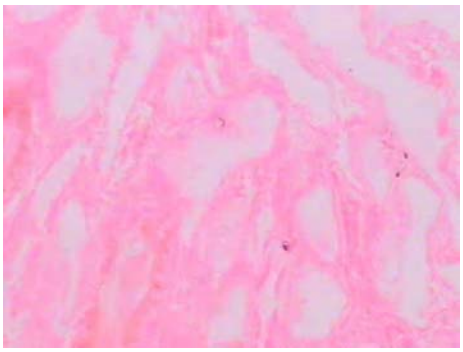
หมายเหตุ : |------| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 20 ความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค จากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งกลุ่มควบคุม (□), กลุ่มโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (▩), กลุ่มกรดเบนโซอิก (▨) และ กลุ่มกรดเบนโซอิกและโพรไบโอติกแบคทีเรีย BS11 (■) ตามลำดับ ก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 3 เมื่อกุ้งอายุ 75 วัน

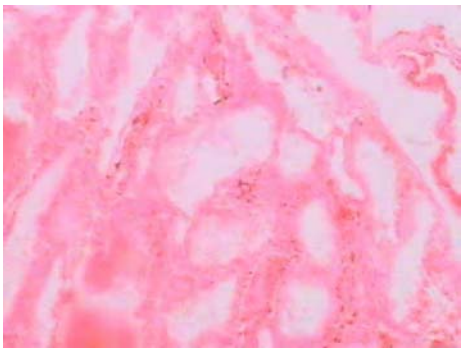
4.5 การตรวจพยาธิสภาพต่อการเกิดโรค หลังชักนำให้เกิดโรค ด้วย Immunohistochemistry

หลังจากทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งทุกกลุ่มทดลอง จากการทดลองครั้งที่ 3 จากการศึกษาพยาธิสภาพของการเกิดโรคจาก *V. harveyi* 639 ภายนอกสังเกตพบการเรืองแสงของกุ้งบริเวณหัวหลังการชักนำให้เกิดโรคในระยะที่กุ้งยังมีชีวิตอยู่

ตรวจสอบพยาธิสภาพต่อการเกิดโรคของกุ้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ที่มีความ จำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* 639 จากการตรวจสอบพบการติดเชื้อทั้งบริเวณตับ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด และหัวใจ ซึ่งสังเกตได้จากเนื้อเยื่อหลังผ่านการทดสอบมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งพบทุกกลุ่มการทดลองที่ชักนำให้เกิดโรค ดังแสดงรูปที่ 21-23



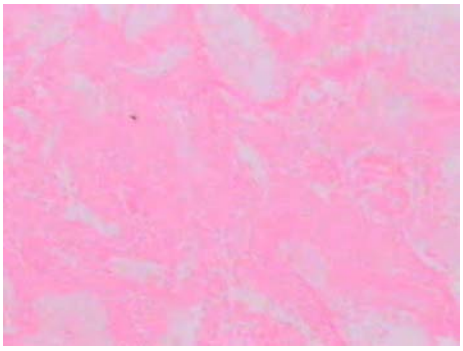
ก



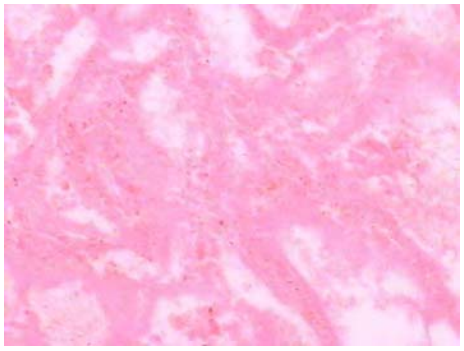
ข

หมายเหตุ : กำลังขยาย 500 เท่า

รูปที่ 21 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณตับโดยสังเกตจากตำแหน่งติดสีน้ำตาลบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (ข) เปรียบ เทียบกับเนื้อเยื่อตำแหน่งเดียวกัน (ก) (ภาพ ก, ข ย้อมด้วยสีอิโอซิน)



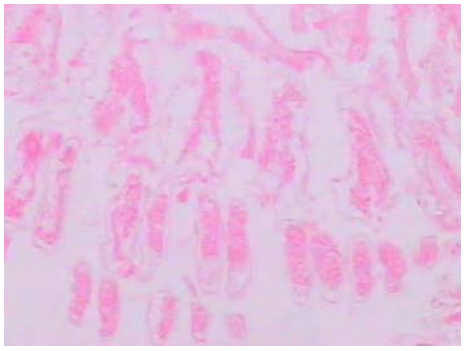
ก



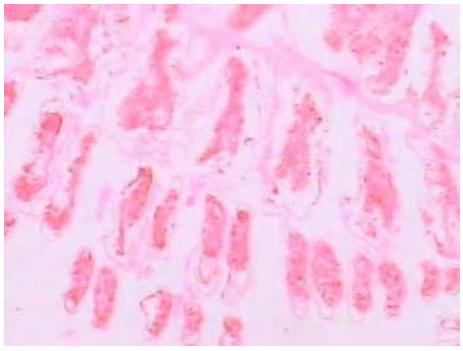
ข

หมายเหตุ : กำลังขยาย 500 เท่า

รูปที่ 22 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณอวัยวะระบบน้ำเหลืองโดยสังเกต จากตำแหน่งติดสีน้ำตาลบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (ข) เปรียบ เทียบกับเนื้อเยื่อตำแหน่งเดียวกัน (ก) (ภาพ ก, ข ย้อมด้วยสีอิโอซิน)



ก



ข

หมายเหตุ : กำลังขยาย 500 เท่า

รูปที่ 23 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณเหงือกโดยสังเกตจากตำแหน่งติดสีน้ำตาลบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (ข) เปรียบ เทียบกับเนื้อเยื่อตำแหน่งเดียวกัน (ก) (ภาพ ก, ข ย้อมด้วยสีอิโอซิน)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของกรดเบนโซอิกต่อจุลินทรีย์ก่อโรค

กรดเบนโซอิกได้รับการทดสอบแล้วว่าสามารถเสริมการเติบโตในสัตว์บกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น สุกร โค หรือ ไก่ เป็นต้น และ ผลจากการทดสอบผลของกรดเบนโซอิกต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio harveyi* แสดงให้เห็นว่า กรดเบนโซอิกสามารถลดปริมาณเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้

ผลของกรดเบนโซอิกต่ออัตราการเติบโต และการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงกุ้งในระดับตู้กระจก ในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 ใช้กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 60 จากจังหวัดฉะเชิงเทรา แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป และ กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสมกรดเบนโซอิกเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ให้อาหารกุ้งกุลาดำ 3 มื้อทุกวัน ผลการทดลองพบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่ากุ้งกลุ่มทดลอง อย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (รูปที่ 6) ส่วนการรอดชีวิตของกุ้งหลังจากทำการเลี้ยงครบ 90 วันพบว่า กุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 13.57%, 12.86%, 9.29% และ 14.29% ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตโดยรวมของกุ้งทุกกลุ่มทดลองจะมีค่าต่ำมาก เป็นเพราะการเลี้ยงกุ้งในระดับตู้กระจกไม่ให้ผลที่ดีนักเนื่องจากกุ้งเครียดและมีการกินกันเองเกิดขึ้น (รูปที่ 7)

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 ในระดับบ่อซีเมนต์ใช้กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 60 จากจังหวัดฉะเชิงเทรา แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป และ กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสมกรดเบนโซอิกเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกรัม 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม ให้อาหารกุ้งกุลาดำ 3 มื้อทุกวัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (รูปที่ 10) ส่วนการรอดชีวิตของกุ้งหลังจากทำการเลี้ยงครบ 90 วันพบว่า กุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 18.52%, 14.81%, 28.89% และ 23.70% ตามลำดับ (รูปที่ 11)

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3 ในระดับบ่อซีเมนต์ใช้กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 75 จากจังหวัดฉะเชิงเทรา แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 และกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ให้อาหารกุ้งกุลาดำ 3 มื้อทุกวัน พบว่าระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกลุ่มควบคุม และกุ้งกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (รูปที่ 14) ส่วนการรอดชีวิตของกุ้งหลังจากทำการเลี้ยงครบ 75 วันพบว่า กุ้งกลุ่มควบคุม กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และ กลุ่มอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 และกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม มีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 94.74%, 94.74%, 96.49% และ 94.74% ตามลำดับ(รูปที่ 15)

