

สัญญาเลขที่ RDG 3/01/2540

โครงการพัฒนาการใช้พญาอ (*Clinacanthus nutans*)
ในการป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ

วันที่	11 ส.ย. 2546
เลขทะเบียน	00064
เลขเรียกหนังสือ	RDG 40

ccc1

รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ
(วันที่ 1 มกราคม 2540 - 31 สิงหาคม 2541)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอสเอ็มที อาคาร
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : <http://www.trf.or.th>
E-mail : trf-info@trf.or.th



โครงการพัฒนาการใช้พญาขอ (*Clinacanthus nutans*) ในการป้องกัน
โรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ

ลิลลา เรืองแป้น¹, สถาพร ตีระบุษราคัม², เยาวินิตย์ ดนยดล², ธิดา เพชรภณ²

ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร², และจิตเกษม จันทร์มือง³

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย ต.พะวง อ.เมือง จ.สงขลา 90100

² สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา อ.เมือง จ.สงขลา 90000

³ สถาบันวิจัยโรคสัตว์น้ำ เกษตรกลาง บางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

พญาขอ (*Clinacanthus nutans*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีอยู่ทั่วไปในประเทศ มีคุณสมบัติในการรักษาโรคเรื้อรังและงูสวัด ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส Herpes simplex และ Xoster จากผลการทดลองนำสารสกัดพญาขอมาใช้ประโยชน์ในการประมงพบว่า พญาขอสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสที่แยกจากกุ้งป่วยได้ คณะวิจัยจึงได้พัฒนาการใช้พญาขอเพื่อป้องกันโรคไวรัสที่กำลังระบาดในกุ้งกุลาดำอย่างรุนแรง ได้แก่ โรคหัวเหลือง ซึ่งเกิดจาก YHV (Yellow Head Baculovirus) และโรคจุดขาวซึ่งเกิดจาก SEMBV (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus) ผลการวิจัยพบว่าการรับสารพญาขอและการดูดซึมสารเข้าสู่กระแสเลือดในตัวกุ้งที่ได้รับโดยวิธีฉีดจะมีผลดีกว่าวิธีผสมอาหารให้กินและวิธีป้อนสารตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธีผสมพญาขอกับอาหารให้กินเป็นวิธีที่สะดวกและเกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งได้ นอกจากนี้ยังพบว่าพญาขอมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเมื่อนำมาแช่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มตั้งแต่ 10-30 ppt ได้ โดยสามารถทำลาย YHV ได้เฉลี่ย 100, 78.3, 78.3, 66.7, 63.3 และ 50% และทำลาย SEMBV ได้เฉลี่ย 80, 75, 63.7, 60.0, 53.3 และ 50% ตามลำดับจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากเติมเชื้อลงในสารละลายพญาขอเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราที่เหมาะสมในการผสมพญาขอกับอาหารให้กุ้งกินเพื่อป้องกันไวรัสคือ 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกัน YHV ได้เฉลี่ย 50, 72.2, 55.6 และ 94.4% หลังจากกุ้งได้รับพญาขอที่ผสมอาหารโดยการกินติดต่อกัน 7, 14, 21 และ 28 วันตามลำดับ สำหรับอัตราที่เหมาะสมในการป้องกันโรคโดยวิธีแช่กุ้งคือ 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร โดยประสิทธิภาพในการทำลาย YHV มีค่า 60 และ 15.7% หลังจากใช้สารพญาขอที่ละลายในน้ำทะเลนาน 1 ชั่วโมง และ 9 วันแช่กุ้งที่ผ่านการ challenge YHV การศึกษาผลข้างเคียงของพญาขอต่อสุขภาพกุ้งและสิ่งแวดล้อมพบว่าเมื่อใช้พญาขอในอัตราที่สูงกว่า 10 เท่า ของปริมาณที่กำหนดข้างต้น จะไม่เกิดผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตและสุขภาพกุ้งในแง่ของชนิดและปริมาณแบคทีเรียในลำไส้, เลือด และตับ/ตับอ่อน ตลอดจนเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง นอกจากนี้ยังไม่มีผล

Development of *Clinacanthus nutans* for control of viral disease in black tiger prawn
(*Penaeus monodon*)

L. Ruangpan^{*1}, S. Direkbussarakom^{*2}, Y. Danayadol^{*2}, T. Pechmanee^{*2},
Y. Predalumpaburt^{*2}
and J. Chanphong^{*3}

*1 Marine Shrimp Research and Development Center, Pawong, Muang, Songkhla 90100

*2 National Institute of Coastal Aquaculture, Kaoseng, Muang, Songkhla 90000

*3 Aquatic Animal Health Research Institute, Kasetsart Campus Jatujak, BKK 10900

Abstract

Clinacanthus nutans is a common Thai herb known to be a traditional medicine for treatment of the diseases caused by Herpes simplex and Xoster virus. The experiment on using *C. nutans* to inhibit the viral pathogens isolated from prawn disease were shown to be effective results. Therefore, the development of this medicated herb for control the Yellow Head Baculovirus (YHV) and Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) which cause mass mortality to black tiger prawn (*Penaeus monodon*) was carried out. The research aims to achieve the efficacy on prevention viral diseases, side effect as well as the environmental impact to prawn culture by using this herb.

The results indicated higher concentration level of the herb was found in prawns hemolymph after intramuscularly injection than oral administration and forced feeding, respectively. However oral administration was the practical method which the farmers can be applied in large scale. The efficacy of the herb was constant in the different level of seawater salinities range from 10-30 ppt, which could eliminate 100, 78.3, 78.3, 66.7, 63.3 and 50% of YHV and 80, 75, 63.7, 60, 53.3 and 50% of SEMBV in day 1 to day 7 after 1 µg/ml of herb extract was dissolved in seawater. The optimal concentration for mixing with pellet feed was 0.1 g/kg which could be control the diseases caused by YHV at 50.0, 72.2, 55.6 and 94.4% after prawn received the herb continuously for 7, 14, 21 and 28 days, respectively. The optimal dilution for bathing administration was 0.1 mg/l

which could be control the YHV at 60 and 15.7% after prawn were immersed in the herb that diluted for 1 h and 9 days, respectively. No side effect in terms of growth rate, immune system, tissue organs and intestinal bacterial flora after the prawn received herb extract at the optimal concentration or even 10 times higher level. Furthermore, no negative impact was observed in the environment of the prawn culture by mean of growth rate, population, and normal flora of phytoplankton and zooplankton and bacterial constitution as well as water qualities. It was suggested that further investigations were needed to prove the herb's efficacy for control the epidemic of viral diseases by elimination the virus in prawn broodstock and postlarvae at the release stage to the grow-out pond.

สรุปผลการวิจัยของโครงการ

ชื่อหัวหน้าโครงการ	นางลิลลา เรืองแป้น
ผู้ร่วมโครงการ	นางสาวสถาพร ติเรกบุษราคัม นางสาวเยาวนิตย์ ดนยดล นางธิดา เพชรมณี นางสาวจิตเกษม จันทร์ผ่อง นายยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร
ระยะเวลาโครงการ	1 มกราคม 2540 – 31 สิงหาคม 2541

กิจกรรมที่ได้ดำเนินการและผลงานวิจัย

1. การศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันโรคที่เกิดจากไวรัส YHV (Yellow Head Baculovirus) และ SEMBV (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus) และผลข้างเคียงต่อกุ้งกุลาดำ ผลการวิจัยของโครงการพัฒนาการใช้พญายอในการป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำที่ได้ดำเนินการศึกษาในด้านประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไวรัส สรุปได้ดังนี้
 - 1.1 สามารถผลิต antibody probe โดยการเตรียม CN-Rabbit antiserum ขึ้นมาใช้ในการตรวจสอบการดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งด้วยเทคนิค ELISA และพบว่า การให้สารสกัดด้วยวิธีฉีด กุ้งจะได้รับพญายอได้สูงกว่าวิธีผสมอาหารให้กิน หรือวิธีป้อน และพญายอจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้เร็วกว่า
 - 1.2 กุ้งที่ได้กินอาหารผสมพญายอในอัตรา 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมติดต่อกันทุกวัน ในอัตราที่ใช้เลี้ยงกุ้งตามปกติคือ 3% ต่อน้ำหนักกุ้ง ปริมาณสารพญายอในเลือดกุ้งจะเพิ่มขึ้นประมาณ 15-30% ต่อวัน และเมื่อกุ้งกินอาหารผสมพญายอเป็นเวลานานขึ้น จะตรวจพบพญายอในเลือดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ
 - 1.3 ความคงตัวของสารพญายอในเลือดกุ้งจะลดลงหลังจากการหยุดให้สารพญายอโดยมีอัตราการลด 15-20% ในช่วง 6 ชั่วโมงแรก และ 40-70% ในช่วง 6 ชั่วโมงต่อไป
 - 1.4 สารสกัดพญายอสามารถทำลายไวรัสทั้งสองชนิดเมื่ออยู่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มในช่วง 10-30 ppt โดยมีประสิทธิภาพทำลาย YHV ได้ 100, 78.3, 78.3, 66.7, 63.3 และ 50% และทำลาย SEMBV ได้ 80, 75, 63.7, 60, 53.3 และ 50% ตามลำดับจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากเติมพญายอ 1 ไมโครกรัม ลงในน้ำทะเล 1 มิลลิลิตร

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ป้องกันโรคไวรัส

2.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดพญายอโดยวิธีผสมอาหารให้กุ้งกินคือ ใช้สารสกัดพญายอ 0.1 กรัมต่ออาหารเม็ดสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งถ้ากุ้งได้กินอาหารผสมสารสกัดพญายอในปริมาณนี้เพียง 3 มื้อต่อวัน ก็จะมีปริมาณสารพญายอในเลือดสูงพอที่จะป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ แต่ถ้าหากกุ้งหยุดกินอาหารผสมพญายอ ปริมาณสารพญายอในเลือดก็จะลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน

การใช้สารสกัดพญายอผสมอาหารในอัตราดังกล่าวให้กุ้งกินติดต่อกันเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไวรัส YHV มีค่าเฉลี่ย 50, 72.2, 55.6 และ 94.4% ตามลำดับ

2.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ป้องกันโรคไวรัสโดยวิธีแช่กุ้งคือพญายอ 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำทะเล 1 ลิตร จากการทดลองพบว่าสารละลายพญายอในอัตรานี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจาก YHV ได้เฉลี่ย 60 และ 15.7% หลังจากแช่กุ้งที่มีเชื้อไวรัสลงในสารพญายอที่ละลายน้ำเพียงครั้งเดียวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 9 วัน ตามลำดับ

3. ผลกระทบของสารสกัดพญายอต่อกุ้งกุลาดำ

จากการวิจัยพบว่าการใช้สารสกัดพญายอให้กุ้งกินในอัตราที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นและแม้จะใช้น้ำในอัตราที่สูงขึ้นเป็น 10 เท่า จะไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อกุ้งกุลาดำในด้าน

