



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาประสิทธิภาพของฟิวคอยด์แดนสารสกัดจาก  
สาหร่ายทะเลในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสดวงขาวในกิ้งกูดดำ

โดย ดร.นิตี ชูเชิด และ ผศ.ดร.ชลอ ลิ้มสุวรรณ

เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ      การศึกษาประสิทธิภาพของฟิวคอยด์แคนสารสกัดจาก  
สาหร่ายทะเลในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสดวงขาวในกิ้งกูดดำ

| คณะผู้วิจัย             |          | สังกัด                 |
|-------------------------|----------|------------------------|
| 1. ดร.นิตติ ชูเชิด      | คณะประมง | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 2. ผศ.ดร.ชลอ ลิ้มสุวรรณ | คณะประมง | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ชลอ ลัมสุวรรณนักวิจัยที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษาและแนะนำ ทำให้โครงการวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์ จีรภัทร์ และ Professor Takashi Yamada จาก มหาวิทยาลัย Hiroshima ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำแนะนำและความร่วมมือในการสกัดสารฟีนอลอยด์แดนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยภายใต้โครงการพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ทำให้ข้าพเจ้ามีความมั่นใจในการริเริ่มทำงานวิจัยและได้เรียนรู้ทักษะการทำงานวิจัยภายใต้ความดูแลของนักวิจัยที่ปรึกษา เพื่อพัฒนาตัวเองให้เป็นนักวิจัยอาชีพที่ดีในอนาคต ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรหรือนักวิจัยท่านอื่นๆเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG 4680004

ชื่อโครงการ การศึกษาประสิทธิภาพของฟิวคอยด์แดนซารสกัดจากสาหร่ายทะเลในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสดวงขาวในกิ้งก่าดำ

นาย นิติ ชูเชิด

E-mail Address : [ffisntc@ku.ac.th](mailto:ffisntc@ku.ac.th)

ระยะเวลาโครงการ 1 ปี

ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคดวงขาว เป็นไวรัสที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายเป็นจำนวนมากของกิ้งก่าในบ่อเลี้ยง การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารฟิวคอยด์แดนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการลดอัตราการตายของกิ้งก่าที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวได้ สารฟิวคอยด์แดนเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm สามารถลดอัตราการติดเชื้อไวรัสดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัสผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ้งก่าโดยเห็นได้จากอัตราการรอดของกิ้งก่าในกลุ่มที่ให้อาหารผสมสารฟิวคอยด์แดน เป็นระยะเวลา 15 วัน มีอัตราการรอดสูงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เท่ากับ 43.33%, 53.33% และ 53.33% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้อาหารผสมสารฟิวคอยด์แดนซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 23.33 การให้อาหารผสมสารฟิวคอยด์แดนเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 10 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวทำให้กิ้งก่ามีอัตราการรอดสูงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เท่ากับ 43.33% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้อาหารผสมสารฟิวคอยด์แดนซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 13.33% การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกิ้งก่าที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวพบว่าเนื้อเยื่อของกิ้งก่าที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งยังคงแสดงลักษณะทางกายภาพภายนอกเหมือนกับกิ้งก่าปกติ วิธีการวินิจฉัยโรคดวงขาวโดยการศึกษการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อนั้นต้องการความรวดเร็วเพื่อที่จะได้ทำการกำจัดกิ้งก่าที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวออกจากบ่อแล้วพยายามเลี้ยงกิ้งก่าที่เหลือต่อไปโดยให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนเพื่อลดอัตราการตายหรือรีบทำการจับกิ้งก่าโดยเร็วเพื่อลดการสูญเสียอันเกิดจากโรคนี้

คำหลัก : กิ้งก่าดำ, ไวรัสดวงขาว, สารฟิวคอยด์แดน

## **Abstract**

Project Code : MRG 4680004

Project Title : Efficacy of fucoidan extracted from sea algae for the control of white spot Syndrome virus infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Investigator : Niti Chuchird

E-mail Address : [ffisntc@ku.ac.th](mailto:ffisntc@ku.ac.th)

Project Period : 1 year

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is an invertebrate virus, causing considerable mortality in Shrimp. Avoidance of infection and contamination is the main method of disease control. In this experiment we found that fucoidan was an effective by reducing mortality rate of shrimps infected with white spot virus. Feeding shrimps with diets contained fucoidan at 50, 100 and 150 ppm for 15 days can reduced the transmission of the virus via contaminated water as the survival rate of shrimps was significantly increased ( $P < 0.05$ ) by 43.33%, 53.33% and 53.33% compare with control group which was reduced by 23.33%. Oral administration of fucoidan at level 100 ppm for 10 days was significantly improved ( $P < 0.05$ ) the survival rate of White spot virus infected shrimps by 43.33 % compare with control group which was reduced by 13.33%. The pathognomonic WSSV infection changes were first detected at 24 h pi (post infection) in still clinically normal shrimp. The rapidity of development of the severe systemic pathological changes mortalities in WSSV infection necessitate the earliest possible diagnosis so that management strategy of removing the first groups of moribund shrimp from the pond and attempting to continue culture by feeding shrimp with diet contained fucoidan for reducing the mortality rate, or complete emergency harvest can be carried out.

**Keywords** : Black Tiger Shrimp, White Spot Syndrome Virus, Fucoidan

## บทนำ

โรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส White Spot Syndrome virus (WSSV) สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในภูมิภาคเอเชียอย่างมาก (Chang *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1995; Inouye *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1996; Tapay *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นโรคที่สามารถติดต่อกันได้ง่ายโดยผ่านทางน้ำหรือพาหะ รวมทั้งสามารถติดมากับลูกกุ้งได้อีกด้วย (Limsuwan, 1997) กุ้งป่วยส่วนใหญ่จะเห็นลักษณะดวงขาวที่บริเวณเนื้อเยื่อผิวชั้นนอกใต้เปลือก (ชโล, 2543; Wongteerasupaya *et al.*, 1995) ดวงขาวที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากความผิดปกติของการสะสมเกลือแคลเซียมในเนื้อเยื่อผิวชั้นนอกใต้เปลือกกุ้ง (Lightner, 1996) เนื่องจากโรค ดังกล่าวไม่สามารถทำการรักษาได้ ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสติดเข้ามาในบ่อเลี้ยงกุ้ง การป้องกันโรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและได้ผลดีพอสมควรคือ วิธีการป้องกันการติดเชื้อจากทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง และจากพาหะนำโรคซึ่งติดเข้ามาอยู่กับน้ำที่ใช้ โดยทั่วไปเกษตรกรสามารถจะกำจัดพาหะในน้ำที่จะใช้เลี้ยงกุ้งโดยการใช้ระบบกรองน้ำหรือใช้สารเคมี จากนั้นพักน้ำก่อนที่จะปล่อยลูกกุ้งอีกอย่างน้อย 5-7 วันเพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อไวรัสถูกกำจัดออกและสารเคมีสลายตัวหมด แต่อย่างไรก็ตามในบางพื้นที่ซึ่งใช้วิธีการดังกล่าวข้างต้นแล้วก็ยังคงประสบปัญหาโรคดวงขาวเกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงอีก โดยพบว่าเชื้อไวรัสติดมากับลูกกุ้งที่ใช้เลี้ยงนั่นเอง ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจสอบลูกกุ้งก่อนที่จะนำมาปล่อยลงเลี้ยง ว่ามีเชื้อไวรัสดวงขาวหรือไม่ โดยวิธีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วและแม่นยำ (Nunan *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1996) ถึงแม้วิธีดังกล่าวสามารถที่จะทำได้แต่ในทางปฏิบัติแล้วเกษตรกรจะส่งตัวอย่างลูกกุ้งมาตรวจสอบเฉพาะที่อยู่ใกล้ห้องปฏิบัติการที่สามารถดำเนินการตรวจสอบลูกกุ้งโดยวิธี PCR ซึ่งมีจำกัดและเสียค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนั้นถึงแม้ว่าลูกกุ้งที่นำส่งตรวจไม่พบไวรัสก็ตาม ก็ยังไม่สามารถรับรองได้ว่าลูกกุ้งทั้งหมดที่จะนำมาปล่อยลงเลี้ยงนั้นไม่มีลูกกุ้งติดเชื้อเลย ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาตรวจด้วยวิธี PCR ไม่ได้เป็นตัวแทนที่ดีของลูกกุ้งทั้งหมด จึงยังคงพบว่าเกษตรกรหลายรายที่ประสบปัญหาโรคดวงขาวขึ้นในระหว่างการเลี้ยงทั้ง ๆ ที่ลูกกุ้งผ่านการตรวจสอบแล้ว และไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเลยหลังจากที่ได้กำจัดพาหะในครั้งแรกแล้ว เหตุการณ์ดังกล่าวนี้พบได้บ่อยมากในช่วงการปล่อยลูกกุ้งระหว่างเดือนกันยายนจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ในขณะที่สภาพภูมิอากาศมีการเปลี่ยนแปลงสูงมาก เช่น ฝนตกหนักในภาคใต้ และอุณหภูมิต่ำในภาคกลางและภาคตะวันออก