การทดลองทั้ง 3 ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากรดเบนโซอิกไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้ง และอัตราการรอดชีวิตของกุ้ง

ผลของกรดเบนโซอิกต่อภาพรวมของจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงกุ้ง และ ในลำไส้กุ้ง

ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งทั้ง 3 ครั้ง ในน้ำเลี้ยงกุ้งตรวจพบปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 2.80 - 4.44 Log CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 1.64 – 3.23 Log CFU/ml (ตารางที่ 4, 6 และ 9) สอดคล้องกับ Lavilla-Pitogo, Leano และ Paner (1998) ที่รายงานว่ามีจุลินทรีย์ในน้ำอยู่ในช่วง 2 – 4 Log CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 1 - 3 Log CFU/ml และในการทดลองครั้งที่ 3 ในลำไส้กุ้งตรวจพบปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 5.33 – 7.84 Log CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 4.73 – 6.07 Log CFU/ml และ สามารถตรวจพบโพรไบโอติก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 ในลำไส้กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกเท่านั้น โดยพบในปริมาณ ND – 5.44 Log CFU/ml (ตารางที่ 10) และการที่ไม่พบ *Bacillus* sp. S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก และในกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก รวมทั้งในลำไส้กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกในการทดลองครั้งที่ 3 อาจเป็นเพราะเชื้ออยู่ในสภาวะที่เป็นสปอร์ จึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ดังนั้นก่อนการตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ควรนำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการทำให้สปอร์งอก (heat shock) ก่อน

ผลของกรดเบนโซอิกต่อคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้ง

จากการทดสอบคุณภาพน้ำบางประการในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ครั้ง (ตารางที่ 3, 5 และ 8) นั่นคือ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ฟอสเฟต อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และความเค็ม พบว่าคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สอดคล้องกับ Rengpipat และคณะ (1998a, 2000) ซึ่งรายงานว่าไม่พบความแตกต่างกัน ในด้านคุณภาพน้ำระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก และกล่าวว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียไม่ได้ส่งผลในด้านลบต่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากรดเบนโซอิกที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งเช่นเดียวกัน

ปริมาณกรดเบนโซอิก และ โพรไบโอติก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 ในอาหารเลี้ยงกุ้ง

จากการตรวจสอบปริมาณกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งสำเร็จรูปกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ผสมกรดเบนโซอิกเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมจากการทดลองที่ 2 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า อาหารกุ้งกลุ่มควบคุมมีกรดเบนโซอิก 0 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่อาหารกุ้งกลุ่มทดลองผสมกรดเบนโซอิกเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีปริมาณกรดเบนโซอิกที่วิเคราะห์ได้ 3.48, 11.00 และ 18.05 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 7) ตามลำดับ ในการทดลองที่ 3 ตรวจสอบปริมาณโพรไบโอติกแบคทีเรียโดยวิธีนับปริมาณเชื้อมีชีวิตทั้งหมด (Total plate count) และกรดเบนโซอิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ในอาหารกุ้งกลุ่มควบคุม กลุ่มโพรไบโอติก กลุ่มกรดเบนโซอิก และกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก พบว่ากลุ่มควบคุมไม่พบทั้งโพรไบโอติกแบคทีเรียและกรดเบนโซอิก กลุ่มโพรไบโอติกพบปริมาณเชื้อประมาณ 12.87 - 12.98 Log CFU/gแต่ไม่พบกรดเบนโซอิก กลุ่มกรดเบนโซอิกไม่พบโพรไบโอติกแต่พบกรดเบนโซอิก 11.06 มิลลิกรัมต่อกรัม และกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกพบ *Bacillus* sp. S11 ประมาณ 11.98 – 12.28 Log CFU/gและพบกรดเบนโซอิก 12.10 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 11, 12) จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการผสมอาหารกุ้งในการศึกษานี้มีประสิทธิภาพและใช้ได้

ผลของกรดเบนโซอิกต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi*

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงกุ้งครบ 90 วัน ตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ได้ทำการรวบรวมกุ้งบางส่วนจากแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อครบ 36 ชั่วโมงหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมเป็น 91.67% ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิกเข้มข้น 3, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีอัตราการตายสะสม 100%, 100% และ100% ตามลำดับ หลังจากเหนี่ยวนำเกิดโรคเป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกับกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (รูปที่ 8)

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 เมื่อเลี้ยงกุ้งตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ได้ทำการรวบรวมกุ้งบางส่วนจากแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงโดยวิธีการแช่ (immersion technique) ด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 และเมื่อครบ 6 วันหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมเป็น 58.33% ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิกเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกรัม มีอัตราการตายสะสม 91.67% และ91.67% ตามลำดับ หลังจากเหนี่ยวนำเกิดโรคเป็นเวลานาน 6 วันซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (รูปที่ 12)

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3 เมื่อเลี้ยงกุ้งครบ 75 วัน ตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ได้ทำการรวบรวมกุ้งมาทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 และเมื่อครบ 7 วันหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมเป็น 51.85% ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมโพรไบโอติกมีอัตราการตายสะสมเป็น 55.56% กุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมกรดเบนโซอิกมีอัตราการตายสะสม 88.89% และกุ้งกลุ่มทดลองโดยให้อาหารผสมโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกมีอัตราการตายสะสมเป็น 51.85% ตามลำดับ หลังจากเหนี่ยวนำเกิดโรคเป็นเวลานาน 7 วัน ซึ่งอัตราการตายของกุ้งที่ได้รับกรดเบนโซอิกสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม และ กลุ่มควบคุมบวก อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนอัตราการตายของกุ้งกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก และกรดเบนโซอิก ซึ่งมี

อัตราการตายสะสมเท่ากับกลุ่มควบคุม เพราะว่า กุ้งที่ไม่ตายจากการชักนำให้เกิดโรคเริ่มเกิดการทนทานต่อเชื้อก่อโรค (รูปที่ 16)

จากการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 จากการทดลอง 3 ครั้งนี้ แสดงว่ากรดเบนโซอิกไม่มีผลในการเสริมความต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งกุลาดำ และ ในการทดลองที่ 3 กุ้งกลุ่มโพรไบโอติก มีอัตราการตายสะสมสูงกว่ากลุ่มควบคุม อาจเป็นเพราะว่า การเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3 นี้เริ่มต้นจากกุ้งอายุประมาณ 2 เดือน ซึ่งหากกุ้งมีอายุมากจะมีภูมิต้านทานการเกิดโรคสูงขึ้นตามไปด้วย และ เนื่องจากกุ้งที่นำมาใช้ในการทดลองได้มาจากการเลี้ยงในบ่อดิน ดังนั้นจุลินทรีย์เจ้าถิ่น (Normal flora) ในลำไส้กุ้งจากบ่อดินอาจมีผลให้กุ้งแข็งแรงขึ้นได้ แต่การเลี้ยงกุ้งโดยเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรียแบบ Allochthonous ให้ได้ประสิทธิภาพนั้นควรเริ่มจากกุ้งที่มีอายุน้อย (Rengpipat และคณะ, 2000)

ผลของกรดเบนโซอิกต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

การทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ จากการทดลองครั้งที่ 3 หลังการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 75 วัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในกลุ่มทดลอง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยกลุ่มโพรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากที่สุด ตามด้วย กลุ่มกรดเบนโซอิก และกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก ตามด้วย กลุ่มควบคุม ซึ่งทุกกลุ่มมีปริมาณเม็ดเลือดรวมประมาณ 10^8 cell/ml และลดลงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (รูปที่ 19) ส่วนการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากสารน้ำ โดยเปรียบเทียบจากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้ง จากการทดลองครั้งที่ 3 หลังการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 75 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มทดลองสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แตกต่างกับกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคแล้วกุ้งทั้ง 4 กลุ่มสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแบคทีเรียในเลือดมากขึ้น และ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$) (รูปที่ 20) โดยกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคสูงที่สุด ตามด้วยกลุ่มควบคุม กลุ่มกรดเบนโซอิก และกลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิกตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกุ้งให้สูงขึ้นได้ แตกต่างจากกรดเบนโซอิกซึ่งความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคที่สร้างเพิ่มขึ้นหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคนั้น ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$) แสดงว่ากรดเบนโซอิกไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้นั่นเอง

สรุปผลการทดลอง

1. กรดเบนโซอิกที่เสริมในอาหารไม่สามารถเพิ่มการเติบโตกุ้งกุลาดำได้
2. กรดเบนโซอิกที่เสริมในอาหารไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำ
3. เมื่อทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าในการทดลองที่ 3 กุ้งที่ได้รับกรดเบนโซอิกมีอัตราการตายสะสมสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)
4. การทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ พบว่ากรดเบนโซอิกไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้สูงขึ้นได้
5. การใช้โพรไบโอติก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 เป็นกลุ่มควบคุมบวก อาจต้องเริ่มทดลองโดยใช้กุ้งที่มีอายุน้อย เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมศุลกากร. 2549.การส่งออกกุ้ง ปี 2548. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 210: 4.