3.1 อัตราการเจริญเติบโต

3.2 ระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้ง

3.3 ชนิดและปริมาณแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร

3.4 เนื้อเยื่อในอวัยวะระบบทางเดินอาหารได้แก่ ตับ/ตับอ่อน และลำไส้

4. ผลกระทบของสารสกัดพญายอต่อสิ่งแวดล้อม

จากผลการวิจัยผลกระทบของการใช้พญายอโดยการเติมพญายอลงในน้ำทะเล ในอัตราที่เหมาะสมดังกล่าวและแม้จะเติมพญายอให้มากกว่าเป็น 10 เท่า ก็จะไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้งในด้าน

4.1 ชนิดและปริมาณของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

4.2 อัตราการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

4.3 คุณสมบัติของน้ำที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเป็นด่างในน้ำ (Alkalinity) ความต้องการออกซิเจนทางเคมี (COD) ความต้องการออกซิเจนทางชีว (BOD) ปริมาณสารอินทรีย์รวม (TOC), ปริมาณ Kjeldahl รวม (TKN)

4.4 ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียรวมและไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตลอดจน bacterial flora ใน น้ำทะเล

5. ข้อเสนอแนะในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ และแนวทางการวิจัยต่อไป

ผลงานวิจัยครั้งนี้สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยการใช้สารสกัดพญายอผสมอาหารให้กุ้ง เลี้ยงกินในอัตรา 0.1 กรัมต่ออาหารเม็ด 1 กิโลกรัม โดยให้กินติดต่อกันทุกวันในช่วงที่มีการระบาดของโรคหัว เหลือง และโรคจุดขาวในพื้นที่เกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งอยู่ และถ้าหากจะใช้วิธีแช่ควรจะใช้กับลูกกุ้งระยะ post larvae 10 ถึงระยะ post larval 15 ซึ่งเป็นระยะที่เกษตรกรจะนำไปปล่อยลงในบ่อเลี้ยงต่อไป โดยใช้ในอัตรา 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำทะเล 1 ลิตร ซึ่งจะเป็นการทำให้ลูกกุ้งปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ ซึ่งจะช่วยลดการระบาดของ โรคได้ดี

สำหรับงานวิจัยที่ควรจะดำเนินการต่อไปคือ

5.1 การป้องกันโรคไวรัสในพ่อแม่พันธุ์กุ้งซึ่งมีรายงานว่าเป็นพาหะทำให้ไวรัสติดไปยังลูกกุ้งได้

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันโรคในลูกกุ้งระยะ post-larvae ซึ่งจะช่วยให้ตรงจรรยา ระบาดของโรคไวรัสได้

สัญญาเลขที่ RDG 3/01/2540

โครงการพัฒนาการใช้พญาขอ (*Clinacanthus nutans*) ในการป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ

Development of *Clinacanthus nutans* for control of viral disease in black tiger prawn

(*Penaeus monodon*)

รายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ

ชื่อหัวหน้าโครงการ

นางลิลลา เรืองแป้น

ผู้ร่วมงาน

นางสาวสถาพร ดิเรกบุษราคม

นางสาวเยาวนิตย์ ดนยดล

นางธิดา เพชรรมณี

นายยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร

นางสาวจิตต์เกษม จันทร์มือง

ระยะเวลาในการดำเนินงาน 1 มกราคม 2540 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2541

1. กิจกรรมที่ได้ดำเนินการในช่วง 6 เดือนแรก (1 มกราคม ถึง 30 มิถุนายน 2540)

1.1 การดูซึมและความคงตัวของสารสกัดพญาขอในกุ้งกุลาดำ

เพื่อที่จะให้ทราบข้อมูลที่ชัดเจนในด้านการดูซึมและความคงตัวของสารสกัดพญาขอในตัวกุ้ง หลังจากที่ได้รับสารสกัดพญาขอเข้าไปแล้ว จึงจำเป็นต้องหาวิธีตรวจสอบความเข้มข้นของสารสกัดพญาขอ โดยอาศัยเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกัน (Immunological techniques) มาประยุกต์ใช้งาน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1.1 การผลิต antibody probe ที่เหมาะสมต่อสารสกัดพญาขอ

1) การเตรียม CN-Rabbit antiserum

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1.1) เตรียมสารสกัดพญาขอ (CN) ให้ได้ปริมาณเข้มข้น 1 mg/ml
- 1.2) นำสารละลายพญาขอฉีดให้กระต่ายทดลอง โดยฉีดเข้าเส้นเลือด (Intravenous injection) บริเวณหลังใบหู ในปริมาณ 0.3 mg/ml
- 1.3) เลี้ยงกระต่ายทดลองที่ได้รับ CN ไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

- 1.4) กระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายครั้งที่ 1 ด้วยการฉีด CN ซ้ำ ในอัตราและวิธีการเดียวกันกับการฉีด ครั้งแรก
- 1.5) เลี้ยงกระต่ายที่ได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 1 ไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์
- 1.6) กระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายครั้งที่ 2 ด้วยการฉีด CN ซ้ำในอัตราและวิธีการเดียวกันกับการฉีดครั้งแรก
- 1.7) เลี้ยงกระต่ายที่ได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 2 ไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์
- 1.8) เก็บเลือดจากกระต่ายทดลองโดยดูดจากแอ่งเลือดบริเวณหัวใจ ปลั่งให้เลือดแข็งตัวและแยกเอา CN-Rabbit antiserum ออกมา เพื่อจะนำไปหาค่า antibody titre ต่อไป

2) การหาปริมาณ antibody titre ของกระต่ายด้วยวิธี Indirect ELISA

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 2.1) ใช้ microtitre plate ชนิดก้นมน ขนาด 96 well นำมาเคลือบด้วยสารสกัดพญายอที่มี ความเข้มข้น 10 mg/ml ใน coating buffer pH 9.6 โดยใช้ในปริมาณ 50 μ l/well
- 2.2) นำ microtitre plate ที่เคลือบสารสกัดพญายอเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกล่องรักษาความ ชื้นก่อนที่จะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (overnight)
- 2.3) ล้างสารสกัดพญายอที่เคลือบใน well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย Low salt water (LSW)
- 2.4) เติม post-coating solution (3% Bovine serum albumin, BSA) ลงใน well ปริมาณ 250 μ l/well
- 2.5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 2.6) ล้างสารเคลือบใน well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW
- 2.7) เติม CN-Rabbit antiserum ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 1 ลงไปใน well ปริมาณ 100 μ l/well
- 2.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2.9) ล้างสารออกจาก well ด้วย High salt water (HSW) จำนวน 5 ครั้ง
- 2.10) เติมสารละลาย conjugate ลงไปในปริมาณ 100 μ l/well
- 2.11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2.12) ล้างสารออกจาก well ด้วย HSW จำนวน 5 ครั้ง
- 2.13) เติม substrate solution ในปริมาณ 100 μ l/well
- 2.14) ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที
- 2.15) หยุดปฏิกิริยาของสารใน well ด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาณ 50 μ l/well

- 2.16) นำ microtitre plate ไปอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA-Reader (Series UV 900 Hdi, Biotek Instruments) ที่ช่วงคลื่น 450 nm

**3) การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพลาสมาที่สามารถตรวจสอบได้ใน
ความเจือจางระดับต่าง ๆ ของ CN-Rabbit-antiserum**

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 3.1) ใช้ microtitre plate ชนิดกันมัน ขนาด 96 well นำมาเคลือบ well ด้วยสารสกัดพลาสมา
ที่ละลายด้วย coating buffer pH 9.6 ให้มีความเข้มข้นในระดับ 0.1, 0.5, 0.01, 0.005, และ
0.001 mg/ml เป็นปริมาณ 50 µl/well
- 3.2) นำ microtitre plate ที่เคลือบสารสกัดพลาสมาไปใส่ในกล่องรักษาความชื้นและนำไปบ่มที่
อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
- 3.3) ล้างสารสกัดพลาสมาที่เคลือบใน well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW
- 3.4) เติม post-coating solution (3 % BSA) ปริมาณ 250 µl/well
- 3.5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 3.6) ล้าง well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW
- 3.7) เติม CN-Rabbit antiserum ที่เจือจางในระดับ 1:10, 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000
ปริมาณ 100 µl/well
- 3.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.9) ล้าง well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย HSW
- 3.10) เติมสารละลาย conjugate ลงไปในปริมาณ 100 µl/well
- 3.11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.12) ล้าง well จำนวน 5 ครั้งด้วย HSW
- 3.13) เติม substrate solution ในปริมาณ 100 µl/well
- 3.14) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที
- 3.15) หยุดปฏิกิริยาของสารใน well ด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาณ 50 µl/well
- 3.16) นำ microtitre plate ไปอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA-Reader ที่ช่วงคลื่น 450 nm

**4) การทำกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดพลาสมาที่สามารถ
ตรวจพบในเลือดกึ่งกลาดำ**

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 4.1) เตรียม microtitre plate ชนิดกันมันขนาด 96 well มาเคลือบด้วยสารสกัดพญายอที่ละลายด้วยสารสกัดพญายอที่ละลายด้วย coating buffer pH 9.6 ให้มีความเข้มข้นในระดับ 1,000, 500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.90 $\mu\text{g/ml}$ เป็นปริมาณ 50 $\mu\text{l/well}$
- 4.2) นำ microtitre plate ที่เคลือบด้วยสารสกัดพญายอไปใส่ในกล่องรักษาความชื้นและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
- 4.3) ล้างสารสกัดจาก well จำนวน 3 ครั้งด้วย LSW
- 4.4) เติม post-coat solution (3% BSA) ปริมาณ 250 $\mu\text{l/well}$
- 4.5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 4.6) ล้าง well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW
- 4.7) เติม CN-Rabbit antiserum ที่เจือจางในระดับ 1:100 และ 1:50 ปริมาณ 100 $\mu\text{l/well}$
- 4.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4.9) ล้าง well จำนวน 5 ครั้งด้วย HSW
- 4.10) เติมสารละลาย conjugate ลงไปในปริมาณ 100 $\mu\text{l/well}$
- 4.11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4.12) ล้าง well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย HSW
- 4.13) เติม substrat solution ในปริมาณ 100 $\mu\text{l/well}$
- 4.14) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที
- 4.15) หยุดปฏิกิริยาของสารใน well ด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาณ 50 $\mu\text{l/well}$
- 4.16) นำ microtitre plate ไปอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA-Reader ที่ช่วงคลื่น 450 nm
- 4.17) นำค่าที่อ่านได้มา plot กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดพญายอ (x) กับค่า optimum density, OD (y)

1.1.2 การใช้ antibody probe ตรวจสอบระดับความเข้มข้นของสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งกลาดำโดยวิธี ELISA