ในปัจจุบันการป้องกันการเกิดโรคดวงขาวที่น่าจะได้ผลดีอีกทางหนึ่งก็คือ การเปลี่ยนวิธีการเลี้ยง การจัดการจากระบบเปิดที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำมาสู่ระบบปิด หรือกึ่งปิดกึ่งเปิด แล้วใช้สารเคมีฆ่าเชื้อและพาหะต่าง ๆ ในช่วงก่อนที่จะปล่อยกุ้ง แต่วิธีการดังกล่าวนี้ก็ให้ผลไม่แน่นอน และการเลี้ยงในระบบปิดถ่ายน้ำน้อยก็ยังมีผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตของกุ้งในบ่อเลี้ยงทำให้เกิด

ปัญหาทุ้งโตช้า เนื่องจากระบบปิดถ่ายน้ำน้อยมีผลทำให้เกิดการสะสมของเสียในบ่อเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจนทำให้เกิดผลกระทบต่อขบวนการเมตาบอลิซึมของกุ้ง สำหรับการฟิวคอยด์แดนเป็นสารที่สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาลที่น่าสนใจเพราะสารชนิดนี้มีคุณสมบัติช่วยในการยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม โดยมีผลในการยับยั้งไม่ให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน (Gerber *et al.*, 1958; Baha *et al.*, 1988; Sugawara *et al.*, 1989) สำหรับการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของสารฟิวคอยด์แดนซึ่งสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* sp. ที่พบบริเวณทะเลในเขตจังหวัดระนองแล้วนำมาสกัดตามวิธีของ Chevolot *et al.* (2001) โดยผลการวิจัยครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้สำหรับการแนะนำเผยแพร่แก่เกษตรกรเพื่อลดปัญหาความรุนแรงของโรคดวงขาวในระหว่างการเลี้ยงให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงได้

## วิธีการทดลอง

### ขั้นตอนและวิธีการเก็บข้อมูล

การหาปริมาณเชื้อไวรัสที่เหมาะสมที่ฉีดเข้าไปในตัวกุ้งแล้วทำให้กุ้งป่วย ใช้กุ้งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพในห้องปฏิบัติการ ที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 7 วัน ใช้เชื้อไวรัสดวงขาวที่เก็บรวบรวมมาจากกุ้งกุลาดำที่ป่วยจากบ่อเลี้ยง แล้วนำมาเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ ทำการทดสอบหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ฉีดเข้าไปแล้วทำให้กุ้งป่วย (ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยวิธี PCR)

### 1. การศึกษาระดับของฟิวคอยด์แดนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคไวรัสดวงขาวจากการแพร่เชื้อ ไวรัสผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

ใช้กุ้งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพในห้องปฏิบัติการ ที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อไวรัสดวงขาวมาฉีดเข้าไปในกุ้งกุลาดำจำนวน 30 ตัว จนกุ้งแสดงอาการป่วยมาแล้วนำไปใส่แซ่ในตู้ทดลองเลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ใช้ทดลองต่อไป ทำการทดลองโดยใช้กุ้งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จำนวน 150 ตัว มาแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 30 ตัว นำไปเลี้ยงในตู้ทดลองดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm แก่กุ้งทดลองจำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะใส่กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาข่ายกันแยกส่วนกุ้งทดลองกับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm แก่กุ้งทดลองจำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะใส่กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตา

ข่าวกั้นแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm แก่กึ่งทดลอง จำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาข่าวกั้นแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดาแก่กึ่งทดลองจำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาข่าวกั้นแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดาแก่กึ่งทดลอง จำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน และไม่ใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวลงไปในตัว แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ กึ่งที่ตายจากการทดลองจะถูกนำออกจากตู้ทดลองทันทีแล้วจะถูกสุมนำไปเพื่อการติดเชื้อไวรัส ดวงขาวโดยวิธี PCR

## 2. การศึกษาระดับของฟิวคอยด์แดนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคดวงขาวจากการให้กึ่งปกติกินกึ่งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

ใช้กึ่งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพในห้องปฏิบัติการ ที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อไวรัสดวงขาวมาฉีดเข้าไปในกึ่งกุลาดำ จำนวน 30 ตัว จนกึ่งแสดงอาการป่วยมาแล้วนำไปสับเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ทำการทดลองโดยใช้กึ่งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จำนวน 150 ตัว มาแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 30 ตัว นำไปเลี้ยงในตู้ทดลอง ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm แก่กึ่งทดลอง จำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะนำกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm แก่กึ่งทดลอง จำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะนำกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm แก่กึ่งทดลอง จำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะนำกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดาแก่กึ่งทดลองจำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะนำกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดาแก่กึ่งทดลอง จำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน และไม่ใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวลงไปในตัว จากนั้นบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ กึ่งที่ตายจากการทดลองจะถูกนำออกจากตู้ทดลองทันทีแล้วจะถูกส่งนำไปเช็คการติดเชื้อไวรัส ดวงขาวโดยวิธี PCR

### 3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์เดนในการป้องกันโรคดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัส ผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่ง

ใช้กึ่งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพในห้องปฏิบัติการ ที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อไวรัสดวงขาวมาฉีดเข้าไปในกึ่งกุลาดำจำนวน 30 ตัว จนกึ่งแสดงอาการป่วยมาแล้วนำไปใส่แซ่ในตัวทดลองเลี้ยงร่วมกับกึ่งที่ใช้ทดลองต่อไป ทำการทดลองโดยใช้กึ่งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จำนวน 174 ตัว มาแบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 36 ตัว 4 กลุ่ม และ 30 ตัว 1 กลุ่ม นำไปเลี้ยงในตัวทดลองดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์เดนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 แก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาข่ายกันแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์เดนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 แก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 10 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาข่ายกันแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์เดนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 แก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาข่ายกันแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดาแก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ลงไปในตัว โดยใช้ตาชั่งกันแยกส่วนกึ่งทดลองกับกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสออกจากกัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดา แก่กึ่งทดลองจำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 15 วัน และไม่ใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวลงไปในตัว จากนั้นบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ กึ่งที่ตายจากการทดลองจะถูกนำออกจากตู้ทดลองทันทีแล้วจะถูกส่งนำไปใช้การติดเชื้อไวรัส ดวงขาวโดยวิธี PCR

#### 4. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์เดนในการป้องกันโรคดวงขาวจากการให้กึ่งปกติกินกึ่งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

ใช้กึ่งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกึ่งมาปรับสภาพให้คุ้นเคยกับสภาพในห้องปฏิบัติการ ที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อไวรัสดวงขาวมาฉีดเข้าไปในกึ่งกุลาดำจำนวน 30 ตัว จนกึ่งแสดงอาการป่วยมาแล้วนำไปสับเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ทำการทดลองโดยใช้กึ่งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม จำนวน 174 ตัว มาแบ่งออกเป็นกลุ่มละ 36 ตัว 4 กลุ่ม และ 30 ตัว 1 กลุ่ม นำไปเลี้ยงในตู้ทดลองดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์เดนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 แก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์เดนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 แก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 10 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหารแล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์เดนที่ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 แก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมดาแก่กึ่งทดลองจำนวน 36 ตัว เป็นเวลา 5 วัน ก่อนที่จะใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวที่เตรียมไว้ไปให้กึ่งปกติกินเป็นอาหาร แล้วทำการเก็บตัวอย่าง

กึ่งครั้งละ 2 ตัว เพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง พร้อมกับบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารธรรมชาติธรรมดา แก่กึ่งทดลองจำนวน 30 ตัว เป็นเวลา 45 วัน และไม่ใส่กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวลงไปในตัว จากนั้นบันทึกอัตราการรอดตาย เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ กึ่งที่ตายจากการทดลองจะถูกนำออกจากตู้ทดลองทันทีแล้วจะถูกส่งนำไปใช้การติดเชื้อไวรัสดวงขาว โดยวิธี PCR

##### 5. การศึกษาเปรียบเทียบขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อดำเมื่อได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดงกับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารฟิวคอยด์แดง