กลุ่มบัณฑิตก้าวหน้า. 2531. การเพาะเลี้ยงและเพิ่มผลผลิตกุ้งกุลาดำ กรุงเทพมหานคร: รุ่งเรืองการพิมพ์.

คมสัน ลีลาคหกิจ. 2539. กฎหมายใหม่ของญี่ปุ่นกับการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทย. วิชาการปริทัศน์ 2: 6-8.

จิราพร เกษรจันทร์. 2537. เชื้อไวรัสกุ้งกุลาดำที่พบในบ้านเรา. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ข่าวกุ้ง. 72:1-4.

ตารางการใช้วัตถุเจือปนอาหารแนบท้ายประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร. 2547. แหล่งที่มา : http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntf/DirtyFood3Attach.html [Online] [6 กันยายน 49]

ทีมงานข่าวกุ้ง. 2548. ส.กุ้งไทย โวยศุลกากรสหรัฐฯ เก็บซี-บอนด์โหด เก็บดองข้ามปี แถมยังต้องวางใหม่เพิ่มอื้อ. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง. 209: 1,4

นสพ.โพสต์ทูเดย์ ฉบับวันที่ 22 กันยายน 2548. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง. 206 : 1-2.

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2539. ลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว. ข่าวเทคโนโลยีชีวภาพ. 2: 4.

พลพิสิฐ อุทิศวรรณกุล. 2548. การเสริม *Bacillus subtilis* P11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ในภาคสนาม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสมัย โพธิ์เวชกุล. 2547. เปรียบเทียบผลของโพรไบโอติกจากแบคทีเรียกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเชิงพาณิชย์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. กุ้งกุลาดำ. โครงการหนังสือเกสรชุมชน. กรุงเทพมหานคร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบัติ รักประทานพร. 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริเพ็ญ สังข์ชัย. 2546. โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11 สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio Harveyi*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2539. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารวาริชศาสตร์. 3: 42-51.

อรุณ ธัญญนันท์. 2544. การเสริม *Bacillus* S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับทดลองภาคสนาม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Anderson, D.P., 1997. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annu. Rev. Fish Dis. 2: 281-307.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P. A. W., Effendi, I. and Griffith, D. R. W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18: 93-96.

Bahruddin Saad, Md. Fazlul Bari, Muhammad Idiris Saleh, Kamarudzaman Ahmad, and Mohd. Khairuddin Mohd. Talib. 2005. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 1073 : 393-397.

Benzoic acid, from Wikipedia, the free encyclopedia. Source : http://en.wikipedia.org/wiki/Benzoic_ acid [Online] [8 ธันวาคม 48]

Brusca, R. C. and Brusca, G. J. 1990. Invertebrates. Massachusetts: Sinauer Associates, 922 pp.

Castillo, C., Benedito, J.L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso, M., Miranda, M., and Hernández, J. 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. Animal Feed Science and Technology. 115 : 101-116.

Dolfing, J., Gottschal, J.C. 1997. Microbe-microbe interactions. In: Mackie, R.I., With, B.A., Isaacson, R.E. (Eds.), Gastrointestinal Microbiology, pp. 373-433. New York: International Thomson Publishing.

Evelyn, T.P.T. 1996. Infection and disease. In: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment, Fish Physiol. Series 15, pp. 339-366. San Diego, CA, USA. Academic Press.

Flegal, T.w., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantanachookhin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In Fulks, W. and Main, K.L. (eds), Disease of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, pp. 57-112. Hawii : The Oceanic Institute.

Heres, L., Engel, B., Urlings, H.A.P., Wagenaar, J.A., and van Knapen, F. 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. Veterinary Microbiology. 99 : 259-267.

Johansson, M.W., Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol. Today 5, 171–176.

Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., and Jensen, B.B. 2002. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. Animal Feed Science and Technology. 99 : 131-140.

Kopacek, P., Grubhoffer, L. and Söderhäll , K. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Developmental and Comparative Immunology17: 407-418.

Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Larcier da, E. R. and de la Pena, L. D. 1990. Occurrence of the luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture. 19: 1-13.

Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnostic methods. Aquaculture.164: 201-220.

Maeda, M., Liao, I.C. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. 21: 25-29.

Millar, D. A. and Ratcliffe, N. A. 1994. Invertebrates. In: Turner, R. J. (editor). Immunology, a comparative approach. England: John Wiley & Sons Ltd, pp. 29-68.

Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. 164: 351-358.

Motoh, H. 1984. Biology and ecology of *Penaeus monodon*. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimp. SEAFDEC Aquaculture Department, Iloilo City, pp. 27-36.

Phianphak, W., Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., and Sithigorngul, P. 2005. Production of monoclonal antibodies for detection of *V. harveyi*, Dis. Aquat. Organ. 63 : 161-168

Primavera, J. H. 1990. External and internal anatomy of adult penaeid prawns/shrimps. SEAFDEC, Aquaculture Department, The Philippines, Poster.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol.97: 183–350.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. 167 : 301-313.

Renapipat, S., Rukprataporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In T. W. Flegel (ed.), Advances in shrimp biotechnology, pp. 177-181. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biology.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture. 19: 271– 288.

Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A.W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 2003. Enhance growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reard black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. DAO. 55: 169-173.

Schnapp, D., Kemp, G.D., Smith, V.J. 1996. Purification and characterization of a praline-rish antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab *Carcinus maenas*. Eur. J. Biochem.240: 532-539.

Snieszko, S.F. 1973. Disease of fishes and their control in the U.S. In: The two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report, pp. 55-66. London : Jansen. Cited in Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201-220.

Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat.Org 42: 27-34.

Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon.* Diseases of Aquatic Organisms. 49: 71-76.

Thornqvist, P.-O., Soderhall, K. 1997. Crustacean immune reactions, a short review. In: Flegel, T.W., MacRae, I.H. Eds. , Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 203–218.

Torbjörn, Holmblad. and Kenneth Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzyme in crustacean, possible role in immunity. Aquaculture172: 111–123.

Yeh, M. S., Chen, Y. L. and Tsai, I. H. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. Comparative Biochemistry and Physiology 121B : 169-176.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง และภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11(BS11)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

2. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) + 2% Nacl

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3$\pm$0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar) + 2% Nacl

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3$\pm$0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

4. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) + 2% Nacl

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม
เฟอริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 8.6 $\pm$ 0.2

ต้มเดือดประมาณ 2-3 นาที จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

Bacillus sp. **สายพันธุ์** S11 (BS11) -probiotics

preculture โดยเพาะเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 (BS11) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว200รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 (BS11) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. นำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็น 10 นาที เก็บเซลล์ในรูปเซลล์สดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

Vibrio harveyi **สายพันธุ์** 639

นำเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/ปริมาตร) และน้ำตาลกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดียวสีเขียวลงในอาหาร TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้เชื้อที่ได้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อๆไป

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค Immunohistochemistry

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
Gelatin	1	กรัม
Distilled water	100	มล.

2. Davidson's fixative

95 % Ethyl alcohol	30	มล.
100 % Formalin	20	มล.
Glacial acetic acid	10	มล.
Distilled water	30	มล.

3. Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M, pH 7.2

NaCl	8	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1.5	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตรเป็น	1000	มล.

4. สารละลาย Calf Serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10	มล.
Phosphate buffered saline	100	มล.

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

Aluminium Potassium Sulphate	8	กรัม
Hematoxylin	8	กรัม

95% Ethyl alcohol	400	
มล.		
Glycerine	400	มล.
Glacial acetic acid	400	มล.
Distilled water	400	มล.

6. 0.2 % Eosin Y ใน 95% Ethyl alcohol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% Ethyl alcohol	100	มล.

สารเคมีที่ใช้ศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้ง

1. สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Alsever'solution (AS)

NaCl	14.01	กรัม
Glucose	36.17	กรัม
EDTA	2.31	กรัม
Na-citrate(tri)	5.68	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตรเป็น	1000	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.2		

2. สารละลาย Van Harrevald's salt

NaCl	11.98	กรัม
KCl	0.40	กรัม
$CaCl_2$	1.50	กรัม
Mg_2Cl	0.53	กรัม
$NaHCO_3$	0.19	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตรเป็น	1000	มล.
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บที่ 4 ^oC		

ภาคผนวก ค

การให้อาหารกุ้งกุลาดำ

1. สูตรอาหารกุ้ง

ปลาป่น	32.0	%(w/w)
ถั่วเหลืองป่น	25.0	%(w/w)
หัวกุ้งป่น	10.0	%(w/w)
เลซิทิน	1.0	%(w/w)
แป้งสาลี	20.0	%(w/w)
กลูเตน (Wheat gluten)	5.0	%(w/w)
วิตามินรวม	2.0	%(w/w)
เกลือแร่รวม	3.0	%(w/w)
น้ำมันปลา	5.0	%(w/w)

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอัดเม็ด

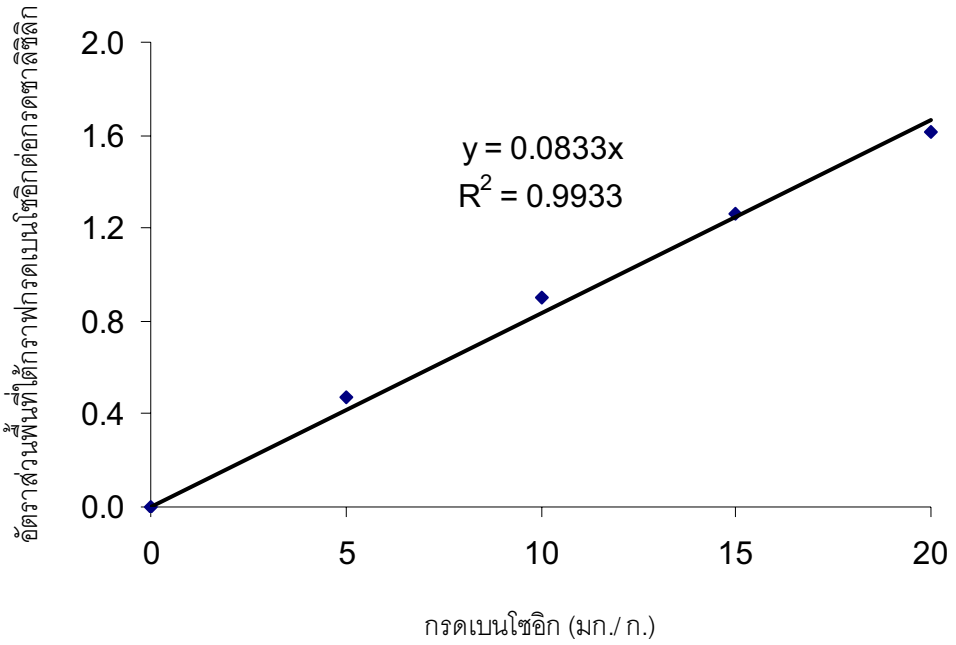
2. อัตราการให้อาหารกุ้งกุลาดำ

PL15 - PL30	50%น้ำหนักตัว	3-5 ครั้งต่อวัน
PL30 – 1 กรัม	20%น้ำหนักตัว	3-5 ครั้งต่อวัน
1 – 5 กรัม	10%น้ำหนักตัว	3 ครั้งต่อวัน
5 – 10 กรัม	6%น้ำหนักตัว	3 ครั้งต่อวัน
10 – 20 กรัม	4%น้ำหนักตัว	4 ครั้งต่อวัน
20– 30 กรัม	3%น้ำหนักตัว	4 ครั้งต่อวัน
มากกว่า 30 กรัม	2%น้ำหนักตัว	4 ครั้งต่อวัน

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานของกรดเบนโซอิก เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



ภาคผนวก จ

วิธีการคำนวณ

การคำนวณปริมาณกรดเบนโซอิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากกราฟมาตราฐานของกรดเบนโซอิกเมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยมีกรดซาลิซิลิกเป็นสารมาตรฐานภายใน สามารถคำนวณหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดเบนโซอิกได้ดังนี้

$$\text{กรดเบนโซอิก (มก./ ก.)} = \frac{\text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของกรดเบนโซอิกต่อกรดซาลิซิลิก}}{\text{ความชัน}}$$

ภาคผนวก ฉ

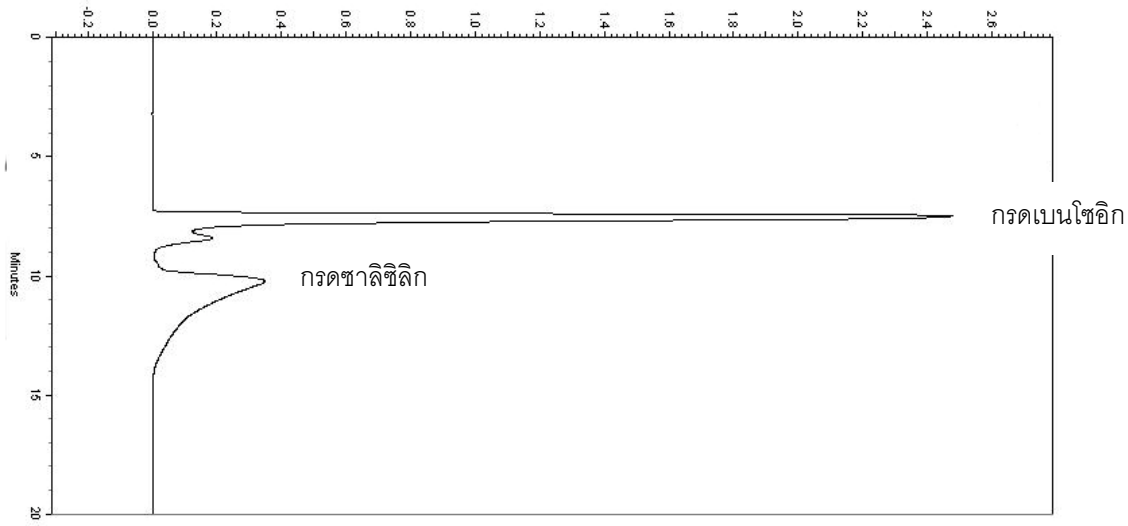
ปริมาณโพรไบโอติกแบคทีเรียและกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้ง

การวิเคราะห์กรดเบนโซอิกโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

นำอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมกรดเบนโซอิกมาละลายเมทิลแอลกอฮอล์ 99% อัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Shimadzu โดยใช้คอลัมน์ Inertsil® ODS-3 ใช้เมทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายกรดอะซีติก pH 2.8 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 2.75 นาโนเมตร โดยมีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐาน และ กรดซาลิซิลิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) คำนวณหาปริมาณกรดเบนโซอิกตามวิธีในภาคผนวก จ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานภายในภาคผนวก ง

การหาปริมาณกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลว-สมรรถนะสูง โดยโครมาโทแกรมของกรดเบนโซอิกแสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาในคอลัมน์(Retention time) ของกรดเบนโซอิก และกรดซาลิซิลิก มีค่าประมาณ 7.5 และ 10 นาที (รูปที่ 14) ตามลำดับ พบว่า (ตารางที่7) อาหารกุ้งกลุ่มควบคุมมีกรดเบนโซอิก 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม กลุ่มผสมกรดเบนโซอิก 3 มิลลิกรัมต่อกรัม 3.48 มิลลิกรัมต่อกรัม กลุ่มผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม 11.00 มิลลิกรัมต่อกรัม และ กลุ่มผสมกรดเบนโซอิก 20 มิลลิกรัมต่อกรัม 18.05 มิลลิกรัมต่อกรัม



รูปที่ 14 โครมาโทแกรมของกรดเบนโซอิก โดยมีกรดซาลิซิลิกเป็นสารมาตรฐานภายใน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดเบนโซอิก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ในอาหารกุ้งในการทดลองครั้งที่ 2

กลุ่ม	ปริมาณกรดเบนโซอิกที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ควบคุม	0.00
กรดเบนโซอิก 3 มิลลิกรัมต่อกรัม	3.48
กรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม	11.00
กรดเบนโซอิก 20 มิลลิกรัมต่อกรัม	18.05

การหาปริมาณโพรไบโอติกแบคทีเรีย และ กรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งจากการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3

ติดตามปริมาณโพรไบโอติกแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมเสร็จใหม่(ตารางที่11) พบว่าอาหารกุ้งกลุ่มควบคุม และ กลุ่มกรดเบนโซอิกไม่พบ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 ในขณะที่กลุ่มโพรไบโอติก และ กลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก พบ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 ในช่วง 7.33 $x10^{12}$ – 9.47 $x10^{12}$ CFU/g และ 9.47 $x10^{11}$ – 1.90 $x10^{12}$ CFU/g ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดเบนโซอิกในอาหารกุ้งโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลว-สมรรถนะสูง (ตารางที่12) พบว่า อาหารกุ้งกลุ่มควบคุมมีกรดเบนโซอิก 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม กลุ่มโพรไบโอติก 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม กลุ่มผสมกรดเบนโซอิก 11.06 มิลลิกรัมต่อกรัม และ กลุ่ม-โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก 12.10 มิลลิกรัมต่อกรัม

ตารางที่ 11. ปริมาณ *Bacillus* sp. S11 (Log CFU/g) ในอาหารกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3

กลุ่ม	ปริมาณโพรไบโอติกแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)
ควบคุม	ND
โพรไบโอติก	12.87-12.98
กรดเบนโซอิก	ND
โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก	11.98-12.28

หมายเหตุ : ND หมายถึงตรวจไม่พบ

ตารางที่ 12. ปริมาณกรดเบนโซอิก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ในอาหารกุ้งในการทดลองครั้งที่ 3

กลุ่ม	ปริมาณกรดเบนโซอิกที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ควบคุม	ND
โพรไบโอติก	ND
กรดเบนโซอิก	11.06
โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก	12.10

หมายเหตุ : ND หมายถึงตรวจไม่พบ

ภาคผนวก ช

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ 13 อิทธิพลของกรดเบนโซอิก ต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่อเวลา (ชั่วโมง)

ปริมาณกรดเบนโซอิก	ปริมาณเชื้อในแต่ละ ชั่วโมง (Log CFU/ml)				
	0	6	12	18	24
0 มก./ มล.	8.36	8.19	8.47	8.75	8.95
1 มก./ มล.	8.36	8.23	8.48	8.45	8.16
2 มก./ มล.	8.36	8.48	8.46	8.51	8.56
3 มก./ มล.	8.36	8.30	8.38	8.47	8.61
10 มก./ มล.	8.36	8.58	8.47	8.00	7.73
20 มก./ มล.	8.36	8.48	8.39	7.38	7.36

ตารางที่ 14 อิทธิพลของกรดเบนโซอิก ต่อการเจริญของ *Vibrio harveyi* 639 เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสต่อเวลา (ชั่วโมง)

ปริมาณกรดเบนโซอิก	ปริมาณเชื้อในแต่ละ ชั่วโมง (Log CFU/ml)				
	0	6	12	18	24
0 มก./ มล.	8.37	8.62	8.60	8.50	8.30
1 มก./ มล.	8.37	8.30	8.29	8.00	8.10
2 มก./ มล.	8.37	8.05	8.32	7.99	7.95
3 มก./ มล.	8.37	8.22	8.18	7.18	7.18
10 มก./ มล.	8.37	8.18	7.46	7.00	6.40
20 มก./ มล.	8.37	8.45	6.52	6.48	6.42

ตารางที่ 15 ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำ การทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

อาทิตย์ที่	น้ำหนัก (กรัม)			
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.
0	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
2	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02
4	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03
6	0.29 ± 0.07	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.27 ± 0.07
8	0.35 ± 0.08	0.39 ± 0.07	0.34 ± 0.06	0.34 ± 0.10
10	0.38 ± 0.09	0.43 ± 0.11	0.41 ± 0.10	0.34 ± 0.14
12	0.46 ± 0.09	0.50 ± 0.22	0.48 ± 0.14	0.39 ± 0.09

หมายเหตุ: n = กุ้ง 140 ตัว

ตารางที่ 16 ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำ การทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

อาทิตย์ที่	น้ำหนัก (กรัม)			
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.
0	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.06
3	0.56 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.06	0.63 ± 0.10
6	0.86 ± 0.13	0.93 ± 0.11	0.86 ± 0.02	1.11 ± 0.22
9	1.46 ± 0.32	1.81 ± 0.22	1.37 ± 0.36	1.58 ± 0.37

หมายเหตุ: n = กุ้ง 30 ตัว

ตารางที่ 17 ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำ การทดลองครั้งที่ 3 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

วันที่	น้ำหนัก (กรัม)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
0	9.30 ± 0.83	9.30 ± 0.83	9.30 ± 0.83	9.30 ± 0.83
15	11.18 ± 0.40	11.44 ± 0.11	10.81 ± 0.12	11.03 ± 0.31
30	12.34 ± 0.64	12.61 ± 0.28	11.92 ± 0.17	11.99 ± 0.58
45	13.99 ± 0.67#	14.37 ± 0.04#	12.88 ± 0.23#	12.91 ± 0.65#
60	15.72 ± 1.37	16.31 ± 0.23	14.48 ± 0.07	14.81 ± 0.57
75	16.97 ± 1.89	17.57 ± 0.10	15.31 ± 0.20	15.84 ± 0.49

หมายเหตุ: n = กุ้ง 60 ตัว

แสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 18 การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำหลังจากทดลองครั้งที่ 1 และ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

จำนวนครั้งของการทดลอง	การรอดชีวิต (%)			
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.
1	13.57 ± 4.76	12.86 ± 8.09	9.29 ± 4.50	14.29 ± 8.86
2	18.52 ± 8.98	14.81 ± 9.25	28.89 ± 21.89	23.70 ± 10.02

หมายเหตุ: ครั้งที่1 n = 7 ตู้ , ครั้งที่2 n = 3 บ่อ

ตารางที่ 19 การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำหลังจากทดลองครั้งที่ 3 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

จำนวนครั้งของการทดลอง	การรอดชีวิต (%)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
3	94.74 ± 0.00	94.74 ± 0.00	96.49 ± 3.04	94.74 ± 0.00

หมายเหตุ: n = 3 บ่อ

ตารางที่ 20 การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชั่วโมงที่	การตายสะสม (%)			
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.
0	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.00	0.00	0.00	0.00
18	16.67 ± 0.00	33.34 ± 47.14	50.00 ± 47.14	50.00 ± 0.00
24	66.67 ± 23.57	83.34 ± 23.57	66.67 ± 47.14	83.34 ± 23.57
30	66.67 ± 23.57	83.34 ± 23.57	83.34 ± 23.57	91.67 ± 11.79
36	91.67 ± 11.79	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: n = 2 ตู้

ตารางที่ 21 การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

วันที่	การตายสะสม (%)		
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.
0	0.00	0.00	0.00
1	8.33 ± 11.79	8.33 ± 11.79	0.00
2	25.00 ± 11.79	50.00 ± 0.00	41.67 ± 35.36
3	33.33 ± 0.00	83.33 ± 23.57	58.33 ± 35.36
4	33.33 ± 0.00	91.67 ± 11.79	75.00 ± 35.36
5	41.67 ± 11.79	91.67 ± 11.79	83.33 ± 23.57
6	58.33 ± 11.79	91.67 ± 11.79	91.67 ± 11.79