จากผลงานวิจัยในข้อที่ 1.1.1 เมื่อสามารถผลิต antibody probe ที่เหมาะสมต่อสารสกัดพญายอได้แล้ว จึงนำมาใช้ในการตรวจสอบระดับความเข้มข้นของสารในเลือดกึ่งกลาดำหลังจากกึ่งได้รับสารสกัดพญายอด้วยวิธีฉีด วิธีป้อนและวิธีผสมอาหารให้กิน โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

การให้กุ้งได้รับสารสกัดพญายอโดยวิธีฉีด

เตรียมสารสกัดพญายอให้ได้ความเข้มข้น 30 mg/ml ฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้ง ทดลองในปริมาณ 0.3 ml/ตัว เสร็จแล้วจึงดูดเลือดจากกุ้งในเวลา 0, 30, นาที 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการฉีด นำเลือดที่ดูดจากกุ้งมาผสมกับ 2.5% L-cystein ใน M-199 โดยทำเป็น 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ตัว แยกเอา serum กุ้งแต่ละตัวออกมาใช้งานในขั้นตอนต่อไป

การให้กุ้งได้รับสารสกัดพญายอโดยวิธีป้อน

เตรียมสารสกัดพญายอให้ได้ความเข้มข้น 30 mg/ml แล้วนำมาป้อนให้กุ้งทดลองในปริมาณ 0.3 ml/ตัว เสร็จแล้วจึงดูดเลือดจากกุ้งทดลองในเวลา 0, 30 นาที 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการป้อน นำเลือดกุ้งมาผสมกับ 2.5% L-cystein ใน M-199 โดยทำเป็น 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ตัว แยกเอา serum กุ้งแต่ละตัวออกมาใช้งานในขั้นตอนต่อไป

การให้กุ้งได้รับสารสกัดพญายอโดยวิธีผสมอาหารให้กิน

เตรียมสารสกัดพญายอให้ได้ความเข้มข้นของสารละลาย 100 mg/ml พ่นสารละลายลงบนอาหาร กุ้ง 100 g ให้ทั่วถึงทุกเม็ด แล้วเคลือบด้วยน้ำมันหมึก ผึ่งไว้จนแห้ง นำไปให้กุ้งทดลองกินทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง ในช่วงเวลา 8.00 และ 16.00 น. ดูดเลือดกุ้งในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 1, 2, 3 และ 5 วัน หลังจาก กุ้งได้รับสารสกัดพญายอ นำเลือดที่ได้ผสมกับ 2.5% L-cystein ใน M-199 โดยทำเป็น 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ตัว แยกเอา serum กุ้งแต่ละตัวออกมาใช้งานในขั้นตอนต่อไป

5) วิธีใช้ antibody probe ตรวจสอบสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งโดยอาศัยเทคนิค Indirect ELISA

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 5.1) เตรียม microtitre plate ขนาด 96 well นำมาเคลือบด้วยสารสกัดพญายอที่ละลายใน coating buffer pH 9.6 ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นปริมาณ 50 μ l/well
- 5.2) นำ microtiter plate ที่เคลือบสารเรียบร้อยแล้ว ไปใส่ในกล่องรักษาความชื้น แล้วนำไป บ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
- 5.3) ล้าง well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW
- 5.4) เติม post-coating solution (3% BSA) ปริมาณ 20 μ l/well
- 5.5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 5.6) ล้าง well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW

- 5.7) เติม serum ของกึ่งแต่ละตัวอย่าง ลงใน well ปริมาณ 100 µl/well สำหรับ well ที่เป็น negative control เติม phosphate buffer saline (PBS) แทน serum กึ่ง
- 5.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5.9) ล้าง well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย HSW
- 5.10) เติม conjugate ลงไป 100 µl/well
- 5.11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5.12) ล้าง well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย HSW
- 5.13) เติม CN-Rabbit antiserum ในปริมาณ 100 µl/well
- 5.14) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 5.15) ล้าง well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย HSW
- 5.16) เติม substrate solution ปริมาณ 100 µl/well
- 5.17) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที
- 5.18) หยุดปฏิกิริยาของสารด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาณ 50 µl/well
- 5.19) นำ microtitre plate ไปอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA Reader ที่ช่วงคลื่น 450 nm.
- 5.20) นำค่า OD ที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับค่า OD มาตรฐาน

1.2 ศึกษาระดับความคงตัวของฤทธิ์ทำลายไวรัสของสารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลที่ระดับ

ความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลดังต่อไปนี้

1.2.1 ฤทธิ์ในการทำลายไวรัส YHV

1.2.2 ฤทธิ์ในการทำลายไวรัส SEMBV

เพื่อทราบระดับความคงตัว และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพญายอที่มีฤทธิ์ในการทำลายไวรัส YHV และ SEMBV ซึ่งจะเป็นแนวทางในการนำสารสกัดไปใช้เพื่อทำลายเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคหัวเหลืองและโรคตัวแดงในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ตามระดับความเค็มของน้ำทะเลที่จะใช้ละลายสารสกัดพญายอคือ 10, 20 และ 30 ppt โดยนำสารสกัดพญายอมาระลายน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับ ความเค็มเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดพญายอที่ทดสอบแล้วว่ามีผลในการทำลายเชื้อไวรัสได้ และเพิ่มระดับความเข้มข้นขึ้นเป็น 10 เท่า โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดพญายอ ดังนี้

สารสกัดพญายอเข้มข้น 0 µg/ml เป็นชุดควบคุม (ไม่ใส่สารสกัดพญายอ)

สารสกัดพญายอเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นชุดที่ทดสอบว่ามีผลในการทำลายเชื้อไวรัสได้

สารสกัดพญายอเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นชุดที่เพิ่มความเข้มข้นขึ้น 10 เท่า

เตรียมน้ำทะเลระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt ใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 ml ระดับความเค็มละ 54 หลอด รวมทั้งสิ้น 162 หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้ออบความดัน ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมสารสกัดพญายอลงไปในหลอดน้ำทะเลแต่ละระดับความเค็ม โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 $\mu\text{g/ml}$ (ชุดที่ 1), 1 $\mu\text{g/ml}$ (ชุดที่ 2) และ 10 $\mu\text{g/ml}$ (ชุดที่ 3) จำนวนชุดละ 54 หลอด ตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสของสารสกัดพญายอโดยการเติมเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) ลงไปในหลอดสารละลายพญายอแต่ละชุด จำนวน 3 ข้างต่อชุด และเติมเชื้อไวรัสโรคตัวแดง (SEMBV) ลงไปในหลอดสารละลายพญายอที่เหลือ จำนวนชุดละ 3 ข้าง เช่นกัน ทั้งระยะให้สารสกัดพญายอออกฤทธิ์ทำลายเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำสารละลายพญายอที่มีเชื้อไวรัสไปฉีดเข้าตัวกุ้ง โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ในอัตราตัวละ 0.2 ml จำนวนหลอดละ 3 ข้าง ๆ ละ 5 ตัว นำกุ้งแต่ละข้างไปแยกเลี้ยงในตู้ทดลองขนาดความจุ 30 L และสังเกตอาการพร้อมทั้งบันทึกอัตราการตายของกุ้งทดลองในแต่ละวัน ตลอดระยะเวลา 14 วัน ทั้งนี้เพื่อให้ทราบว่สารสกัดพญายอแต่ละระดับความเข้มข้นที่ละลายในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt จะมีความคงตัวของฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้เป็นเวลานานเท่าไร

หมายเหตุ : การทดลองแต่ละชุดได้ทำการทดสอบซ้ำอย่างต่ำ 3 ครั้ง

ผลของการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอในการทำลายไวรัส YHV ในตารางที่ 4 และประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอในการทำลายไวรัส SEMBV ในตารางที่ 6 เมื่อใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 2 ความเข้มข้นได้แก่ 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี ANOVA เพื่อหา P-value (P-Probability, โอกาสที่จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) เพื่อยืนยันว่าประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2 ระดับนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมีเปอร์เซ็นต์สูงเท่าใด นอกจากนี้ค่าของประสิทธิภาพในการใช้สารสกัดละลายในน้ำทะเลที่มีความเค็มต่างกัน 3 ระดับ ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี ANOVA เช่นกัน ทั้งนี้เพื่อให้ทราบอย่างแท้จริงถึงอิทธิพลของความเค็มต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ละลายน้ำทะเลในช่วงเวลา 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

2. ผลงาน

2.1 การดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดพญายอในกุ้งกุลาดำ

2.1.1 การผลิต antibody probe ที่เหมาะสมต่อสารสกัดพญายอ

- 1) จากการใช้เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันเพื่อเตรียม CN-Rabbit antiserum โดยการกระตุ้น

กระต่ายทดลองด้วยสารสกัดพญายอ แล้วนำมาตรวจหาปริมาณ antibody titre ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่ามีค่าเท่ากับ 1:50,000

2) จากการใช้เทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันเพื่อเตรียมความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพญายอที่สามารถตรวจสอบได้ในความเจือจางระดับต่าง ๆ ของ antiserum ปรากฏว่ามีค่าเท่ากับ 50 µg/ml ที่ระดับความเจือจางของ CN-Rabbit-antiserum 1:100

3) การสร้างกราฟมาตรฐานที่ระดับความเจือจางของ CN-Rabbit-antiserum 1:100 พบว่าความสัมพันธ์ของสารสกัดพญายอ (x) กับค่า OD (y) มีค่าดังนี้

$$y = 2474.6 x + 363 \text{ ที่ระดับความเชื่อมั่น } 0.958$$

การสร้างกราฟมาตรฐานที่ระดับความเจือจางของ CN-Rabbit-antiserum 1:50 พบว่าความสัมพันธ์ของสารสกัดพญายอกับ OD มีค่าดังนี้

$$y = 1539.8 x + 125 \text{ ที่ระดับความเชื่อมั่น } 0.956$$

2.1.2 การใช้ antibody probe ตรวจสอบระดับความเข้มข้นของสารสกัดพญายอในเลือด กุ้งกุลาดำโดยวิธี ELISA ปรากฏผลดังนี้

1) กุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอเข้มข้น 30 mg/ml โดยวิธีฉีดในอัตรา 0.3 ml/ตัว จะตรวจพบสารสกัดพญายอในปริมาณ 910 µg/ml เมื่อ 0 นาทีหลังจากการฉีด และเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที (0.5 ชม.) จะตรวจสอบสารในเลือดกุ้ง 900 µg/ml ปริมาณของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งจะลดลงเรื่อย ๆ โดยตรวจพบ 694, 576, 456, 237 และ 113 µg/ml ในระยะ 1, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารโดยวิธีฉีดตามลำดับ และหลังจากกุ้งได้รับสารเป็นเวลา 15 ชั่วโมงแล้ว จะตรวจไม่พบสารสกัดพญายอในเลือดเลย (ตารางที่ 1)