นำตัวอย่างกล้ามเนื้อดำที่เก็บมาจากการทดลองที่ 3 และ 4 มาตรึงด้วยน้ำยา Davidson นานประมาณ 24-72 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปผ่านขบวนการทำเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป

#### ผลการทดลอง

##### การเตรียมเชื้อไวรัสดวงขาวสำหรับการทดลอง

นำเชื้อไวรัสดวงขาวบริสุทธิ์ จากสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง มาฉีดเข้ากล้ามเนื้อดำขนาด 5-7 กรัม ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เลี้ยงไว้ในกึ่งแสดงอาการป่วยแต่ยังไม่แล้วทำการเก็บตัวอย่างกึ่งที่ได้รับเชื้อ โดยเก็บเอาส่วนเหงือกและเนื้อเยื่อใต้แผ่นปิดเหงือก มาทำการปั่นรวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อไวรัส K199 จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนของสารละลายตอนบนไปใช้โดยนำไปกรองด้วย millipore ขนาด 0.45 ไมครอน จะได้เชื้อไวรัสดวงขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ K199 เพื่อทำเป็น Stock เก็บไว้ทดลองที่อุณหภูมิ -75 องศาเซลเซียส

นำเชื้อไวรัสดวงขาวที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -75 องศาเซลเซียส มาเตรียมให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนที่จะฉีดเข้าไปในกึ่งโดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

1.1 ทำ Ten fold dilution โดยนำเชื้อไวรัสมาทำเจือจางเป็นอัตราส่วน 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> และ 1:10<sup>5</sup> (ปรากฏแถบสุดท้ายที่ 1:10<sup>4</sup>)

1.2 ทำ Two fold dilution ระหว่าง 1:10<sup>4</sup> และ 1:10<sup>5</sup> ดังนี้ 1:10<sup>4</sup>, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:10<sup>5</sup> (ปรากฏแถบสุดท้ายที่ 1:2 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นำไปใช้ในการทดลองครั้งนี้)

1. การศึกษาระดับของฟิวคอยด์แดนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคไวรัสดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัสผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

ผลการศึกษาระดับของฟิวคอยด์แดนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งแสดงไว้ในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

| วันที่ทำการทดลอง | อัตราการรอดตาย (ตัว) |    |    |                 |    |    |                 |    |    |                |    |    |               |    |    |
|------------------|----------------------|----|----|-----------------|----|----|-----------------|----|----|----------------|----|----|---------------|----|----|
|                  | กลุ่มที่ 1           |    |    | กลุ่มที่ 2      |    |    | กลุ่มที่ 3      |    |    | กลุ่มที่ 4     |    |    | กลุ่มที่ 5    |    |    |
| 1                | 10                   | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 2                | 10                   | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10              | 10 | 9  | 10             | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 3                | 7                    | 8  | 6  | 8               | 9  | 9  | 9               | 8  | 8  | 6              | 7  | 7  | 10            | 10 | 10 |
| 4                | 6                    | 7  | 6  | 6               | 8  | 7  | 7               | 7  | 8  | 6              | 6  | 6  | 10            | 10 | 10 |
| 5                | 6                    | 6  | 5  | 5               | 7  | 6  | 7               | 7  | 7  | 5              | 5  | 4  | 10            | 10 | 10 |
| 6                | 6                    | 6  | 5  | 5               | 6  | 6  | 5               | 6  | 7  | 4              | 5  | 2  | 10            | 10 | 10 |
| 7                | 6                    | 4  | 4  | 4               | 6  | 6  | 5               | 5  | 6  | 2              | 3  | 2  | 10            | 10 | 10 |
| รวม              | 13 ตัว = 43.33%      |    |    | 16 ตัว = 53.33% |    |    | 16 ตัว = 53.33% |    |    | 7 ตัว = 23.33% |    |    | 30 ตัว = 100% |    |    |

หมายเหตุ กุ้งที่ตายจากการทดลองได้รับการสุ่มตรวจเชื้อไวรัสดวงขาวด้วยวิธี PCR

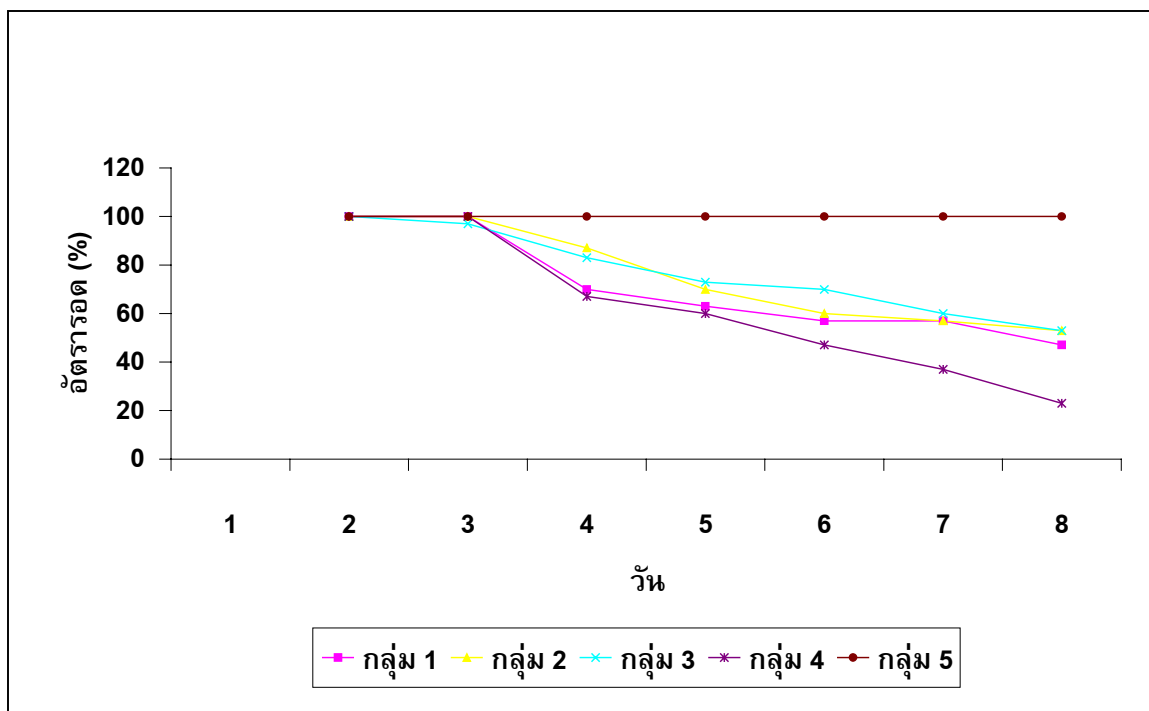
กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm 15 วัน แล้วแช่น้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm 15 วัน แล้วแช่น้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm 15 วัน แล้วแช่น้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน แล้วแช่น้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน



การศึกษาอัตราการรอดของกิ่งกุลาดำที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ่งพบว่า การใช้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm ทำให้กิ่งมีอัตราการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับฟิวคอยด์แดนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1 และ 2 โดยกิ่งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm และ 150 ppm เป็นเวลา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงมีอัตราการรอดเท่ากับ 53.33% ในขณะที่กิ่งในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm แล้วได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงมีอัตราการรอดเท่ากับ 43.33% แตกต่างกับกิ่งในกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารธรรมดา ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงและกิ่งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาว ซึ่งมีอัตราการรอดเท่ากับ 23.33% และ 100% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่ากิ่งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงมีอัตราการรอดสูงที่สุดนักวิจัยจึงใช้ความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองที่ 3 ต่อไป

## 2. การศึกษาระดับของฟิวคอยด์แดนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคดวงขาวจากการให้กิ่งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

ผลการศึกษาในระดับของฟิวคอยด์แดนที่เหมาะสมในการป้องกันโรคดวงขาวจากการให้กิ่งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว แสดงไว้ในตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

| วันที่ทำการทดลอง | อัตราการรอดตาย (ตัว) |    |    |                |    |    |                 |    |    |             |    |    |               |    |    |
|------------------|----------------------|----|----|----------------|----|----|-----------------|----|----|-------------|----|----|---------------|----|----|
|                  | กลุ่มที่ 1           |    |    | กลุ่มที่ 2     |    |    | กลุ่มที่ 3      |    |    | กลุ่มที่ 4  |    |    | กลุ่มที่ 5    |    |    |
| 1                | 10                   | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10          | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 2                | 10                   | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10          | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 3                | 10                   | 8  | 8  | 9              | 8  | 8  | 8               | 7  | 7  | 6           | 6  | 7  | 10            | 10 | 10 |
| 4                | 9                    | 6  | 6  | 7              | 7  | 6  | 8               | 6  | 7  | 5           | 4  | 5  | 10            | 10 | 10 |
| 5                | 6                    | 4  | 5  | 4              | 3  | 4  | 7               | 6  | 5  | 3           | 2  | 3  | 10            | 10 | 10 |
| 6                | 2                    | 3  | 4  | 3              | 3  | 3  | 6               | 5  | 5  | 2           | 2  | 3  | 10            | 10 | 10 |
| 7                | 0                    | 2  | 3  | 3              | 2  | 3  | 4               | 3  | 4  | 2           | 2  | 2  | 10            | 10 | 10 |
| รวม              | 5 ตัว = 16.66%       |    |    | 8 ตัว = 26.66% |    |    | 11 ตัว = 36.66% |    |    | 6 ตัว = 20% |    |    | 30 ตัว = 100% |    |    |