หมายเหตุ: n = 3 บ่อ

ตารางที่ 22 การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 3 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

วันที่	การตายสะสม (%)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	3.70 ± 0.58	7.41 ± 0.58	7.41 ± 0.58	11.11 ± 0.00
2	25.93 ± 1.53	29.63 ± 2.31	62.96 ± 2.52	44.44 ± 1.00
3	29.63 ± 1.53	33.33 ± 2.65	66.67 ± 2.65	48.15 ± 1.15
4	29.63 ± 1.53	37.04 ± 2.89	70.37 ± 2.89	48.15 ± 1.15
5	37.04 ± 1.53	37.04 ± 2.89	77.78 ± 2.65	48.15 ± 1.15
6	44.44 ± 1.73	51.85 ± 1.53	77.78 ± 2.65	51.85 ± 1.53
7	51.85 ± 1.53#	55.56 ± 1.00#	88.89 ± 1.00#	51.85 ± 1.53#

หมายเหตุ: n = 3 บ่อ

แสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 23 ปริมาณเชื้อในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากการทดลองครั้งที่ 1

กลุ่ม	จำนวนเชื้อ (Log CFU/ml)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	*Vibrio* spp.
ควบคุม	8.54	6.26
กรดเบนโซอิก 3 มก./ก.	8.37	6.21
กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	8.67	5.81
กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.	8.51	5.82

ตารางที่ 24 ปริมาณเชื้อในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 6 วัน จากการทดลองครั้งที่ 2

กลุ่ม	จำนวนเชื้อ (Log CFU/ml)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	*Vibrio* spp.
ควบคุม	8.98	7.81
กรดเบนโซอิก 10 มก./ก.	8.71	7.53
กรดเบนโซอิก 20 มก./ก.	9.28	8.13

ตารางที่ 25 ปริมาณเชื้อในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 7 วัน จากการทดลองครั้งที่ 3

กลุ่ม	จำนวนเชื้อ (Log CFU/ml)		
	แบคทีเรียทั้งหมด	BS11	*Vibrio* spp.
ควบคุม	8.48	0	7.15
โพรไบโอติก	8.27	7.43	7.43
กรดเบนโซอิก	7.99	0	7.25
โพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก	8.56	0	7.81

ตารางที่ 26 ปริมาณ *Vibrio harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 3

วันที่	ปริมาณ *Vibrio harveyi* (Log CFU/ml)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
0	3.12	3.13	3.17	3.20
2	7.67	7.73	7.70	7.72
4	4.05	4.04	4.08	4.06
6	7.11	7.06	7.03	7.05

ตารางที่ 27 ปริมาณเม็ดเลือด การทดลองครั้งที่ 3 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

สภาวะ	ปริมาณเม็ดเลือด ($x10^8$ cell/ml)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
ก่อนชักนำให้เกิดโรค	0.85 ± 0.25#	1.81 ± 0.25#	1.01 ± 0.12#	1.01 ± 0.23#
หลังชักนำให้เกิดโรค	0.21 ± 0.13#	0.44 ± 0.06#	0.09 ± 0.07#	0.27 ± 0.08#

หมายเหตุ: n = กุ้ง 3 ตัว

แสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 28 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง)ในพลาสมากุ้งกุลาดำ ในการทดลองครั้งที่ 3 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

สภาวะ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
ก่อนชักนำให้เกิดโรค	85.67 ± 10.36	73.76 ± 9.75	85.09 ± 13.68	80.90 ± 31.98
หลังชักนำให้เกิดโรค	98.32 ± 1.21#	99.65 ± 0.19#	95.70 ± 4.65#	88.37 ± 0.58#

หมายเหตุ: n = กุ้ง 3 ตัว

แสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 29 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้ง การทดลองครั้งที่ 1

อาทิตย์ที่	แบคทีเรียทั้งหมด (Log CFU/ml)				*Vibrio* spp.(Log CFU/ml)			
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ ก.	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ ก.
1	4.06	2.81	4.22	3.07	4.12	2.80	4.10	2.96
3	3.91	2.06	3.92	2.56	3.94	2.97	3.90	3.19
5	3.25	1.82	3.62	2.10	3.16	1.83	3.17	2.16
7	2.92	1.71	2.89	1.95	3.05	2.17	2.89	2.14
9	3.52	2.57	2.93	1.64	2.80	1.82	3.07	1.83
11	3.21	2.51	3.56	2.99	3.16	2.32	3.44	2.60

ตารางที่ 30 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้ง การทดลองครั้งที่ 2

อาทิตย์ที่	แบคทีเรียทั้งหมด (Log CFU/ml)				*Vibrio* spp.(Log CFU/ml)			
	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ ก.	ควบคุม	กรดเบนโซอิก 3 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 10 มก./ ก.	กรดเบนโซอิก 20 มก./ ก.
1	3.36	2.49	3.65	2.44	2.96	2.07	3.03	2.07
4	4.05	2.58	3.63	2.27	3.40	2.27	3.45	2.30
7	3.81	2.82	3.63	2.60	3.89	2.90	3.78	3.00
10	3.70	2.70	3.60	2.32	3.80	2.64	4.26	3.12

ตารางที่ 31 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้ง การทดลองครั้งที่ 3

อาทิตย์ที่	แบคทีเรียทั้งหมด (Log CFU/ml)				*Vibrio* spp.(Log CFU/ml)			
	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก	ควบคุม	โพรไบโอติก	กรดเบนโซอิก	โพรไบโอติก และ กรดเบนโซอิก
0	4.03	2.87	4.16	2.95	3.93	2.99	3.75	2.67
3	3.76	3.03	3.87	3.14	3.21	2.70	3.45	3.11
6	3.40	2.86	4.04	2.38	3.26	2.39	3.96	2.79
9	4.00	3.00	4.42	3.19	4.11	3.16	4.44	3.23

ตารางที่ 32 คุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

กลุ่มควบคุม

อาทิตย์ที่	กลุ่มควบคุม						
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	27.70-28.40	7.90-7.98	20.20-22.10	6.54-6.86	0.03-0.08	0.10-1.00	0.10-0.50
3	28.30-29.20	7.93-7.97	19.10-20.30	7.00-7.60	0.00-0.03	≥2.00	0.00-0.09
5	29.70-31.20	7.88-7.92	20.20-21.40	7.00-7.50	0.00-0.03	0.50-1.00	0.10-0.30
7	28.50-29.40	7.80-7.84	20.70-22.50	7.30-7.80	0.00-0.02	0.50-1.00	0.00-0.05
9	29.70-30.30	7.74-7.85	22.10-24.40	7.20-7.80	0.00	1.00-2.00	0.00-0.05
11	26.10-26.50	7.70-7.78	22.50-25.40	7.20-7.70	0.00	≥2.00	0.00-0.05

กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 3 มิลลิกรัมต่อกรัม

อาทิตย์ที่	กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 3 มิลลิกรัมต่อกรัม						
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	27.30-27.70	7.94-7.97	20.00-22.30	6.70-6.84	0.00-0.10	0.25-1.00	0.10-0.50
3	28.50-28.80	7.90-7.96	19.20-19.90	7.00-7.50	0.00-0.03	1.00-2.00	0.00-0.30
5	29.50-29.80	7.83-7.91	19.70-20.90	7.10-7.60	0.00-0.03	0.50-1.00	0.10-0.30
7	28.60-29.00	7.78-7.82	19.90-21.80	7.20-7.50	0.00-0.02	0.10-1.00	0.00-0.05
9	29.40-29.70	7.73-7.78	21.10-23.40	7.30-7.90	0.00	1.00-2.00	0.00-0.05
11	25.20-26.30	7.70-7.79	20.70-24.20	6.80-7.70	0.00	≥2.00	0.00-0.05

กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม

อาทิตย์ที่	กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม						
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	27.00-27.80	7.91-7.95	20.70-22.30	6.44-6.65	0.00-0.08	0.25-1.00	0.10-0.50
3	28.20-28.90	7.91-7.98	19.50-19.80	7.00-7.60	0.00-0.03	1.00-2.00	0.00-0.30
5	29.00-29.80	7.88-7.94	20.30-21.00	7.10-7.50	0.00-0.03	0.50-1.00	0.10-0.30
7	28.50-28.90	7.80-7.84	20.80-22.10	7.30-7.60	0.00-0.02	0.10-0.20	0.00-0.05
9	29.20-29.80	7.74-7.85	22.20-24.20	7.20-7.60	0.00	1.00-2.00	0.00-0.05
11	25.20-26.60	7.71-7.79	22.60-25.60	7.20-7.90	0.00	0.10-2.00	0.00-0.05

กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 20 มิลลิกรัมต่อกรัม

อาทิตย์ที่	กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 20 มิลลิกรัมต่อกรัม						
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	26.40-26.80	7.94-7.98	20.60-22.10	6.30-6.46	0.00-0.08	0.25-1.00	0.10-0.50
3	28.10-28.40	7.90-7.95	19.20-20.00	7.00-7.40	0.00-0.03	1.00-2.00	0.00-0.30
5	29.30-29.50	7.86-7.92	19.70-20.80	7.00-7.50	0.00-0.03	0.50-1.00	0.10-0.30
7	28.40-28.80	7.77-7.82	20.00-21.70	7.30-7.60	0.00-0.02	0.10-0.20	0.00-0.05
9	29.00-29.40	7.70-7.80	21.00-23.20	7.00-7.70	0.00	1.00-2.00	0.00-0.05
11	25.40-26.30	7.70-7.75	21.00-24.00	7.30-7.90	0.00	0.10-1.00	0.00-0.05

ตารางที่ 33 คุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

กลุ่มควบคุม

อาทิตย์ที่	กลุ่มควบคุม					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	28.90-29.00	7.87-7.95	17.90-20.6	0.00	1.00-2.00	0.00
4	27.80-28.00	7.96-8.08	19.20-21.80	0.00	1.00-2.00	0.00
7	24.80	7.91-8.02	20.10-22.70	0.00	1.00-2.00	0.00
10	27.40	7.82-7.95	20.90-23.70	0.00	1.00-2.00	0.00-0.10

กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 3 มิลลิกรัมต่อกรัม

อาทิตย์ที่	กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 3 มิลลิกรัมต่อกรัม					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	28.50-29.00	7.97-8.10	16.60-21.70	0.00	1.00-2.00	0.00
4	28.00-28.20	8.02-8.06	17.30-22.90	0.00	1.00-2.00	0.00
7	24.90-25.00	7.96-8.00	17.70-24.10	0.00	1.00-2.00	0.00
10	27.60	7.85-7.96	18.60-25.60	0.00	1.00-2.00	0.00-0.05

กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม

อาทิตย์ที่	กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 10 มิลลิกรัมต่อกรัม					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	28.00-28.40	7.97-8.02	20.30-21.70	0.00	1.00-2.00	0.00
4	27.70-28.00	7.95-8.05	20.70-22.20	0.00	1.00-2.00	0.00
7	24.50-24.80	7.96-7.98	21.60-22.90	0.00	1.00-2.00	0.00
10	27.30-27.50	7.91-7.93	22.70-23.60	0.00	1.00-2.00	0.00-0.05

กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 20 มิลลิกรัมต่อกรัม

อาทิตย์ที่	กลุ่มอาหารผสมกรดเบนโซอิก 20 มิลลิกรัมต่อกรัม					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
1	28.00-28.10	7.94-8.03	21.70-22.60	0.00	1.00-2.00	0.00
4	27.60-28.00	8.02-8.08	22.00-23.40	0.00	1.00-2.00	0.00
7	24.40-24.80	7.96-8.03	22.30-24.40	0.00	1.00-2.00	0.00
10	27.20-27.50	7.91-7.95	23.10-25.80	0.00	1.00-2.00	0.00-0.10

ตารางที่ 34 คุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3

กลุ่มควบคุม

อาทิตย์ที่	กลุ่มควบคุม					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
0	29.10-29.20	7.92-7.98	17.60-19.10	0.00	0.50-1.00	0.00
3	28.40-28.60	7.87-7.92	17.40-19.20	0.00-0.05	0.10-0.25	0.00
6	28.40-28.70	7.86-7.90	17.90-19.90	0.00	0.10-0.25	0.00
9	28.20-28.40	7.67-7.71	17.70-20.10	0.00	0.00	0.10-0.50

กลุ่มโพรไบโอติก

อาทิตย์ที่	กลุ่มโพรไบโอติก					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
0	29.20-29.60	7.95-7.99	18.10-19.60	0.00	0.50-1.00	0.00
3	28.40-28.80	7.88-7.93	19.30-20.10	0.00-0.05	0.10-0.25	0.00
6	28.40-28.70	7.83-7.88	20.00-21.00	0.00	0.25	0.00
9	28.30-28.60	7.70-7.75	20.60-21.90	0.00	0.00	0.10-0.25

กลุ่มกรดเบนโซอิก

อาทิตย์ที่	กลุ่มกรดเบนโซอิก					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
0	29.60-29.70	7.967.98	18.20-19.50	0.00	0.10-1.00	0.00
3	28.80-28.90	7.83-7.86	19.40-20.30	0.00-0.05	0.10-0.25	0.00
6	28.80-28.90	7.75-7.81	20.30-21.60	0.00	0.25	0.00
9	28.70-28.80	7.70-7.74	21.10-22.90	0.00	0.00	0.10

กลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก

อาทิตย์ที่	กลุ่มโพรไบโอติกและกรดเบนโซอิก					
	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเป็นกรดด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)	แอมโมเนีย (mg/l)	ฟอสเฟต (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
0	29.5	7.84-7.91	17.10-18.90	0.00	0.10-0.25	0.00
3	28.60-28.70	7.72-7.80	17.20-19.20	0.00-0.05	0.10-0.25	0.00
6	28.50-28.80	7.68-7.75	18.10-19.90	0.00	0.10-0.25	0.00
9	28.00-28.60	7.69-7.74	18.70-21.00	0.00	0.00	0.10-0.25

ภาคผนวก ซ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

ตารางที่ 35 ผลน้ำหนักกุ้ง

อาทิตย์ที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.753E-04	3	1.918E-04	1.007	.407
Within Groups	4.571E-03	24	1.904E-04		
Total	5.146E-03	27			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.116814	7	1
A			
A	0.113086	7	4
A			
A	0.107071	7	3
A			
A	0.105586	7	2

อาทิตย์ที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.385E-03	3	7.949E-04	1.100	.368
Within Groups	1.734E-02	24	7.223E-04		
Total	1.972E-02	27			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.19130	7	1
A			
A	0.18684	7	2
A			
A	0.17979	7	4
A			
A	0.16691	7	3

อาทิตย์ที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.252E-03	3	2.417E-03	.799	.506
Within Groups	7.257E-02	24	3.024E-03		
Total	7.983E-02	27			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.29120	7	1
A			
A	0.28336	7	2
A			
A	0.27053	7	4
A			
A	0.24866	7	3

อาทิตย์ที่ 8

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.079E-02	3	3.595E-03	.543	.658
Within Groups	.159	24	6.622E-03		
Total	.170	27			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.38684	7	2
A			
A	0.35221	7	1
A			
A	0.34279	7	4
A			
A	0.33571	7	3

อาทิตย์ที่ 10

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.114E-02	3	1.038E-02	.874	.469
Within Groups	.273	23	1.188E-02		
Total	.304	26			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.43200	7	2
A			
A	0.41129	7	3
A			
A	0.37797	7	1
A			
A	0.34042	6	4

อาทิตย์ที่ 12

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.863E-02	3	1.621E-02	.835	.489
Within Groups	.427	22	1.941E-02		
Total	.476	25			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.50430	6	2
A			
A	0.48334	7	3
A			
A	0.45679	7	1
A			
A	0.38582	6	4

ตารางที่ 36 การรอดชีวิตของกุ้ง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.143	3	1.381	.739	.539
Within Groups	44.857	24	1.869		
Total	49.000	27			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	2.8571	7	4
A			
A	2.7143	7	1
A			
A	2.5714	7	2
A			
A	1.8571	7	3

ตารางที่ 37 การตายสะสมของกุ้งหลังทดสอบชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