การดูดซึมสารสกัดพญายอที่กุ้งได้รับโดยวิธีนี้จะเกิดขึ้นเร็วกว่าวิธีอื่น ๆ โดยมีการดูดซึมสารไว้ในเลือดได้ทันทีเมื่อ 0 นาที หลังจากการฉีดสารเข้าไป และกุ้งสามารถดูดซึมสารสกัดพญายอไว้ในเลือดได้ 10.11% ของปริมาณสารสกัดที่ได้รับโดยวิธีฉีดสารสกัดพญายอเข้าไปในกล้ามเนื้อ และจะคงตัวอยู่ในเลือดได้นานถึง 12 ชั่วโมง โดยปริมาณของสารสกัดจะลดลงเรื่อย ๆ เป็นจำนวน 10, 7.71, 6.4, 5.06, 2.63 และ 1.48% ในเวลา 30 นาที 1, 3, 6, 9, และ 12 ชั่วโมง หลังจากกุ้งได้รับสารสกัดโดยวิธีฉีดตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2) กุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอเข้มข้น 30 mg/ml โดยวิธีป้อน ในอัตรา 0.3 ml/ตัว พบว่าหลังจากการป้อนสารสกัดพญายอเข้าปากกุ้งเป็นเวลา 0 นาที จะตรวจพบสารพญายอในเลือด 372 µg/ml และเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที (0.5 ชม.) ปริมาณของสารพญายอในเลือดกุ้งจะลดลงเหลือ 356 µg/ml และหลังจากนั้นปริมาณสารพญายอในเลือดจะลดลงตามลำดับ โดยตรวจพบ 252, 200, 168, 160, 126 และ 28 µg/ml ที่เวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อตรวจเลือดกุ้งในเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัดพญายอวิธีป้อนจะไม่มีสารเหลืออยู่ในเลือดเลย (ตารางที่ 2)

การดูดซึมสารสกัดพญายอที่กึ่งได้รับโดยวิธีป้อนจะเกิดขึ้นในเวลาสั้น โดยมีการดูดซึมสารไว้ในเลือดได้ทันทีเมื่อ 0 นาที หลังจากการป้อนสารสกัดเข้าไปและกึ่งสามารถจะดูดซึมสารสกัดพญายอไว้ในเลือดได้ 4.10% ของปริมาณสารสกัดที่ป้อน ความคงตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งจะอยู่ได้นานถึง 15 ชั่วโมง หลังจากกึ่งได้รับสารสกัดโดยวิธีป้อน โดยสารจะคงตัวอยู่ในเลือดได้ในปริมาณ 4.00, 2.77, 2.22, 1.87, 1.78, 1.40 และ 0.31% หลังจากกึ่งได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 นาที 1, 3, 6, 9 12 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 2)

3) กึ่งที่ได้รับสารสกัดพญายอเข้มข้น 10 mg/ml โดยวิธีผสมกับอาหาร 100 g และให้กึ่งกิน 2 มื้อ/วัน ปรากฏว่าหลังจากกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดในวันแรกจะตรวจพบสารพญายอในเลือดเป็นปริมาณ 204.5 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งจะเพิ่มปริมาณขึ้นตามลำดับ หลังจากกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอไปเรื่อย ๆ โดยตรวจพบสารพญายอในเลือดกึ่งปริมาณ 234.5, 311.0 และ 367.5 $\mu\text{g/ml}$ ในวันที่ 2, 3 และ 5 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การดูดซึมของสารสกัดพญายอที่กึ่งได้รับ โดยวิธีผสมอาหารให้กินจะมีผลช้ากว่าวิธีฉีดและป้อน โดยสารสกัดจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด หลังจากกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดเป็นเวลาครบ 1 วันไปแล้ว โดยมีปริมาณการดูดซึมได้ 0.034% ของปริมาณสารสกัดที่ผสมอาหารให้กิน และปริมาณของสารสกัดในเลือดจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เป็น 0.039, 0.052 และ 0.061% เมื่อกึ่งกินอาหารผสมสารต่อไปโดยปริมาณที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน คิดเป็น 14.66, 32.62 และ 18.17% ในวันที่ 2, 3 และ 5 หลังจากกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 3)

2.2 ระดับความคงตัวของฤทธิ์ทำลายไวรัสของสารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลระดับความเค็ม 30, 20 , และ 10 ppt.

2.2.1 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลระดับความเค็ม 30 ppt

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพญายอที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ทำลายไวรัสหัวเหลืองได้ 100% ในวันที่เติมสารสกัดพญายอลงในน้ำทะเล (0 วัน) แต่หลังจากการเติมสารลงไปในน้ำทะเล 1 วัน ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะลดลงเหลือเพียง 75% และฤทธิ์จะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 7 ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสจะเหลือเพียง 30% ในขณะที่ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสารสกัดพญายอที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ จะอยู่ในระดับที่สูงกว่า และมีความคงตัวอยู่ได้นาน คือสามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสได้ 100, 95, 90, 80, และ 80% ในวันที่ 0, 1, 2, 3 และ 5 หลังจากสารสกัดพญายอละลายอยู่ในน้ำทะเล และมีฤทธิ์ทำลายไวรัสได้ถึง 60% แม้ว่าสารสกัดพญายอนั้นจะอยู่ในน้ำทะเลนานถึง 7 วัน แล้วก็ตาม (ตารางที่ 4)

2.2.2 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลระดับความเค็ม 20 ppt

ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอที่ระดับความเค็ม 20 ppt จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากสารสกัดละลายในน้ำทะเลในวันที่เริ่มใส่สารสกัดพญายอลงไป (0 วัน) โดยตรวจสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสได้ 100% ทั้งในระดับความเข้มข้น และ 1 $\mu\text{g/ml}$ และฤทธิ์ในการทำลายไวรัสหัวเหลืองของสารสกัด จะลดลงเหลือเพียง 40 และ 50 % ตามลำดับ หลังจากที่จะละลายอยู่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มระดับนี้ เป็นเวลา 1 วัน สารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลด้วยความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ จะมีฤทธิ์ในการทำลายไวรัสได้ 0 และ 10% ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ฤทธิ์ทำลายไวรัสจะหมดไปในวันที่ 5 หลังจากสารละลายในน้ำทะเล ส่วนสารสกัดพญายอที่ระดับความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ นั้น มีฤทธิ์ทำลายไวรัส YHV ได้ 65, 50 และ 50% ในวันที่ 2, 3 และ 5 ตามลำดับ หลังจากสารละลายในน้ำทะเล และยังคงมีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสได้ถึง 50% หลังจากที่จะสารสกัดละลายอยู่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มระดับเดียวกันนั้นนานถึง 7 วัน (ตารางที่ 4)

2.2.3 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10 ppt

ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10 ppt มีลักษณะเดียวกัน

กับความคงตัวของสารสกัดในน้ำทะเลระดับความเค็ม 20 ppt คือ ฤทธิ์ทำลายไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอในวันที่เริ่มใส่สารละลายลงในน้ำทะเล (0 วัน) จะอยู่ในระดับสูงสุดคือ 90 และ 100% ตามลำดับความเข้มข้นที่ 10 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ แต่เมื่อสารสกัดพญายอละลายอยู่ในน้ำทะเลในระดับความเค็มนี้เป็นเวลานาน 1 วันไปแล้ว สารสกัดที่ละลายอยู่ในน้ำทะเลในปริมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ จะมีความคงตัวของฤทธิ์ที่จะทำลายเชื้อไวรัสได้เพียง 65% และฤทธิ์ทำลายไวรัสจะลดลงเรื่อย ๆ โดยอยู่ในระดับ 50, และ 60% ในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อใส่สารสกัดลงในน้ำทะเล 10 $\mu\text{g/ml}$ แล้วปล่อยให้ทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน 5 วัน ฤทธิ์ทำลายไวรัส YHV จะหมดไปอย่างสิ้นเชิง สำหรับสารสกัดพญายอที่ระดับความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ นั้น จะมีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ได้ 90, 80, 70 และ 60% ตามลำดับ เมื่อสารสกัดละลายในน้ำทะเลเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 5 วัน แล้ว และสารละลายพญายอในชุดการทดลองนี้จะมีฤทธิ์ทำลายไวรัสหัวเหลืองได้ถึง 40% ในวันที่ 7 หลังจากสารสกัดละลายอยู่ในน้ำทะเล (ตารางที่ 4)

2.2.4 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสตัวแดง (SEMBV) ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลระดับความเค็ม 30 ppt

ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ SEMBV ของสารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30 ppt แสดงผลไว้ในตารางที่ 6 ในวันที่ 0 หลังจากเติมเชื้อไวรัส SEMBV ลงไปในสารละลายพญายอเข้มข้น 10 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ แล้วนำไปฉีดเข้าตัวกุ้ง ปรากฏว่ากุ้งจะมีอัตราการรอดชีวิต 100% ทั้งสองชุดการทดลอง และเมื่อสารสกัดละลายอยู่ในน้ำทะเลในระดับความเค็มนี้เป็นเวลานาน 1 วัน ฤทธิ์ในการทำลายไวรัส SEMBV ยังจะคงตัวอยู่ถึง 100% ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น เมื่อสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลนาน 2 วัน แล้วจึงเติมเชื้อไวรัส SEMBV ลงไป ปรากฏว่าฤทธิ์ในการทำลายไวรัส SEMBV ของสารละลายพญายอในระดับความเข้มข้น 10 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ จะลดลงมาอย่างเห็นได้ชัด คือเหลืออยู่เพียง 50 และ 76% ตามลำดับ ฤทธิ์ทำลายไวรัสของสารสกัดที่ละลายในน้ำทะเล ในความเค็มนี้จะลดลงเรื่อย ๆ จนเมื่อสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลนาน 5 วัน สารละลายพญายอที่ระดับเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ นั้น ยังมีฤทธิ์ทำลายไวรัสคงตัวได้นานถึง 7 วัน โดยสามารถทำลายเชื้อได้สูงถึง 60% ในวันที่ 5 และสามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ 50% ในวันที่ 7 หลังจากสารสกัดละลายในน้ำทะเลที่ความเค็มนี้แล้ว (ตารางที่ 6)

2.2.5 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสตัวแดง (SEMBV) ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลระดับความเค็ม 20 ppt

ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อ SEMBV ในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 20 ppt แสดงไว้ในตารางที่ 6 เมื่อสารสกัด

พญายอละลายในน้ำทะเลที่ระดับนี้เป็นเวลา 0 วัน สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ยังคงมีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส SEMBV ได้ 100% ทั้งสองความเข้มข้น และเมื่อสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลระดับความเค็มนี้ไปได้นาน 1 วัน ฤทธิ์ทำลายไวรัส SEMBV ของสารละลายพญายอทั้งสองระดับยังคงตัวอยู่ในน้ำทะเล 100% เท่าเดิม หลังจากสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลนานถึง 2 วัน แล้วฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส SEMBV ของสารละลายที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ จะลดลงไปเรื่อย ๆ เป็น 65, 55, 50% และ 75, 60, 60% ในวันที่ 2, 3 และ 5 ตามลำดับ ฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส SEMBV ยังคงตัวอยู่ได้สูงถึง 50% เท่ากันทั้งสองระดับความเข้มข้น ในวันที่ 7 หลังจากสารสกัดละลายในน้ำทะเล (ตารางที่ 6)