หมายเหตุ กุ้งที่ตายจากการทดลองได้รับการส่องตรวจเชื้อไวรัสดวงขาวด้วยวิธี PCR

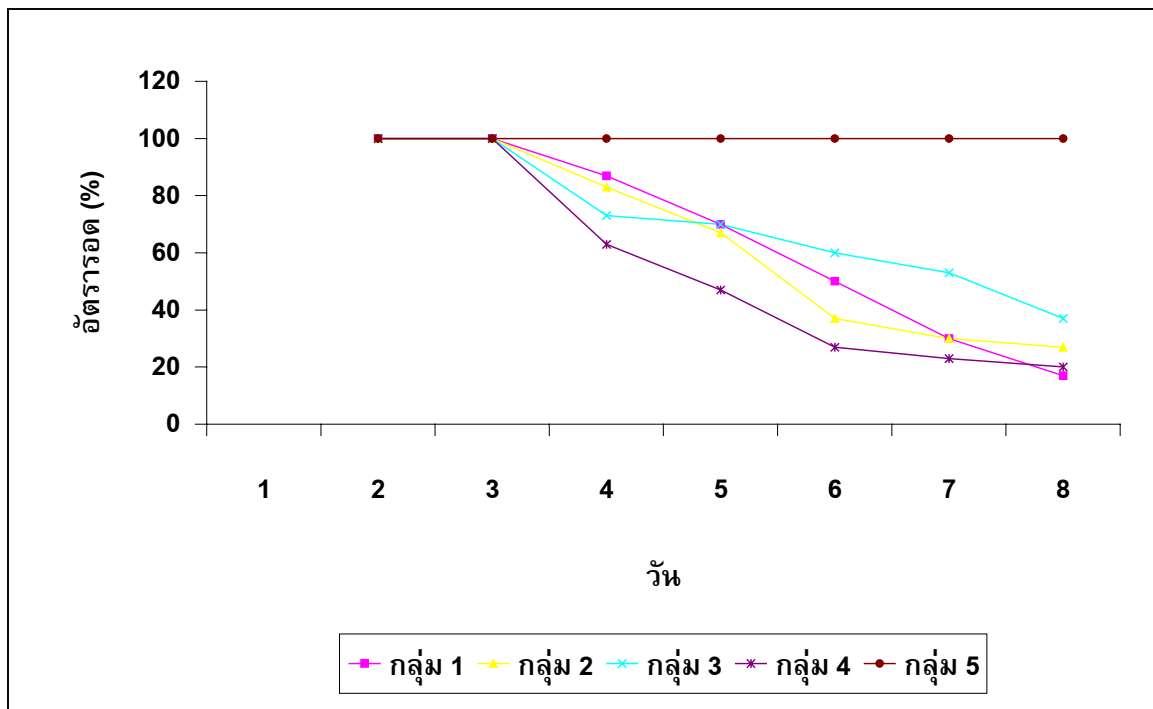
กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน



เมื่อทำการวิเคราะห์อัตราการรอดของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยวิธีการสุ่มตลอด แล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยวิธีของด้นแคน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 3 และ 4 โดยกุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm, 100 ppm และ 150 ppm เป็นเวลา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวมีอัตราการรอดเท่ากับ 16.66%, 26.66% และ 36.66% ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารธรรมดา ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวและกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาว ซึ่งมีอัตราการรอดเท่ากับ 20% และ 100% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่ากุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวมีอัตราการรอดสูงสุดนักวิจัยจึงใช้ความเข้มข้นนี้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองที่ 4 ต่อไป

### 3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์แดนในการป้องกันโรคดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัส ผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์แดนในการป้องกันโรคดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัส ผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง แสดงไว้ในตารางที่ 3 และภาพที่ 3

ตารางที่ 3 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100ppm เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

| วันที่ทำการทดลอง | อัตราการรอดตาย (ตัว) |    |    |                 |    |    |                 |    |    |                |    |    |               |    |    |
|------------------|----------------------|----|----|-----------------|----|----|-----------------|----|----|----------------|----|----|---------------|----|----|
|                  | กลุ่มที่ 1           |    |    | กลุ่มที่ 2      |    |    | กลุ่มที่ 3      |    |    | กลุ่มที่ 4     |    |    | กลุ่มที่ 5    |    |    |
| 1                | 10                   | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 2                | 10                   | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 3                | 10                   | 9  | 8  | 9               | 8  | 8  | 10              | 8  | 7  | 5              | 8  | 7  | 10            | 10 | 10 |
| 4                | 5                    | 5  | 4  | 5               | 6  | 7  | 4               | 5  | 5  | 4              | 2  | 2  | 10            | 10 | 10 |
| 5                | 4                    | 4  | 4  | 4               | 5  | 7  | 4               | 5  | 3  | 4              | 2  | 1  | 10            | 10 | 10 |
| 6                | 3                    | 4  | 4  | 4               | 4  | 5  | 4               | 4  | 3  | 3              | 2  | 0  | 10            | 10 | 10 |
| 7                | 3                    | 4  | 3  | 4               | 4  | 5  | 4               | 4  | 3  | 2              | 1  | 0  | 10            | 10 | 10 |
| รวม              | 10 ตัว = 33.33%      |    |    | 13 ตัว = 43.33% |    |    | 11 ตัว = 36.66% |    |    | 4 ตัว = 13.33% |    |    | 30 ตัว = 100% |    |    |

หมายเหตุ กุ้งที่ตายจากการทดลองได้รับการสุ่มตรวจเชื้อไวรัสดวงขาวด้วยวิธี PCR

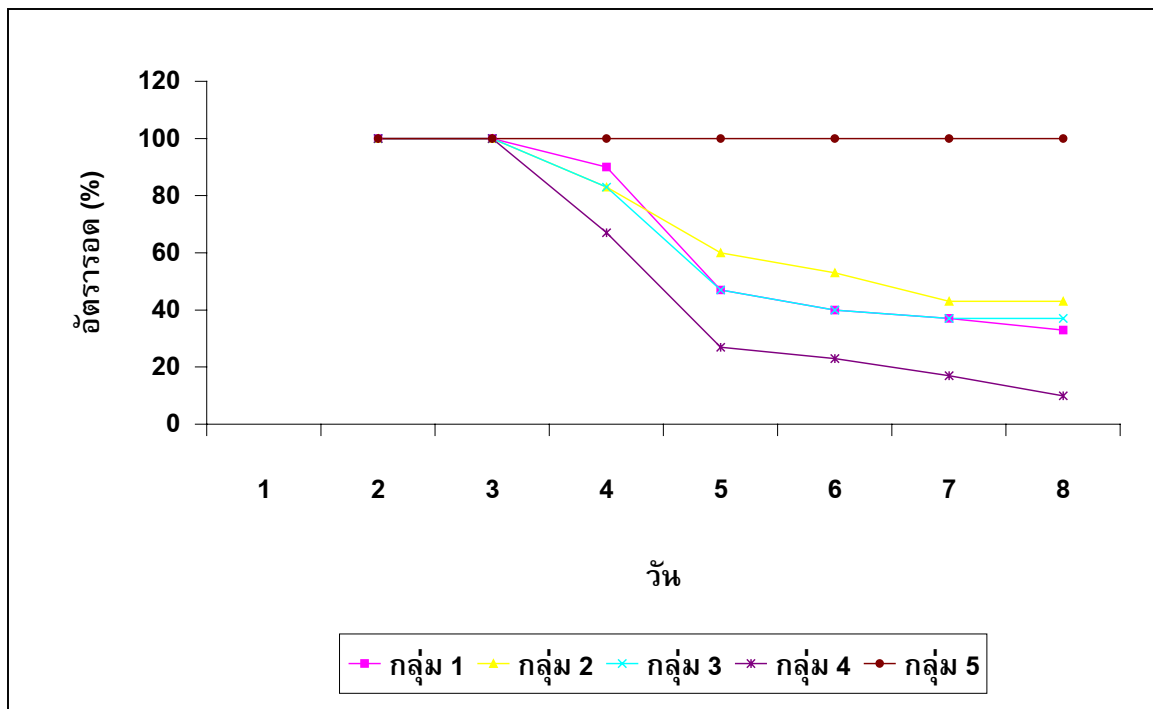
กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 5 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 10 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน แล้วแช่ในน้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน



เมื่อทำการวิเคราะห์อัตราการรอดของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยวิธีการสุ่มตลอด แล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยวิธีของดินแคนพบว่า การใช้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 วัน ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้อาหารที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 5 และ 6 โดยกุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 10 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงมีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 43.33% ในขณะที่กุ้งในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 5 และ 15 วัน แล้วได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงมีอัตราการรอดเท่ากับ 33.33% และ 36.66% ตามลำดับ ส่วนกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารธรรมชาติก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงซึ่งมีอัตราการรอดเท่ากับ 13.33% และกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวมีอัตราการรอดเท่ากับ 100%

#### 4. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์แดงในการป้องกันโรคดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์แดงในการป้องกันโรคดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวแสดงไว้ในตารางที่ 4 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

| วันที่ทำการทดลอง | อัตราการรอดตาย (ตัว) |    |    |                |    |    |                 |    |    |             |    |    |               |    |    |
|------------------|----------------------|----|----|----------------|----|----|-----------------|----|----|-------------|----|----|---------------|----|----|
|                  | กลุ่มที่ 1           |    |    | กลุ่มที่ 2     |    |    | กลุ่มที่ 3      |    |    | กลุ่มที่ 4  |    |    | กลุ่มที่ 5    |    |    |
| 1                | 10                   | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10          | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 2                | 10                   | 10 | 10 | 10             | 10 | 10 | 10              | 10 | 10 | 10          | 10 | 10 | 10            | 10 | 10 |
| 3                | 10                   | 9  | 8  | 10             | 10 | 7  | 8               | 9  | 8  | 7           | 8  | 8  | 10            | 10 | 10 |
| 4                | 7                    | 8  | 6  | 8              | 8  | 6  | 7               | 6  | 5  | 7           | 5  | 5  | 10            | 10 | 10 |
| 5                | 5                    | 7  | 4  | 7              | 6  | 5  | 6               | 4  | 3  | 5           | 4  | 2  | 10            | 10 | 10 |
| 6                | 5                    | 4  | 3  | 3              | 4  | 2  | 5               | 3  | 3  | 2           | 3  | 1  | 10            | 10 | 10 |
| 7                | 2                    | 2  | 2  | 2              | 4  | 2  | 4               | 3  | 3  | 3           | 2  | 1  | 10            | 10 | 10 |
| รวม              | 6 ตัว = 20%          |    |    | 8 ตัว = 26.66% |    |    | 10 ตัว = 33.33% |    |    | 6 ตัว = 20% |    |    | 30 ตัว = 100% |    |    |

หมายเหตุ กุ้งที่ตายจากการทดลองได้รับการส่องตรวจเชื้อไวรัสดวงขาวด้วยวิธี PCR

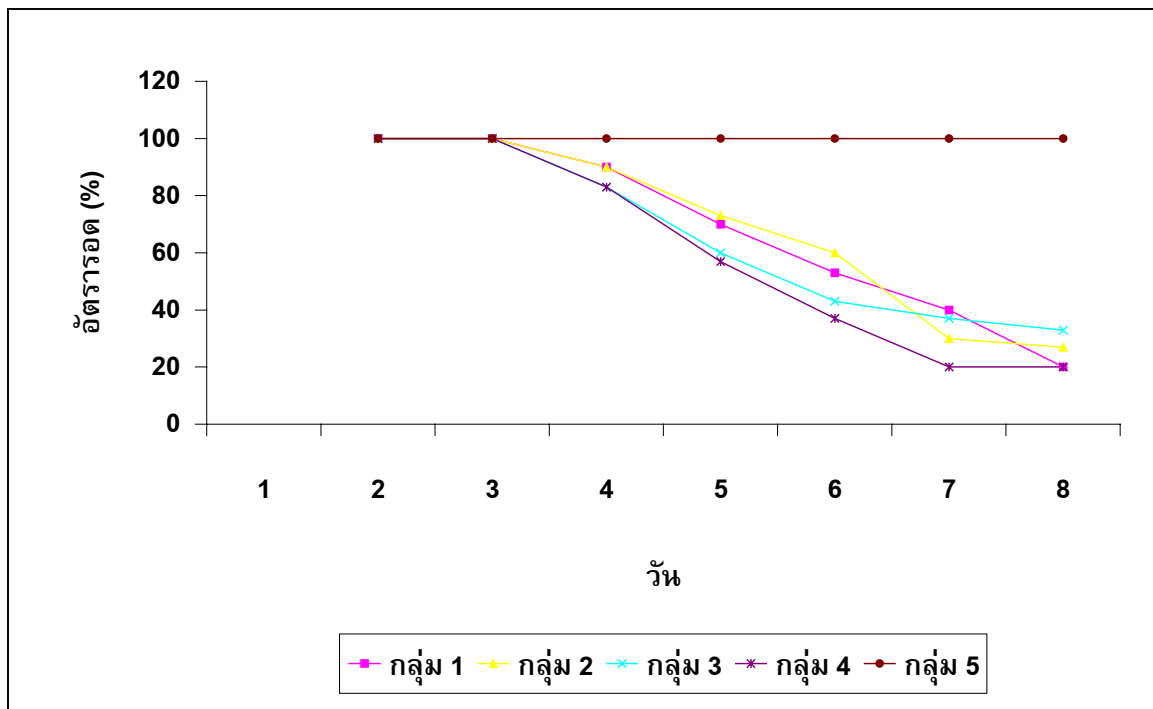
กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 5 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 10 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน

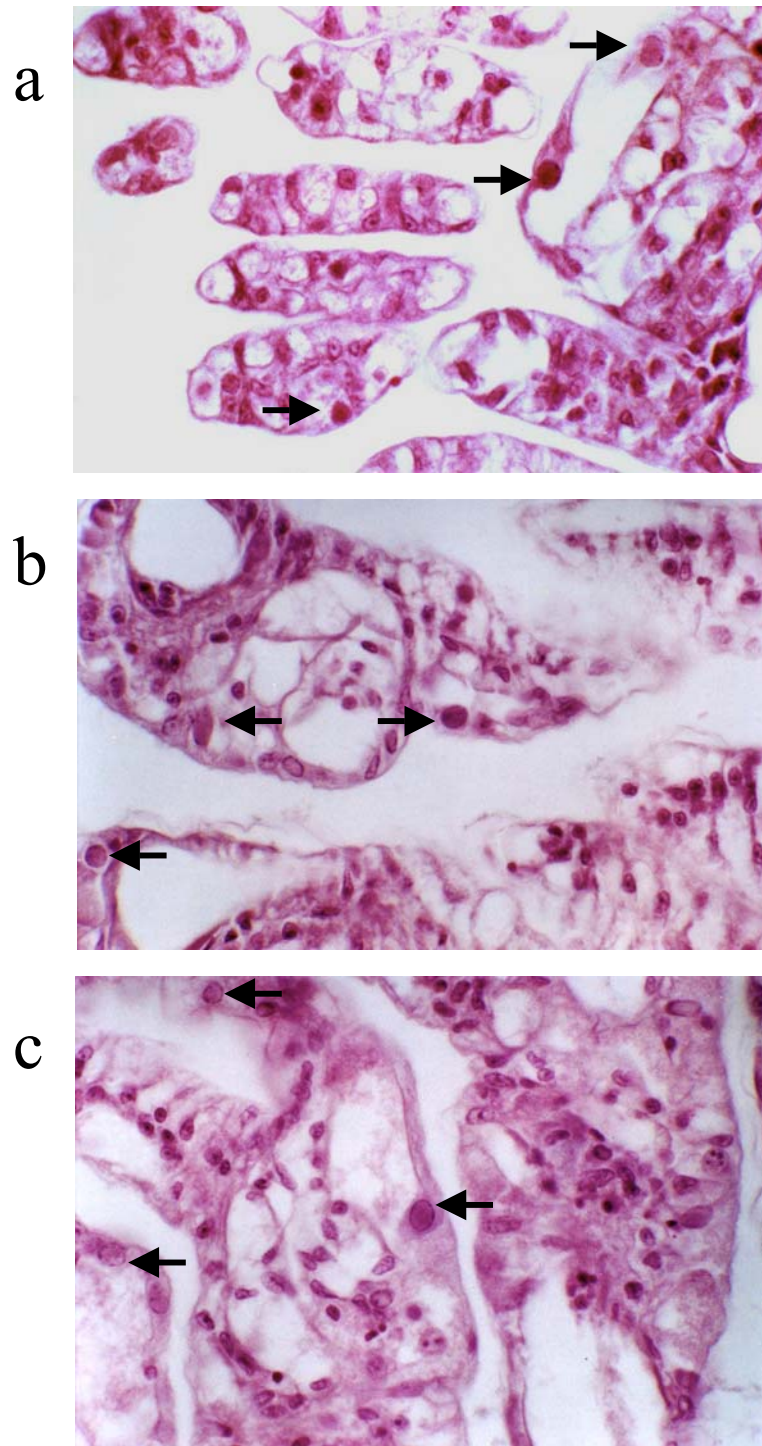


เมื่อทำการวิเคราะห์อัตราการรอดของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยวิธีการสุ่มตลอด แล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยวิธีของดันทันแคน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยกุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวมีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 33.33% ในขณะที่กุ้งในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 5 และ 10 วัน แล้วได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวมีอัตราการรอดเท่ากับ 20% และ 26.66% ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารธรรมดา ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวซึ่งมีอัตราการรอดเท่ากับ 20% และกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาว ซึ่งมีอัตราการรอดเท่ากับ 100%

##### 5. การศึกษาเปรียบเทียบขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดงกับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารฟิวคอยด์แดง

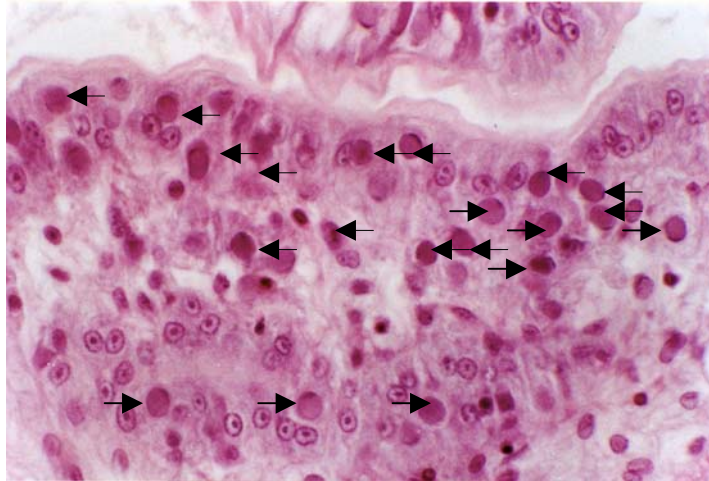
ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดงกับกลุ่มทดลองที่ได้รับสารฟิวคอยด์แดงพบว่า ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่แสดงอาการป่วยหลังจากได้รับเชื้อไวรัส

สดวงขาวของทั้งสองกลุ่มจะมีลักษณะไม่แตกต่างกันโดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับเชื้อไวรัส 24 ชั่วโมงโดยเริ่มต้นจากการเกิดการเปลี่ยนแปลงในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) และเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) โดยเชื้อไวรัสจะเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อผิวได้เปลือก เซลล์เยื่อผนังกระเพาะอาหาร เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมน้ำเหลือง และเม็ดเลือด โดยทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต (nuclear hypertrophy) และบีบอัดนิวเคลียสโครมาตินของกั๋งไปอยู่ด้านข้าง (marginated basophilic chromatin) เกิดอินคลูชันในนิวเคลียส (cowdry A-type intranuclear inclusions) (ภาพที่ 5) ในระยะต่อมาจะทำให้เกิดการตายของเซลล์เนื้อเยื่อในอวัยวะต่างๆ (multifocal necrosis) ซึ่งจะเห็นได้จากการพบช่องว่างภายในเซลล์ (transparent zone) รอบๆ ส่วนที่เป็นอินคลูชันในนิวเคลียส (ภาพที่ 6)

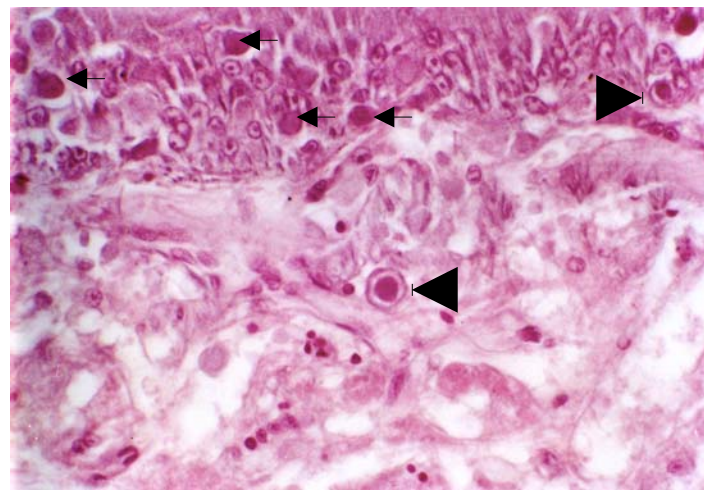


ภาพที่ 5 a, b, c เหนือกุ้มรกดำที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว H&E x 400 ลูกศรขนาดเล็กแสดงอาการนิวเคลียสบวมโต (nuclear hypertrophy) ภายในเกิดอินคลูชั่น (cowdry A-type intranuclear inclusions) และเบียดนิวเคลียสโครมาตินของกุ่มไปอยู่ด้านข้าง (marginated basophilic chromatin)

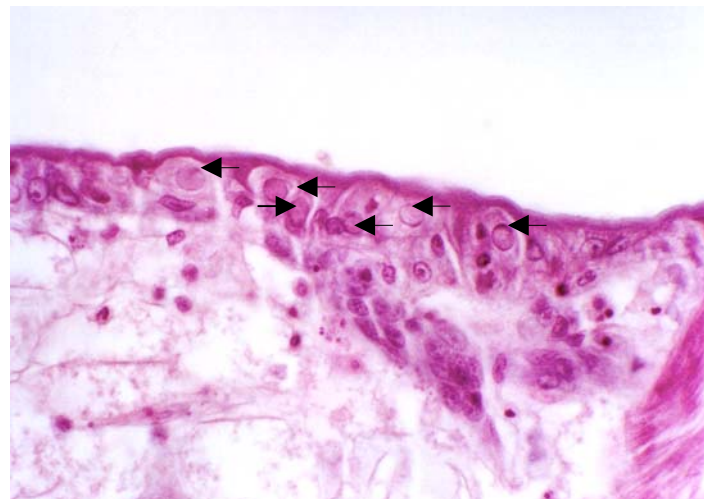
a



b



c



ภาพที่ 6 a, b, c เยื่อบุกระเพาะอาหารกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว H&E x 400 ลูกศรขนาดเล็กแสดงอาการนิวเคลียสบวมโต (nuclear hypertrophy) ภายในเกิดอินคลูชัน (cowdry A-type intranuclear inclusions) และเบียดนิวเคลียสโครมาตินของกึ่งไปอยู่ด้านข้าง (marginated basophilic chromatin) ในระยะต่อมจะพบช่องว่างรอบนิวเคลียสที่ผิดปกติ (ลูกศรขนาดใหญ่)

## วิจารณ์ผลการทดลอง

สารฟิวคอยด์แดนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นสารที่สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Sargassum* sp. ที่พบบริเวณทะเลในเขตจังหวัดระนองทำการสกัดตามวิธีของ Yamada and Niti (2004) จากการวิเคราะห์โดยใช้ NMR spectroscopy พบว่า สารที่ได้มีโครงสร้างคือ -3)-  $\alpha$ -L-Fuc(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1-4)-  $\alpha$ -L-FucZ2,3di2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(1