ชั่วโมงที่ 18

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.500	3	1.833	.458	.726
Within Groups	16.000	4	4.000		
Total	21.500	7			

ชั่วโมงที่ 24

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.000	3	.667	.190	.898
Within Groups	14.000	4	3.500		
Total	16.000	7			

ชั่วโมงที่ 30

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.375	3	.792	.487	.709
Within Groups	6.500	4	1.625		
Total	8.875	7			

ชั่วโมงที่ 36

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.375	3	.125	1.000	.479
Within Groups	.500	4	.125		
Total	.875	7			

โดยรวม

Treatment	y = a + bx	R^2
control	Mort = 0.25 + 1.35time	0.70
Benzoic acid 3 mg/g	Mort = 1.50 + 1.20time	0.48
Benzoic acid 10 mg/g	Mort = 2.00+ 1.00time	0.35
Benzoic acid 20 mg/g	Mort = 2.50 + 0.95time	0.70

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

ตารางที่ 38 ผลน้ำหนักกุ้ง

อาทิตย์ที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.114E-03	3	2.705E-03	.745	.555
Within Groups	2.903E-02	8	3.628E-03		
Total	3.714E-02	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	0.62600	3	4
A			
A	0.57900	3	3
A			
A	0.57333	3	2
A			
A	0.55567	3	1

อาทิตย์ที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.124	3	4.131E-02	2.115	.177
Within Groups	.156	8	1.954E-02		
Total	.280	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	1.1107	3	4
A			
A	0.9317	3	2
A			
A	0.8643	3	3
A			
A	0.8600	3	1

อาทิตย์ที่ 9

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.333	3	.111	1.066	.416
Within Groups	.833	8	.104		
Total	1.166	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	1.8128	3	2
A			
A	1.5762	3	4
A			
A	1.4613	3	1
A			
A	1.3670	3	3

ตารางที่ 39 การรอดชีวิตของกุ้ง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68.667	3	22.889	.606	.629
Within Groups	302.000	8	37.750		
Total	370.667	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	13.000	3	3
A			
A	10.667	3	4
A			
A	8.333	3	1
A			
A	6.667	3	2

ตารางที่ 40 การตายสะสมของกุ้งหลังทดสอบชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

วันที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.333	2	.167	.500	.650
Within Groups	1.000	3	.333		
Total	1.333	5			

วันที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.333	2	1.167	.700	.563
Within Groups	5.000	3	1.667		
Total	7.333	5			

วันที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.000	2	4.500	2.077	.272
Within Groups	6.500	3	2.167		
Total	15.500	5			

วันที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.000	2	6.500	3.900	.146
Within Groups	5.000	3	1.667		
Total	18.000	5			

วันที่ 5

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.333	2	5.167	5.167	.107
Within Groups	3.000	3	1.000		
Total	13.333	5			

วันที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.333	2	2.667	5.333	.103
Within Groups	1.500	3	.500		
Total	6.833	5			

โดยรวม

Treatment	y = a + bx	R^2
control	Mort = 0.20 + 0.51time	0.77
Benzoic acid 10 mg/g	Mort = 0.87+ 0.94time	0.68
Benzoic acid 20 mg/g	Mort = -0.10 + 1.03time	0.65

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3

ตารางที่ 41 ผลน้ำหนักกุ้ง

วันที่ 15

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.624	3	.208	2.935	.099
Within Groups	.567	8	7.090E-02		
Total	1.191	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	trt
	A	11.4350	3	2
	A			
B	A	11.1782	3	1
B	A			
B	A	11.0287	3	4
B				
B		10.8080	3	3

วันที่ 30

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.925	3	.308	1.444	.300
Within Groups	1.708	8	.213		
Total	2.632	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	12.6118	3	2
A			
A	12.3427	3	1
A			
A	11.9908	3	4
A			
A	11.9247	3	3

วันที่ 45

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.133	3	1.711	7.388	.011
Within Groups	1.853	8	.232		
Total	6.986	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	14.3658	3	2
A			
A	13.9892	3	1
B	12.9147	3	4
B			
B	12.8796	3	3

วันที่ 60

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.215	3	2.072	3.680	.062
Within Groups	4.504	8	.563		
Total	10.719	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	trt
	A	16.3093	3	2
	A			
B	A	15.7183	3	1
B				
B		14.8103	3	4
B				
B		14.4804	3	3

วันที่ 75

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.594	3	3.198	3.304	.078
Within Groups	7.744	8	.968		
Total	17.338	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	trt
	A	17.5700	3	2
	A			
B	A	16.9717	3	1
B	A			
B	A	15.8433	3	4
B				
B		15.3070	3	3

ตารางที่ 42 การรอดชีวิตของกุ้ง

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.250	3	8.333E-02	1.000	.441
Within Groups	.667	8	8.333E-02		
Total	.917	11			

ตารางที่ 43 การตายสะสมของกุ้งหลังทดสอบชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

วันที่ 1

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.667	3	.222	.889	.487
Within Groups	2.000	8	.250		
Total	2.667	11			

วันที่ 2

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.667	3	6.889	1.837	.219
Within Groups	30.000	8	3.750		
Total	50.667	11			

วันที่ 3

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.667	3	6.889	1.560	.273
Within Groups	35.333	8	4.417		
Total	56.000	11			

วันที่ 4

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.000	3	7.667	1.508	.285
Within Groups	40.667	8	5.083		
Total	63.667	11			

วันที่ 5

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.000	3	9.000	1.895	.209
Within Groups	38.000	8	4.750		
Total	65.000	11			

วันที่ 6

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.583	3	5.194	1.417	.308
Within Groups	29.333	8	3.667		
Total	44.917	11			

วันที่ 7

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.583	3	7.861	4.717	.035
Within Groups	13.333	8	1.667		
Total	36.917	11			

โดยรวม

Treatment	y = a + bx	R^2
control	Mort = 0.43 + 0.60time	0.48
BS11	Mort = 0.76 + 0.62time	0.32
Benzoic acid	Mort = 2.14+ 0.92time	0.40
BS11 and Benzoic acid	Mort = 2.14 + 0.44time	0.33

ตารางที่ 44 ปริมาณเม็ดเลือดก่อนการชักนำให้เกิดโรค

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.700	3	.567	11.547	.003
Within Groups	.393	8	4.907E-02		
Total	2.092	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	1.8100	3	2
B	1.0083	3	4
B			
B	1.0050	3	3
B			
B	0.8480	3	1

ตารางที่ 45 ปริมาณเม็ดเลือดหลังการชักนำให้เกิดโรค

กลุ่มควบคุมการชักนำให้เกิดโรค

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.440	3	.147	2.815	.107
Within Groups	.417	8	5.208E-02		
Total	.857	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	trt
	A	1.0153	3	2
	A			
B	A	0.6113	3	1
B	A			
B	A	0.5737	3	3
B				
B		0.5447	3	4

กลุ่มที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.199	3	6.638E-02	8.248	.008
Within Groups	6.438E-02	8	8.048E-03		
Total	.264	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping		Mean	N	trt
A		0.44433	3	2
	B	0.26800	3	4
	B			
C	B	0.21400	3	1
C				
C		0.08560	3	3

ตารางที่ 46 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ในพลาสม่ากุ้ง ก่อนการชักนำให้เกิดโรค

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	271.402	3	90.467	.256	.855
Within Groups	2824.132	8	353.016		
Total	3095.534	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	85.67	3	1
A			
A	85.09	3	3
A			
A	80.90	3	4
A			
A	73.76	3	2

ตารางที่ 47 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ในพลาสม่ากุ้ง หลังการชักนำให้เกิดโรค

กลุ่มควบคุมการชักนำให้เกิดโรค

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.216	3	2.405	.541	.668
Within Groups	35.566	8	4.446		
Total	42.782	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	98.118	3	3
A			
A	96.971	3	2
A			
A	96.383	3	4
A			
A	96.097	3	1

กลุ่มที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	228.523	3	76.174	12.993	.002
Within Groups	46.903	8	5.863		
Total	275.426	11			

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trt
A	99.653	3	2
A			
A	98.322	3	1
A			
A	95.701	3	3
B	88.365	3	4

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายพิทยาธร ตัณฑวณิช เกิดเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม 2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547