2.2.6 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อโรคตัวแดง (SEMBV) ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 10 ppt

ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อโรคตัวแดง (SEMBV) ในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 10 ppt จะลดลงมากอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันแรกของการละลายสารสกัดพญายอในน้ำทะเลในระดับความเค็มนี้ โดยในวันที่ 0 หลังจากสารสกัดละลายในน้ำทะเลด้วยความเข้มข้น 10 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ แล้วเติมเชื้อไวรัส SEMBV

ลงไป ปรากฏว่าสารละลายมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสได้เพียง 50 และ 40% ตามลำดับ หลังจากสารสกัดละลายในน้ำทะเล 10 ppt ในปริมาณเข้มข้น 10 µg/ml ฤทธิ์ทำลายไวรัสจะเหลือ 45, 50, 35, 20 และ 10% ในวันที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดพญายอเข้มข้น 1 µg/ml ที่ละลายในน้ำทะเลระดับความเค็มนี้ จะมีความคงตัวอยู่ในระดับ 25% ในวันที่ 1 หลังจากละลายน้ำและจะเพิ่มขึ้นเป็น 40% อย่างสม่ำเสมอในระยะ 2, 3 และ 5 วัน และความคงตัวของฤทธิ์ทำลายไวรัส SEMBV จะคงเหลืออยู่ถึง 50% ในวันที่ 7 หลังจากสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลในระดับความเค็มนี้ (ตารางที่ 6)

ผลของการวิเคราะห์ข้อมูลที่ทดสอบได้จากตารางที่ 4 โดยใช้หลักสถิติของ ANOVA เพื่อหาความแตกต่างของประสิทธิภาพสารสกัดพญายอระหว่างความเข้มข้น 1 µg/ml กับ 10 µg/ml เมื่อใช้ด้วยวิธีละลายในน้ำทะเลเป็นเวลานาน 7 วัน พบว่าการใช้สารสกัดความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ละลายน้ำเป็นเวลา 2 วัน จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ได้เท่าเทียมกัน แต่เมื่อสารสกัดละลายในน้ำทะเลนานเกินกว่า 2 วันขึ้นไป จนถึงระยะนาน 7 วัน ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดทั้ง 2 ระดับ จะมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% (ตารางที่ 5) คือสารสกัดความเข้มข้น 1 µg/ml จะมีฤทธิ์ทำลายได้สูงกว่าและนานกว่า

สำหรับการใช้สารสกัดพญายอโดยละลายสารสกัดในน้ำทะเลที่มีความเค็มต่างกัน 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppt นั้นพบว่าสารสกัดจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ไม่แตกต่างกันตั้งแต่วันแรกที่สารสกัดละลายน้ำทะเลจนถึงวันสุดท้ายของการทดสอบคือ 7 วัน หลังจากละลายสารสกัดแล้ว (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ทดสอบได้จากตารางที่ 6 โดยใช้หลักสถิติของ ANOVA เพื่อหาความแตกต่างของประสิทธิภาพสารสกัดพญายอระหว่างความเข้มข้น 1 µg/ml และ 10 µg/ml เมื่อใช้ด้วยวิธีละลายในน้ำทะเลเป็นเวลานาน 7 วัน พบว่าการใช้สารสกัดเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ละลายน้ำเป็นเวลา 7 วัน จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ได้เท่าเทียมกันตลอดการทดลองจนครบ 7 วัน

สำหรับการใช้สารสกัดพญายอ โดยละลายสารสกัดในน้ำทะเลที่มีความเค็มต่างกัน 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppt. นั้น พบว่าหลังจากเติมสารสกัดลงไปละลายในน้ำทะเลในวันแรก (0 วัน) และสารสกัดละลายน้ำทะเลไปได้ครบ 1 วัน แล้ว สารสกัดที่ละลายน้ำทะเลในระดับความเค็มต่างกัน จะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ SEMBV ได้ไม่เท่ากัน คือเมื่อใช้สารสกัดในน้ำทะเลความเค็ม 30 และ 20 pp. ฤทธิ์ในการทำลายไวรัส SEMBV จะสูงกว่าเมื่อใช้ในน้ำเค็ม 10 ppt โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% แต่เมื่อสารสกัดละลายในน้ำทะเลต่อไป เป็นเวลา 2, 3, 5 และ 7 วัน แล้วสารละลายพญายอที่อยู่ในน้ำเค็มทั้ง 3 ระดับ จะมีประสิทธิภาพในการทำลายไวรัส SEMBV ได้เท่าเทียมกันโดยตลอด (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 1 การดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งกลาดำที่ได้รับสารโดยวิธีฉีด

เวลาหลังการฉีด (ชม.)	ค่า OD เฉลี่ย	ปริมาณสารในเลือดเฉลี่ย ($\mu\text{g/ml}$)	การดูดซึมและความคงตัว (%)
0	0.713	910	10.11
0.5	0.707	900	10.00
1	0.582	694	7.71
3	0.546	576	6.40
6	0.497	456	5.06
9	0.277	237	2.63
12	0.125	133	1.48
15	0	0	0
18	0	0	0
21	0	0	0
24	0	0	0

ตารางที่ 2 การดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งกลาดำที่ได้รับสารโดยวิธีป้อน

เวลาหลังการป้อน (ชม.)	ค่า OD เฉลี่ย	ปริมาณสารในเลือดเฉลี่ย ($\mu\text{g/ml}$)	การดูดซึมและความคงตัว (%)
0	0.323	372	4.10
0.5	0.312	356	4.00
1	0.277	252	2.77
3	0.211	200	2.22
6	0.19	168	1.87
9	0.185	160	1.78
12	0.163	126	1.40
15	0.099	28	0.31
18	0	0	0
21	0	0	0
24	0	0	0

ตารางที่ 3 การดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารโดยวิธีผสมอาหารให้กิน

การตรวจสอบ	ระยะเวลาหลังการกิน (วัน)				
	0	1	2	3	5
ค่า OD เฉลี่ย	0	0.214	0.264	0.283	0.32
ปริมาณสารในเลือดเฉลี่ย ($\mu\text{g/ml}$)	0	204.5	234.5	311.0	367.5
สารในเลือดที่เพิ่ม/วัน (%)	0	100	14.66	32.62	18.17
การดูดซึมและความคงตัว (%)	0	0.034	0.039	0.052	0.061

หมายเหตุ : อัตราการกินอาหารของกุ้งคิดที่ 3% ของน้ำหนักตัว, น้ำหนักกุ้ง 20 gm/ตัว

ปริมาณสารที่ตรวจพบในเลือดวันที่ 1 หลังการกินอาหารคิดเป็น 100%

ตารางที่ 4 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30, 20 และ 10 ppt ซึ่งแสดงให้เห็น โดยอัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับสารสกัดหลังจากเติมลงในน้ำทะเล

จำนวนวัน หลังจากสาร สกัดละลาย	เฉลี่ยอัตราการรอดของกุ้ง (%)									
	ความเค็มน้ำทะเล (ppt)									
	30			20			10			10-30µg/ml
	ความเข้มข้นสาร (µg/ml)									
	C	1	10	C	1	10	C	1	10	%RPS เฉลี่ย
0	0	100	100	0	100	0	0	100	90	100.0
1	0	95	75	0	50	40	0	90	65	78.3
2	0	90	60	0	65	0	0	80	50	78.3
3	0	80	35	0	50	10	0	70	60	66.6
5	0	80	40	0	50	0	0	60	0	63.3
7	0	60	30	0	50	0	0	40	0	50.0

RPS = ประสิทธิภาพของการป้องกันโรค หรือ Relative percent of survival

C = กลุ่มควบคุมไม่ได้ใช้สารพญายอ

ตารางที่ 5 ค่า P-value ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี ANOVA เพื่อหาความแตกต่างของผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไวรัส YHV เมื่อใช้สารสกัดพญายอเข้มข้น 1 และ 10µg/ml ละลายในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

ข้อมูลที่เปรียบเทียบ	ค่า P-Value					
	ระยะเวลาที่สารสกัดละลาย (วัน)					
	0	1	2	3	5	7
ความเข้มข้น 1, 10 µg/ml	0.422	0.063	0.101	0.012	0.013	0.013
ระดับความเค็ม 10, 20, 30 ppt	0.5	0.094	0.224	0.223	0.065	0.5

หมายเหตุ : หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 6 ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส SEMBV ของสารสกัดพญายอในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30, 20 และ 10 ppt ซึ่งแสดงให้เห็นโดยอัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับสารสกัดหลังจากเติมลงในน้ำทะเล

จำนวนวัน หลังจากสาร สกัดละลาย	เฉลี่ยอัตราการรอดของกุ้ง (%)									
	ความเค็มน้ำทะเล (ppt)									
	30			20			10			10-30µg/ml
	ความเข้มข้นสาร (µg/ml)									
	C	1	10	C	1	10	C	1	10	%RPS เฉลี่ย
0	0	100	100	0	100	0	0	40	50	80.0
1	0	100	100	0	100	0	0	25	45	75.0
2	0	76	50	0	75	0	0	40	50	63.7
3	0	80	50	0	60	0	0	40	35	60.0
5	0	60	0	0	60	0	0	40	20	53.3
7	0	50	0	0	50	0	0	50	10	50.0

RPS = ประสิทธิภาพของการป้องกันโรค หรือ Relative percent of survival

C = กลุ่มควบคุมไม่ได้ใช้สารพญายอ

ตารางที่ 7 ค่า P-value ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี ANOVA เพื่อหาความแตกต่างของผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายไวรัส SEMBV เมื่อใช้สารสกัดพญายอเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml ละลายในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

ข้อมูลที่ใช้เปรียบเทียบ	ค่า P-Value					
	ระยะเวลาที่สารสกัดละลาย (วัน)					
	0	1	2	3	5	7
ความเข้มข้น 1, 10 µg/ml	0.423	0.422	0.554	0.344	0.188	0.188
ระดับความเค็ม 10, 20, 30 ppt	0.008	0.023	0.416	0.775	0.456	0.5