ในการทดลองที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm แก่กุ้งทดลองเป็นเวลา 15 วันก่อนทำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง จากการทดลองพบว่าอัตราการรอดของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm มีค่าสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 150 ppm เป็นเวลา 15 วันจะมีอัตราการรอดสูงสุด คือ 53.33% ทั้งนี้จะเนื่องมาจากคุณสมบัติของสารฟิวคอยด์แดนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม ดังรายงานของ Gerber *et al.* (1958) ที่รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายสามารถยับยั้งการจำลองตัวของ influenza B virus ได้ Ehresmann *et al.* (1977) รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายสีแดง 10 ชนิด มีผลในการยับยั้งการจำลองตัวของ herpes simplex virus ในขณะที่ Baba *et al.* (1988) รายงานว่า ฟิวคอยด์แดนซึ่งสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสที่มีเปลือกหุ้มหลายชนิดรวมทั้งไวรัส HIV เช่นเดียวกับรายงานของ Sugawara *et al.* (1989) ที่รายงานว่าสารฟิวคอยด์แดนซึ่งสกัดจากสาหร่าย *Fucus vesiculosus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการจำลองตัวของไวรัส HIV ในการเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน สำหรับการทดลองในสัตว์น้ำนั้น Takahashi *et al.* (1998) รายงานว่า สารฟิวคอยด์แดนซึ่งสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Cladosiphon okamuranus* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการจำลองตัวของไวรัสดวงขาวในกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยกุ้งที่ได้รับสารฟิวคอยด์แดนในอัตราความเข้มข้น 60 และ 100 ppm เป็นเวลา 15 วัน ก่อนที่จะได้รับเชื้อไวรัสผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง พบว่ากุ้งทดลองมีอัตราการรอดสูงถึง 77.0% และ 76.2% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลแตกต่างกับการทดลองที่ 2 ที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm แก่กุ้งทดลองเป็นเวลา 15 วันก่อนทำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสดวงขาวโดยให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว จากการทดลองพบว่าอัตราการรอดของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm และกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 15 วันจะมีอัตราการรอดสูงสุด คือ 36.66% ทั้งนี้จะเนื่องมาจาก กุ้งที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับปริมาณเชื้อไวรัสไม่เท่ากัน กุ้งบางตัวกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวปริมาณมากจึงมีโอกาสได้รับเชื้อไวรัสปริมาณมากทำให้ตายในที่สุด กุ้งบางตัวกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวใน

ปริมาณน้อยจึงได้รับปริมาณไวรัสหรือกึ่งบางตัวไม่ได้กินกึ่งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวเลยจึงไม่ได้รับเชื้อไวรัสเลยจึงรอดชีวิตอยู่ได้ ค่าอัตราการรอดที่ได้จากการทดลองครั้งนี้จึงไม่แตกต่างกันทางสถิติในส่วนของการทดลองที่ 3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์แดนในการป้องกันโรคดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัสผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งพบว่าการใช้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm (ค่าความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1) เป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 วัน ทำให้กึ่งมีอัตราการรอดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยกึ่งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 10 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงมีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 43.33% อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่ากลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 15 วันกลับมีอัตราการรอดเพียง 36.6% ทั้งนี้จะเนื่องมาจากกึ่งทดลองแต่ละตัวได้รับสารฟิวคอยด์แดนไม่เท่ากันกึ่งบางตัวไม่ยอมกินอาหารทำให้ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดน ในขณะที่กึ่งบางตัวที่กินอาหารมากก็จะได้รับฟิวคอยด์แดนในปริมาณที่มากกว่าจึงทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสได้มากกว่า

ในส่วนการทดลองที่ 4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของฟิวคอยด์แดนในการป้องกันโรคดวงขาวจากการแพร่เชื้อไวรัสโดยให้กึ่งปกติกินกึ่งที่กึ่งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ระหว่างกึ่งในกลุ่มทดลองและกึ่งในกลุ่มควบคุมโดยการใช้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm (ค่าความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2) เป็นระยะเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวโดยให้กึ่งปกติกินกึ่งที่กึ่งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาวมีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 33.33%

ในส่วนของการศึกษาขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวระหว่างกึ่งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดน และกลุ่มทดลองที่ได้รับสารฟิวคอยด์แดน (การทดลองที่ 5) นั้นพบว่าลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งที่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้จะเนื่องมาจากกึ่งในกลุ่มทดลองแต่ละตัวได้รับสารฟิวคอยด์แดนไม่เท่ากันกึ่งที่ไม่กินอาหารหรือกินอาหารน้อยจะได้รับสารฟิวคอยด์แดนในปริมาณที่น้อยกว่าทำให้ติดเชื้อไวรัสดวงขาวได้ง่ายเมื่อทำการสุมตัวอย่างกึ่งในกลุ่มนี้มาตรวจสอบทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจึงให้ผลไม่แตกต่างกันกับกึ่งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดน โดยลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจาก 24 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส ซึ่งกึ่งที่ติดเชื้อมีลักษณะยังไม่ได้แสดงอาการความผิดปกติใดๆที่เห็นได้จากภายนอกเลย โดยเนื้อเยื่อที่เกิดการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมน้ำเหลือง และเม็ดเลือด เช่นเดียวกับในรายงานของ Flegel and Sriumiratana (1994) ที่รายงานว่ากึ่งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวจะเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพภายใน 24-36 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ โดยทำให้เกิดการบวมของนิวเคลียส เกิดอินคลูชันในนิวเคลียสแล้วเกิดการตายของเนื้อเยื่อในอวัยวะต่างๆ Wongteerasupaya (1995) รายงานว่า ในระยะแรกของการติดเชื้อจะพบ

การบวมของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อนั้นนอก (ectoderm) และชั้นกลาง (mesoderm) ในระยะต่อมานิวเคลียสของเซลล์จะถูกทำลายไปเห็นแต่เพียงช่องว่างภายในเซลล์ เกิดการตายของเซลล์เป็นจำนวนมาก จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดฟิวคอยด์แดนสามารถลด อัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาวได้ระดับหนึ่งโดยกุ้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฟิวคอยด์แดน จะมีอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารฟิวคอยด์แดน อย่างไรก็ตามน่าจะมีการวิจัย เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีน้ำตาลและเทคนิคในการสกัดสารที่เป็นประโยชน์จากสาหร่าย เหล่านี้ให้มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำลงเพื่อสามารถนำมาใช้กับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้เนื่องจาก ปัจจุบันค่าใช้จ่ายในการสกัดสารเหล่านี้มีราคาที่สูงและต้องใช้สาหร่ายสีน้ำตาลในปริมาณที่มากโดย สาหร่ายสีน้ำตาลแห้ง 100 กรัม สามารถนำมาสกัดได้สารฟิวคอยด์แดนที่ใช้ในการทดลองนี้ได้เพียง 2-4 กรัม (Yamada and Niti,2004)

### ภาคผนวก

**ตารางภาคผนวกที่ 1** ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ (%) ที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านทางน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

| กลุ่ม | N | Mean               | Std. Deviation |
|-------|---|--------------------|----------------|
| 1     | 3 | 46.67 <sup>a</sup> | 11.55          |
| 2     | 3 | 53.33 <sup>a</sup> | 11.55          |
| 3     | 3 | 53.33 <sup>a</sup> | 5.77           |
| 4     | 3 | 23.33 <sup>b</sup> | 5.77           |
| 5     | 3 | 100.00             | 0.00           |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญต่อกัน( $P < 0.05$ )

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm 15 วัน แล้วแช่ในน้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm 15 วัน แล้วแช่ในน้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดนที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm 15 วัน แล้วแช่ในน้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน แล้วแช่ในน้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน

**ตารางภาคผนวกที่ 2** แสดงค่าเปรียบเทียบทางสถิติของการทดลองชุดที่ 1

|                | Sum of Squares | df    | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|-------|-------------|-------|------|
| Between Groups | 9306.67        | 4.00  | 2326.67     | 34.90 | 0.00 |
| Within Groups  | 666.67         | 10.00 | 66.67       |       |      |
| Total          | 9973.33        | 14.00 |             |       |      |

**ตารางภาคผนวกที่ 3** ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ (%) ที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

| กลุ่ม | N | Mean   | Std. Deviation |
|-------|---|--------|----------------|
| 1     | 3 | 16.67  | 15.28          |
| 2     | 3 | 26.67  | 5.77           |
| 3     | 3 | 36.67  | 5.77           |
| 4     | 3 | 20.00  | 0.00           |
| 5     | 3 | 100.00 | 0.00           |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญต่อกัน( $P < 0.05$ )

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน แล้วให้กินกุ้งที่มีเชื้อไวรัส

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน

**ตารางภาคผนวกที่ 4** แสดงค่าเปรียบเทียบทางสถิติของการทดลองชุดที่ 2

|                | Sum of Squares | df    | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|-------|-------------|-------|------|
| Between Groups | 14200.00       | 4.00  | 3550.00     | 59.17 | 0.00 |
| Within Groups  | 600.00         | 10.00 | 60.00       |       |      |
| Total          | 14800.00       | 14.00 |             |       |      |

**ตารางภาคผนวกที่ 5** ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ (%) ที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

| กลุ่ม | N | Mean               | Std. Deviation |
|-------|---|--------------------|----------------|
| 1     | 3 | 33.33 <sup>a</sup> | 5.77           |
| 2     | 3 | 43.33 <sup>a</sup> | 5.77           |
| 3     | 3 | 36.67 <sup>a</sup> | 5.77           |
| 4     | 3 | 10.00 <sup>b</sup> | 10.00          |
| 5     | 3 | 100.00             | 0.00           |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญต่อกัน( $P < 0.05$ )

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 5 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 10 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวผ่านน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน แล้วแช่ในน้ำที่มีไวรัส

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน

**ตารางภาคผนวกที่ 6** แสดงค่าเปรียบเทียบทางสถิติของการทดลองชุดที่ 3

|                | Sum of Squares | df    | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|-------|-------------|-------|------|
| Between Groups | 13373.33       | 4.00  | 3343.33     | 83.58 | 0.00 |
| Within Groups  | 400.00         | 10.00 | 40.00       |       |      |
| Total          | 13773.33       | 14.00 |             |       |      |

**ตารางภาคผนวกที่ 7** ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ (%) ที่ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

| กลุ่ม | N    | Mean   | Std. Deviation |
|-------|------|--------|----------------|
| 1     | 3.00 | 20.00  | 0.00           |
| 2     | 3.00 | 26.67  | 11.55          |
| 3     | 3.00 | 33.33  | 5.77           |
| 4     | 3.00 | 20.00  | 10.00          |
| 5     | 3.00 | 100.00 | 0.00           |

**หมายเหตุ** ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญต่อกัน( $P < 0.05$ )

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 5 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 10 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมฟิวคอยด์แดงที่ระดับความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 15 วันก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน ก่อนได้รับเชื้อไวรัสดวงขาวจากการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยเป็นโรคดวงขาว

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมให้อาหารสำเร็จรูปธรรมดา 15 วัน

**ตารางภาคผนวกที่ 8** แสดงค่าเปรียบเทียบทางสถิติของการทดลองชุดที่ 4

|                   | Sum of<br>Squares | df    | Mean<br>Square | F     | Sig. |
|-------------------|-------------------|-------|----------------|-------|------|
| Between<br>Groups | 13866.67          | 4.00  | 3466.67        | 65.00 | 0.00 |
| Within Groups     | 533.33            | 10.00 | 53.33          |       |      |
| Total             | 14400.00          | 14.00 |                |       |      |

## เอกสารอ้างอิง

- Baba, M., R. Snoeck, R. Pauwels, E. de Clercq. 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1742-1745.
- Chang, P.S., C.F. Lo, Y.C. Wang and G.H. Kou. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Organisms.* 27:131-139.
- Chevolot I., B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault, S.J. Collic. 2001. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research* 330:529-525.
- Chou, H.Y., C.Y. Huang, C.H. Wang, H.C. Chiang and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Organisms* 23:165-173.
- Ehresmann, D.W., E.F. Dieg, M.T. Hatch, L.H. DiSalvo and N.A. Vedros. 1977. Antiviral substances from California marine algae. *J. Phycol.* 13, 37-40.
- Flegel, T.W., S. Sriurairatana. 1994. Shrimp health management : an environmental approach. *In : Diseases in Aquaculture, Malaysian Fisheries Society, Publication No.8, pp.1-48.*
- Gerber, P., J.D. Dutcher, E.V. Adams and J.H. Sherman. 1958. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99, 590-593.
- Huang, J.Yu., X.L. Song, J. Kong and C.H. Yang. 1995. Studies on fine structure, nucleic acid, polypeptide and serology of hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus of penaeid Shrimp. *Mar. Fish Res.* 16:11-23.
- Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano and T. Kimura. 1994. Mass mortalities of culture kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993 : electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.* 29:149-158.
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp. Section 3 : Viruses, World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. U.S.A.

- Limsuwan, C. 1997. Reducing the effects of white-spot baculovirus using PCR screening and stressors. The AAHRI Newsletter Vol.6(1): 1-2.
- Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, C.H. Chen, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chou, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang and G.H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSSV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Organisms. 25:133-141.
- Nunan, L.M., B.T. Poulos and D.V. Lightner. 1998. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHD) in imported commodity Shrimp. Aquaculture. 160:19-30.
- Sugawara, I., W. Itoh, S. Kimura, S. Mori and K. Shimada. 1989. Further characterization of sulfated homopolysaccharides as anti-HIV agents. Experientia 45. 996-998.
- Tapay, L.M., Y. Lu, R.B. Gose, E.C. Nadala, J.A. Brock and P.C. Loh. 1997. Development of an in vitro quantal assay in primary cell cultures for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp. J. Virol. Methods. 64:37-41.
- Takahashi, Y., K. Uchida, R. Watanabe, T. Okumura, T. Yamashita, H. Omura, T. Yomo, T. Kawano, A. Kanemitsu, H. Narasaka, N. Suzuki and T. Itami. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in Kuruma Shrimp in Japan. In Flegel TW (ed) Advances in Shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. 171-173.
- Wang, C.H., C.F. Lo, J.H. Leu, C.M. Chou, P.Y. Yeh, H.Y. Chou, M.C. Tung, C.F. Chang, M.S. Su and G.H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Organisms. 23:239-242.
- Wongteerasupaya, C., J.E. Vickers, S. Sriurairatana, G.L. Nash, A. Akarajamon, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tasanakajon, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* Dis. Aquat. Organisms. 21:69-77.
- Yamada, T and N. Chuchird. 2004. Sulfated Polysaccharides Extracted from three species of brown algae. Carbohydrate Research (submitted).

## ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. เนื่องจากธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถทำรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงและนำเงินตราเข้าประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก จากข้อมูลทางสถิติของสมาคมผู้เลี้ยงผู้ผลิตและผู้ส่งออกกุ้งกุลาดำพบว่าในปี 2544 ประเทศไทยส่งออกกุ้งสดแช่แข็งมีมูลค่าถึง 98,680 ล้านบาทโดยในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคมปี 2544 ประเทศไทยส่งกุ้งออกในปริมาณถึง 87,940 ตัน มีมูลค่า 35,815 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบกับในช่วงเดือนเดียวกันของปี 2545 มีปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำ 73,737 ตันลดลง จากปี 2544 ถึง 16% และมีมูลค่า 24,813 ล้านบาทลดลงจากปี 2544 ถึง 13% ทั้งนี้เป็นเพราะปัญหาการระบาดของโรคไวรัส, ปัญหาการเลี้ยงกุ้งแล้วกุ้งไม่โต รวมทั้งปัญหาการกีดกันทางการค้าจากกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปอันเนื่องมาจากปัญหาटक้างในกุ้งกุลาดำที่ส่งออก ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของภาครัฐและเอกชนที่ต้องร่วมมือกันในการแก้ไขเพราะหากสภาวะเช่นนี้ไม่สามารถแก้ไขได้ความสูญเสียทางเศรษฐกิจจะรุนแรงขึ้นเรื่อยๆจนไม่สามารถประเมินค่าได้ดังนั้นผลจากการวิจัยนี้จึงสามารถนำไปแนะนำให้เกษตรกรเพื่อลดปัญหาความรุนแรงของโรคไวรัสดวงขาวทั้งยังช่วยลดปัญหาและสารเคมีที่ตกค้างในสัตว์น้ำได้ ทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำยังคงอยู่ต่อไป

2. ประโยชน์ที่ได้กับตัวผู้วิจัยเอง จากการที่ข้าพเจ้าได้ร่วมทำงานและได้รับคำปรึกษาอย่างใกล้ชิดจากนักวิจัยที่ปรึกษาทำให้ข้าพเจ้ามีความมั่นใจและเข้าใจหลักและขั้นตอนในการทำงานวิจัยมากขึ้น สิ่งเหล่านี้ไม่อาจตีค่าเป็นราคาหรือมูลค่าแต่ข้าพเจ้าคิดว่ามันเป็นประสบการณ์ที่ดี และช่วยให้ข้าพเจ้าได้พัฒนาตัวเองไปได้อีกระดับหนึ่ง

3. ในส่วนของสิ่งตีพิมพ์นั้นข้าพเจ้าได้ส่ง manual script งานวิจัยชิ้นนี้ในหัวข้อ **Efficacy of fucoidan extracted from sea algae for the control of white spot Syndrome virus infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสาร Marine Biotechnology ไปแล้ว แต่ยังคงอยู่ในขั้นตอนของการตรวจพิจารณางานวิจัยโดยผู้ทรงคุณวุฒิ ทั้งนี้หากข้าพเจ้าได้รับทราบผลการพิจารณาแล้วจะเรียนให้ทางสำนักงานสนับสนุนกองทุนวิจัยทราบในลำดับต่อไป