หมายเหตุ : หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปและวิจารณ์ผล

กิจกรรมที่ 1 : การดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดพญายอ

จากการทดลองในกิจกรรมนี้พบว่า antibody probe ที่ผลิตขึ้นมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งนั้น ให้การได้ในระดับดี และสามารถจะใช้ตรวจสอบหาสารได้ แม้สารพญายอจะเหลืออยู่ในตัวกึ่งที่ระดับต่ำเพียง 28 µg/ml โดยใช้เวลาตรวจสอบในระยะสั้น และจากการตรวจสอบปริมาณการดูดซึมสารสกัดพญายอภายหลังจากการได้รับสารโดยวิธีฉีด ป้อน และผสมอาหารให้กิน ปรากฏว่าการให้สารสกัดโดยวิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อ สารสกัดจะดูดซึมเข้าไปอยู่ในกระแสเลือดกึ่งได้ทันทีหลังจากการฉีด โดยปรากฏสารในเลือด 910 µg/ml หรือคิดเป็น 10.11% ของสารปริมาณสารที่ฉีดเข้าไป เมื่อให้สารสกัดแก่กึ่งโดยวิธีป้อนในอัตราเดียวกันกับการให้ด้วยวิธีฉีด พบว่าสารสกัดพญายอจะเข้าไปอยู่ในกระแสเลือดกึ่งได้ทันทีเช่นกัน แต่สารจะเข้าไปในเลือดได้ปริมาณน้อยกว่าการให้สารโดยวิธีฉีด คือตรวจสอบได้เพียง 372 µg/ml หรือคิดเป็น 4.10% ของปริมาณสารที่ป้อน ทั้งนี้เป็นเพราะว่าขณะที่ป้อนสารให้กึ่งนั้น กึ่งจะคายสารออกมาเสมอ แม้จะทดลองป้อนกึ่งเป็นจำนวนมาก กว่า 20 ตัวต่อซ้ำแล้วก็ตาม ปริมาณสารสกัดที่ถูกดูดซึมเข้าไปในเลือดกึ่งจึงอยู่ในระดับต่ำกว่าการให้สารโดยวิธีฉีดถึง 59.44% ส่วนการให้สารสกัดพญายอโดยวิธีผสมอาหารให้กินนั้น จะมีการดูดซึมเข้าไปในตัวกึ่งได้ช้ากว่าการให้โดยวิธีฉีดและป้อน โดยในวันแรกหลังจากให้กึ่งกินอาหารจะตรวจไม่พบสารสกัดพญายอในเลือดเลย และเมื่อให้กึ่งกินอาหารผสมสารสกัดครบ 1 วันไปแล้ว จะมีสารสกัดที่ดูดซึมเข้าไปอยู่ในเลือดปริมาณ 204.5 µg/ml หรือคิดเป็น 0.034% ของปริมาณสารที่ผสมอาหารให้กิน โดยคิดจากอัตราการกินอาหารตามปกติของกึ่งคือ 3% ของน้ำหนักตัว และเมื่อกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอเป็นเวลานานขึ้น จนครบ 5 วัน ระดับสารสกัดในเลือดกึ่งกับอาหารให้กึ่งกิน

สารสกัดจะเข้าไปอยู่ในเลือดกุ้งเมื่อ 24 ชั่วโมง หลังจากกุ้งกินอาหารผสมสารเข้าไป ซึ่งข้อมูลของการดูดซึม ในช่วง 24 ชั่วโมง ยังไม่สมบูรณ์ จึงควรมีการตรวจสอบปริมาณสารในเลือดกุ้งเป็นระยะๆ หลังจากกินอาหารมื้อที่ 1 เข้าไปแล้ว ได้แก่ ระยะ 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้อาหารมื้อต่อไปวันเดียวกันนั้น ทั้งนี้เพื่อให้ทราบข้อมูลในการดูดซึมและความคงตัวของสารสกัดให้ชัดเจนกว่านี้ อย่างไรก็ตามเมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดในวันที่ 2 ปริมาณสารสกัดในเลือดกุ้งเพิ่มขึ้นจากเดิม 30 µg/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ กุ้งได้รับในวันที่ 1 ยังคงเหลืออยู่ในเลือดกุ้งอยู่บางส่วน หลังจากสารสกัดได้ถูกเปลี่ยนรูปหรือถูกขับออกไป กับสิ่งขับถ่ายของกุ้งแล้ว และปริมาณสารที่ตรวจพบในเลือดจะสูงขึ้นตามลำดับ โดยมีอัตราการเพิ่มของ สารสกัดในเลือดแต่ละวันเท่ากับ 30, 76.5 และ 56.5 µg/ml หรือคิดเป็น 14.66, 32.62 และ 18.17% ใน วันที่ 2, 3 และ 5 หลังจากกินอาหารผสมสารสกัด ติดต่อกันมาตามลำดับ

กิจกรรมที่ 2 : ศึกษาระดับความคงตัวของฤทธิ์ทำลายไวรัส YHV และ SEMBV ของสารสกัด

พญายอที่ละลายในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

จากผลการทดลองในกิจกรรมนี้ พบว่าค่าเฉลี่ยของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดพญายอ ที่ละลายในน้ำทะเล ระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt จะมีความแตกต่างกันในตัวเลข แต่เมื่อนำผลไป คำนวณหาค่าทางสถิติโดยการวิเคราะห์ ANOVA แล้วพบว่าประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ YHV ของสาร สกัดพญายอในระดับความเค็มทั้ง 3 ระดับ จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ เชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5)

ความเข้มข้นของสารสกัดเมื่อละลายในน้ำทะเลในปริมาณ 1 และ 10 µg/ml มีฤทธิ์ในการทำลายไวรัส YHV ได้เกือบเท่าๆ กัน โดยสารสกัดที่ละลายในน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับความเค็มในวันที่ 1 และ 2 โดยประสิทธิ ภาพในการทำลายไวรัสได้ใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อ มั่น 95% แต่เมื่อสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลเป็นเวลาตั้งแต่ 3 วัน จนถึงระยะ 7 วัน ประสิทธิภาพใน การทำลายเชื้อ YHV ของสารสกัดพญายอในปริมาณความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml จะมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5) ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV ของสารสกัดปริมาณเข้มข้น 10 µg/ml ในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 10 และ 20 ppt จะหมดไปเมื่อสารสกัด ละลายอยู่ในน้ำทะเลนาน 5 วันขึ้นไป แต่ในสภาพความเค็ม 30 ppt ฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส YHV จะยังคงตัว อยู่ในระดับ 30-40% ในวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 หลังจากสารสกัดละลายอยู่ในน้ำทะเล (ตารางที่ 4)

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัส SEMBV ของสารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลระดับ ความเค็มต่างกัน พบว่าเมื่อใช้สารสกัดในปริมาณความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ ละลายในน้ำทะเลที่ความเค็ม ต่างๆ กัน เป็นเวลา 0 และ 1 วัน ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัส SEMBV ของสารสกัดความเข้มข้น 1 µ g/ml จะมีค่าสูงกว่า 10 µg/ml โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

และประสิทธิภาพในการทำลายไวรัสจะไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อใช้สารสกัดทั้งสองระดับความเข้มข้นในน้ำทะเลที่มีความเค็มต่างกันในวันที่ 2-7 หลังจากสารสกัดละลายน้ำแล้ว (ตารางที่ 6 และ 7)

ความคงตัวของฤทธิ์ทำลายไวรัส SEMBV เมื่อใช้ในปริมาณ 1 $\mu\text{g/ml}$ ในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่เมื่อใช้สารสกัดในปริมาณ 10 $\mu\text{g/ml}$ ละลายในน้ำทะเล 30 ppt จะมีความคงตัวของฤทธิ์ทำลายไวรัสอยู่ได้เพียง 3 วัน หลังจากสารสกัดละลายน้ำแล้ว (ตารางที่ 6)

3. ความเห็นของผู้วิจัย

3.1 ข้อสรุป

3.1.1 การให้สารสกัดพญายอโดยวิธีฉีด กุ้งจะได้รับสารสกัดได้ในปริมาณที่สูงกว่า และมีการดูดซึมได้เร็วกว่าการให้โดยวิธีป้อน และผสมอาหารให้กิน โดยมีปริมาณการดูดซึม สารสกัดเข้าสู่กระแสเลือดเป็นปริมาณ 10.11%

3.1.2 ความคงตัวของสารสกัดในตัวกุ้งจะลดลงประมาณชั่วโมงละ 15-20 ในช่วง 6 ชั่วโมงแรก หลังจากกุ้งได้รับสารสกัดโดยวิธีฉีดและป้อน และลดลงชั่วโมงละ 40-70% ใน 6 ชั่วโมงต่อไป

3.1.3 การให้สารสกัดพญายอโดยวิธีผสมอาหารให้กินวันละ 2 มื้อ กุ้งจะได้รับสาร 0.034% ของปริมาณที่ให้และปริมาณที่ตรวจพบในเลือดจะเพิ่มขึ้นทุกวันประมาณ 15-30% ต่อวัน ถ้าให้กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดต่อไปจนครบ 5 วัน

3.1.4 สารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลมีประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคหัวเหลือง (YHV) และโรคตัวแดง (SEMBV) ในกุ้งกุลาดำได้ทั้ง 2 ชนิด

3.1.5 สารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt มีฤทธิ์ทำลาย ไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้เท่ากันทั้ง 3 ระดับความเค็ม

3.1.6 สารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลในระดับความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ อีกด้วย การใช้สารสกัดในปริมาณความเข้มข้นที่สูงขึ้น (10 เท่า = 10 $\mu\text{g/ml}$) ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสจะยิ่งหมดไปในเวลาที่สั้นขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการใช้สารสกัดพญายอในปริมาณย่อมจะมีสารอินทรีย์ละลายในน้ำทะเลในปริมาณสูงซึ่งจะมีส่วนไปกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายสารสกัดให้หมดไป ก่อนที่จะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสได้มากตามความเข้าใจของผู้ใช้สาร จึงเป็นสาเหตุให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไวรัสลดลงไปด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแนวทางในการนำสารสกัดพญายอไปใช้ทำลายเชื้อไวรัสในน้ำ ควรจะใช้ในระดับความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งจะทำให้มีประสิทธิภาพป้องกันไวรัสได้สูงสุดในน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับความเค็ม และเป็นวิธีที่ใช้สารสกัดอย่างประหยัดที่สุด

3.1.7 ในการดูซึมและความคงตัวของสารสกัด โดยวิธีผสมสารสกัดกับอาหารให้กึ่งกินจะต้องมีการทดสอบเพิ่มโดยหาค่าในระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง หลังจากที่กึ่งได้กินอาหารมื้อแรกไปแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดกว่านี้

3.2 ปัญหาและอุปสรรค

3.2.1 ในการทำการทดลองบางครั้ง หลังจากฉีดไวรัสเข้ากึ่งแล้ว กึ่งในชุดควบคุมที่ไม่ใช้สมุนไพรจะไม่ตาย ทั้งนี้เนื่องจากกึ่งที่นำมาใช้อาจเคยได้รับเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคนั้นมาก่อนแล้ว แต่เป็นระดับที่น้อย กึ่งจึงรอดอยู่ได้ และยังไม่กระตุ้นให้กึ่งที่รอดชีวิตมีภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ การทดลองในชุดนั้นจึงต้องยกเลิกไปโดยไม่สามารถวัดผลที่แท้จริงได้ทำให้เสียเวลาและสูญเสียกึ่งที่ใช้ทดลองไปแต่ละครั้งเป็นจำนวนมาก ผู้วิจัยจึงได้แก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยพยายามคัดเลือกกึ่งจากบ่อเลี้ยงในบริเวณที่ไม่มีประวัติของการเกิดโรคมาทดลอง ซึ่งแสวงหาได้ยาก เนื่องจากในปัจจุบันการแพร่กระจายของโรคไวรัสทั้งสองชนิดเป็นไปอย่างกว้างขวางเกือบทุกพื้นที่ การแก้ไขปัญหานี้วิธีหนึ่งที่จะปฏิบัติต่อไปคือการสุ่มตัวอย่างกึ่งแต่ละชุดไปตรวจหาเชื้อตัวแดงด้วยระบบ PCR ส่วนโรคหัวเหลืองนั้น ยังไม่มีวิธีการตรวจพบก่อนที่กึ่งจะแสดงอาการ ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจจะทำให้แผนการดำเนินงานล่าช้าลงบ้าง

3.2.2 ปัญหาในการจ้างผู้ช่วยนักวิจัย เนื่องจากสถานที่ปฏิบัติงานตั้งอยู่ในต่างจังหวัด จึงทำให้ผู้มาสมัครเป็นลูกจ้างชั่วคราว ตำแหน่งนักวิชาการจำนวนน้อยไม่สามารถจะคัดเลือกคนที่มีประสิทธิภาพได้ นอกจากนี้ยังมีการลาออกบ่อยๆ ทำให้การวิจัยที่กำลังดำเนินงานต้องหยุดชะงักและต้องเสียเวลาในการฝึกคนใหม่เสมอ ดังนั้นในงวดที่ 2 ของการดำเนินกิจกรรม จึงขอเปลี่ยนตำแหน่งนักวิชาการ จำนวน 1 ตำแหน่ง เพื่อจ้างเจ้าหน้าที่ประมง 1 ตำแหน่ง และคนงานประมง อีก 1 ตำแหน่ง แทนนักวิชาการประมง โดยแสดงไว้ในรายงานงบประมาณแล้ว

3.3 ความก้าวหน้าของการวิจัยเกินคาด

ความก้าวหน้าของกิจกรรมวิจัยที่เกินเป้าหมาย ขณะนี้ทำการวิจัยระดับความเข้มข้นและระยะเวลาใช้สารสกัดที่มีผลในการป้องกันไวรัสโดยการผสมสารสกัดพญาอภัยกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป ให้กึ่งกินในระดับความเข้มข้นสารสกัด 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 g/kg (ตามที่ระบุในกิจกรรมที่ 1.1 ของระยะเวลาการวิจัยงวดที่ 2) และ challenge กึ่งด้วยเชื้อ YHV ผลปรากฏว่าเมื่อผสมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 10 g/kg ให้กึ่งกิน กึ่งจะตาย 90-100% ทุกครั้งหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นสูงขนาดนี้ ดังนั้นนักวิจัยของเปลี่ยนแปลงละเอียดในการวิจัยของกิจกรรมที่ 1.1 งวดที่ 2 จากการทดสอบโดยการผสมสารสกัดพญาอภัยกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยลดความเข้มข้น 5 ระดับ มาเป็นความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.1, และ 1 g/kg อาหาร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นสารสกัดครั้งนี้จะมีผลต่อการการวิจัยในขั้นต่อไปคือ

- 1) ประหยัดจำนวนสารสกัด
- 2) ประหยัดจำนวนกุ้งที่ใช้ทดสอบ

1.2 กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ ในช่วงที่ 2 วันที่ 1 กรกฎาคม ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2540

1.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพญายอที่ใช้ผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส YHV และ SEMBV

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการใช้สารสกัดพญายอผสมอาหารให้กุ้งกิน เพื่อป้องกันโรคไวรัสว่า จะได้ผลเป็นประการใด และควรจะใช้ในปริมาณเท่าใด จึงจะมีผลไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันจนทำให้กุ้งสามารถ ป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ การทดลองในกิจกรรมนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบข้อมูลสำคัญดังนี้

1.2.1.1 ปริมาณเหมาะสมของสารสกัดที่ผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อให้กุ้งสามารถ ป้องกันโรคไวรัสได้

1.2.1.1 ป้องกันโรคไวรัสได้ ตามแผนงานเดิมได้กำหนดความเข้มข้นสารสกัดพญายอที่ใช้ผสมอาหารให้กุ้งกินไว้ 5 ระดับ โดยได้ทดสอบ ในขั้นต้น ได้ผลแล้วว่าการให้กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดในระดับ 0.01-0.1 g/kg ทำให้กุ้งสามารถจะป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสได้ ดังนั้นจึงได้กำหนดใช้สารสกัดระดับที่ต่ำลงมา 1 ระดับ และสูงขึ้นไปอีก 2 ระดับ รวมเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 g/kg แต่ปรากฏว่าเมื่อผสมสารสกัดให้กุ้งกินในระดับความเข้มข้น 10 g/kg บางครั้ง กุ้งมีอาการเครียด และคายอาหารออกมา และมีจำนวนมากที่ไม่ยอมกิน อีกทั้งผลการทดสอบออกมาปรากฏว่ากุ้งที่ได้รับสาร 10 g/kg มีอัตราการตายสูงถึง 90-100 % เพื่อเป็นการประหยัดการใช้สารสกัด และเพื่อความปลอดภัยของกุ้ง จึงขอเปลี่ยนแปลงแผนการดำเนินงาน โดยตัดความเข้มข้นของสารสกัดที่ 10 g/kg ออก เหลือความเข้มข้นสารสกัดที่จะทดสอบผสมอาหารให้กุ้งกินเพียง 4 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) นำสารสกัดพญายอไปชั่งน้ำหนักในอัตราที่ต้องการคือ 0.01, 0.1 และ 1 g
- 2) เตรียมสารสกัดให้อยู่ในรูปสารละลายระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/ml เพื่อที่จะนำไปผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูป
- 3) นำสารละลายพญายอแต่ละความเข้มข้นพ่นลงบนอาหารเม็ด ความเข้มข้นละ 1,000 g โดยให้สารละลายเคลือบอาหารจนทั่วถึงทุกเม็ด ผึ่งไว้ให้แห้งสักครู่
- 4) เคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันหมึกจนทั่วถึงกัน แล้วผึ่งไว้ให้แห้ง การเตรียมอาหารจะทำใหม่ทุกๆ 7 วัน
- 5) นำอาหารผสมสารสกัดพญายอให้กุ้งทดลองกิน 3 มื้อ/วัน ในช่วงเวลาเช้า (8.00 น.) ช่วงกลางวัน (13.00 น.) และเย็น (16.00 น.) โดยให้กินติดต่อกันไปจนครบกำหนดที่ต้องการ

1.2.1.2 ระยะเวลาการให้สารสกัดพญายอโดยวิธีผสมกับอาหารให้กุ้งกินนั้น สารสกัดจะค่อยๆ ซึมผ่านผนังลำไส้กุ้งออกไปสู่ระบบเลือดที่เป็นแบบเปิด โดยมีท่อเลือดแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อทุกส่วน และปริมาณสารสกัดที่ตรวจพบ จะเพิ่มขึ้นในปริมาณ 14-32 % เท่านั้น (จากผลการวิจัยกิจกรรมที่ 1.1 งวดที่ 1) การทดลองครั้งนี้ จึงได้กำหนดเวลาการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอที่จะคงอยู่ในเลือดในปริมาณที่เพียงพอจะป้องกันการติดเชื้อไวรัสได้ โดยกำหนดเป็นระยะๆ ดังนี้

ระยะที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพเมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอครบ 7 วัน

ระยะที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพเมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอครบ 14 วัน

ระยะที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพเมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอครบ 21 วัน

ระยะที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพเมื่อกุ้งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอครบ 28 วัน

วิธี infect ตัวอย่างกุ้งเพื่อให้เกิดการติดเชื้อ (Challenge)

เมื่อถึงกำหนดเวลาที่จะทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอที่กุ้งได้รับ โดยการกิน จึงทำการ infect กุ้งเพื่อทำให้กุ้งทดลองในแต่ละกลุ่ม ติดเชื้อด้วยการใส่เชื้อไวรัส YHV และ SEMBV ลงไปในน้ำทะเลในตู้ทดลองที่เลี้ยงกุ้งอยู่

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) เตรียมฉีดเชื้อไวรัส YHV/SEMBV เพื่อทำให้กุ้งติดเชื้อจนแสดงอาการป่วย จากนั้นจึงตรวจสอบเชื้อจากกุ้งที่ฉีดเพื่อให้แน่ใจว่าติดเชื้อ YHV/SEMBV ในกุ้งทั้ง 2 กลุ่มแล้ว
- 2) ตัดเหงือกกุ้งที่มีเชื้อไวรัสแต่ละชนิด ให้ได้เหงือกกลุ่มละ 10 g นำไปบดให้ละเอียด แล้วนำไปใส่ในตู้ทดลองที่เลี้ยงกุ้งในปริมาณ 10 g/น้ำทะเล 10 ลิตร
- 3) ทำการ challenge ให้ตัวอย่างกุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอในแต่ละระยะ (ระยะที่ 1-4) ติดเชื้อไวรัสโดยผ่านทางน้ำ แบ่งตัวอย่างกุ้งที่ challenge ออกเป็น 10 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ challenge ด้วยเชื้อไวรัส YHV

กลุ่มที่ 1 หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอครบ 7 วัน

กลุ่มที่ 2 หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอครบ 14 วัน

กลุ่มที่ 3 หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอครบ 21 วัน

กลุ่มที่ 4 หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอครบ 28 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มควบคุมโดยกุ้งไม่ได้รับสารพญายอ

กลุ่มที่ challenge ด้วยเชื้อไวรัส SEMBV

กลุ่มที่ 6 หลังจากกึ่งกินอาหารผสมพญายอครบ 7 วัน

กลุ่มที่ 7 หลังจากกึ่งกินอาหารผสมพญายอครบ 14 วัน

กลุ่มที่ 8 หลังจากกึ่งกินอาหารผสมพญายอครบ 21 วัน

กลุ่มที่ 9 หลังจากกึ่งกินอาหารผสมพญายอครบ 28 วัน

กลุ่มที่ 10 กลุ่มควบคุมโดยกึ่งไม่ได้รับสารพญายอ

หมายเหตุ : ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 18 ตัวอย่าง/treatment

การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอในการป้องกันโรคไวรัส เมื่อกึ่งได้รับสารสกัดพญายอจากการกินอาหารที่ผสมสารเข้าไปในระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.1, และ 1 g/kg โดยกินติดต่อกันเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เมื่อครบแต่ละระยะมีการ challenge กึ่งด้วยเชื้อไวรัสตามวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว จากนั้นจึงเลี้ยงกึ่งไว้ในตู้ทดลองต่อไปเป็นเวลานาน 14 วัน ตลอดเวลาหลังจากการ challenge ได้มีการตรวจสอบอาการป่วย หรือผิดปกติของกึ่ง หรือการเปลี่ยนแปลงภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ และบันทึกอัตราการตายทุก 3 ชั่วโมง จนกว่าจะจบการทดลอง พร้อมกันนั้นได้เก็บตัวอย่างกึ่งจากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์และระบบเนื้อเยื่อของตัวอย่างกึ่งต่อไป

1.2.2 การศึกษาผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอต่อกึ่งกุลาดำ

เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลในการศึกษาถึงผลข้างเคียงของการใช้สารสกัดพญายอที่มีต่อกึ่งกุลาดำ ซึ่งอาจจะเกิดผลกระทบในทางบวกและ/หรือลบ ทำให้ระบบการทำงานของอวัยวะในระบบต่างๆ ในตัวกึ่งเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ และอาจมีผลถึงสุขภาพของกึ่งด้วย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงผลกระทบของสารสกัดพญายอที่จะมีต่อระบบการทำงานและองค์ประกอบทางชีวที่สำคัญในตัวกึ่ง ได้แก่

- ระบบภูมิคุ้มกัน
- ระบบเนื้อเยื่อภายในตัวกึ่ง

1.2.2.1 ผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งกุลาดำ

1.2.2.1.1 การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยขบวนการ phagocytosis

1.2.2.1.2 การจับตัวและตกตะกอนของเลือดขาวกับสิ่งแปลกปลอม (Agglutinin)

1.2.2.1.1 การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยขบวนการ phagocytosis (โดยวิธี in vivo)

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) ผสมสารสกัดพญายอในอาหารเม็ดสำเร็จรูป และให้กึ่งกินวันละ 2

- มือ เข้า (8.00 น.) กลางวัน (13.00 น.) และเย็น (16.00 น.) ในอัตรา 3 % ของน้ำหนักกุ้ง
- 2) หลังจากกุ้งได้รับสารสกัดโดยวิธีกิน ติดต่อกันตามกำหนด 7, 14, 21 และ 28 วัน จึงเริ่มตรวจสอบความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็นระยะๆ ตามกำหนด โดยวิธีการต่อไปนี้
- 3) ฉีด latex bead เข้าสู่ตัวกุ้งในปริมาณ 10^7 cell/ml โดยใช้อัตราฉีด 0.1 ml/ตัว
- 4) หลังจากฉีด latex bead เข้าตัวกุ้งเป็นเวลา 30 นาที จึงดูดเลือดกุ้ง ออกมาผสมกับ 2.5 % L-cystein ในอัตรา 1:1
- 5) ล้างเม็ดเลือดด้วย Lobster Hemolymph Medium (LHM) จำนวน 3 ครั้ง
- 6) เจือจางเม็ดเลือดด้วย LHM ให้ได้ปริมาณ 10^6 cell/ml
- 7) นำเลือดไป smear บนแผ่นสไลด์แก้วที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งใน อุณหภูมิห้องนาน 45 นาที
- 8) ล้างเม็ดเลือดบนแผ่นแก้วสไลด์ด้วย LHM 1 ครั้ง
- 9) ย้อมด้วยสี Giemsa
- 10) นำไปนับจำนวนเม็ดเลือดรวมทั้งหมด 400 cell/ตัวอย่างกุ้ง 1 ตัว
- 11) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดที่ห่อหุ้ม bead และคิดเป็น % ของเซลล์ที่สามารถ phagocytosis
- 12) นำค่า % phagocytosis และ phagocytosis index ที่ได้ไปวิเคราะห์ ผลทางสถิติ เพื่อหาความแตกต่างในแต่ละความเข้มข้นของเลือด โดยวิธี ANOVA test

หมายเหตุ : ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 20 ตัวอย่าง/treatment

การตรวจสอบขบวนการ phagocytosis โดยวิธี in vitro

หลังจากให้กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ตามกำหนดแล้ว จึงดำเนินการตรวจสอบดังนี้

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) ดูดเลือดจากแ่งเลือดของกุ้งทดลองปริมาณ 0.2 ml/ตัวอย่าง
- 2) ผสมเลือดกับ 0.5% L-cystein ใน LHM ปริมาณ 0.8 ml
- 3) นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที

- 4) ล้างเม็ดเลือดด้วย LHM จำนวน 2 ครั้ง
- 5) เติม latex bead จำนวน 10^7 cell/ml ลงไปในหลอดบรรจุเลือด ด้วยปริมาณ 0.1 ml/หลอด
- 6) นำเลือดในหลอดมา smear บนแผ่นสไลด์ให้ทั่ว แล้ว fix ด้วย glutaraldehyde
- 7) ย้อมด้วยสี diff quick
- 8) นำไปนับจำนวนเม็ดเลือดรวมทั้งหมด 400 cell/กึ่ง 1 ตัวอย่าง
- 9) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดที่ห่อหุ้ม latex bead และคิดเป็น % ของเซลล์ที่สามารถ phagocytosis

หมายเหตุ : ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 18 ตัวอย่าง/treatment

1.2.2.1.2 การจับตัวและตกตะกอนของเลือดขาวกับสิ่งแปลกปลอม (Agglutinin)

หลังจากกึ่งได้รับสารสกัดโดยวิธีกั้นติดต่อกันตามกำหนด 7, 14, 21 และ 28 วัน จึงเริ่มตรวจสอบความสามารถการจับตัวและตกตะกอนของเม็ดเลือดขาวกับสิ่งแปลกปลอม (Agglutinin) เป็นระยะๆ ตามเวลาที่กำหนดข้างต้น

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) ดูดเลือดจากแอ่งเลือดของกึ่งทดลองปริมาณ 0.2 ml/ตัวอย่าง
- 2) ผสมเลือดกับ 0.5% L-cystein ใน LHM ปริมาณ 0.8 ml
- 3) นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที
- 4) แยกน้ำใสส่วนบน (supernatant) ออกมา 0.1 ml
- 5) นำน้ำใสส่วนบนไปเจือจางด้วย Tris buffer saline (TBS) ใน well ของ microtitre plate ชนิดกันชนขนาด 96 well ด้วยวิธี two fold dilution
- 6) นำเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (reference strain) ในปริมาณ 10^8 cell/ml (วัด OD=0.1 ที่ช่วงคลื่น 540 nm) เติมลงไป ใน well ปริมาณ 0.1 μ /well ทุกๆ well โดย well ชุดควบคุมเติม TBS ที่ไม่ผสมน้ำเลือดกึ่งกลาดำลงไปแทน
- 7) ตรวจสอบการจับตัวและตกตะกอนของเลือดกึ่งกับ *E. coli* ใน well แต่ละหลุม และอ่านผลออกมาเป็น dilution titre

- 1.2.2 ผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอที่มีต่อระบบเนื้อเยื่อภายในตัวกุ้ง ได้แก่ ตับ และตับอ่อน (hepatopancreas) กระเพาะ (stomach) และลำไส้ส่วนกลาง (midgut)

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) ให้กุ้งได้รับสารสกัดพญายอโดยการกินอาหารผสมสารสกัดในอัตราความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg วันละ 2 มื้อ เช้า, เย็น โดยให้กินติดต่อกันทุกวัน
- 2) เก็บตัวอย่างกุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอในแต่ละกลุ่มความเข้มข้นทุกๆ 7 วัน/ครั้ง โดยเก็บครั้งละ 3 ตัว/กลุ่ม
- 3) นำตัวอย่างกุ้งไปดองในน้ำยา davidson โดยการฉีดน้ำยาตอกลงเข้าตัวกุ้งจนน้ำยาซึมเข้าสู่อวัยวะต่างๆ อย่างทั่วถึง
- 4) นำไปดองต่อในน้ำยา davidson นาน 24 ชั่วโมง
- 5) เปลี่ยนน้ำยา davidson เป็น 70 % alcohol แขนาน 24 ชั่วโมง
- 6) ตัดชิ้นส่วนของอวัยวะตับและตับอ่อน, กระเพาะ, และลำไส้ เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1x1x1 ซม.
- 7) นำไปผ่านขบวนการดูดยน้ำออก (dehydrate)
- 8) infiltrate ด้วย paraffin
- 9) embed เนื้อเยื่อลงบนแท่ง paraffin
- 10) นำไปตัดเป็นชิ้นบางประมาณ 5 micron ด้วย microtome
- 11) ย้อมเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Bell & Lightner, 1988
- 12) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงกำลังขยายสูง

1.2.3 กิจกรรมที่ดำเนินการทดสอบเพิ่มเติม

ตามที่กรรมการที่ปรึกษา และติดตามผลโครงการได้มีความเห็นให้ คณะวิจัยดำเนินการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลมาสนับสนุนผลงานวิจัยในงวดที่ 1 (1 มกราคม - 30 มิถุนายน 2540) ได้แก่

1.2.3.1 การใช้ CN antibody probe ที่ผลิตขึ้นตรวจวัดปริมาณสารสกัดพญายอเข้มข้น 1 และ 10 ug/ml ที่ละลายในน้ำทะเลความเค็ม 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30 ppt โดยตรวจ

สอบความเข้มข้นของสารสกัดที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นระยะๆ ตั้งแต่วันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังจากสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเล

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1) การเตรียมน้ำทะเล

ใช้น้ำทะเลที่ผ่านระบบกรอง (sand filter) มาจากโรงเพาะฟักกุ้งกุลาดำ วัดความเค็มด้วยเครื่องมือ salinometer ระบบหักเหแสง แล้วจึงปรับความเค็มด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเค็ม 3 ระดับคือ 10, 20 และ 30 ส่วนในพัน (ppt) เสร็จแล้วจึงนำไปบรรจุในหลอดทดลองที่เตรียมไว้หลอดละ 20 ml จำนวนระดับความเค็มละ 6 หลอด และนำไปนึ่งอบความดันเพื่อทำให้ปลอดเชื้อปนเปื้อน

2) การเตรียมสารละลายพญายอ

นำสารสกัดพญายอมาชั่งน้ำหนัก และเติมลงไปในหลอดน้ำทะเลที่เตรียมไว้ โดยให้ความเข้มข้นของสารสกัดที่จะละลายในน้ำทะเล อยู่ในระดับ 1 mg/ml และ 10 mg/ml จำนวนความเข้มข้นละ 3 ขั้ว นำไปปั่นผสมด้วย vortex mixer จนสารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเริ่มนับเวลาจนครบตามกำหนดที่จะตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารสกัดที่ละลายในน้ำทะเล คือ 1, 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

3) การตรวจวัดปริมาณสารสกัดพญายอ

การตรวจวัดปริมาณสารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับความเค็ม ด้วย antibody probe โดยอาศัยวิธี ELISA มีขั้นตอนดังนี้

3.1) เก็บตัวอย่างสารสกัดพญายอที่ละลายในน้ำทะเลแต่ละการทดลอง มาเคลือบใน well ของ microtitre plate ชนิดก้นมน ขนาด 96 well ปริมาณ 100 ul แล้วเติม bicarbonate buffer ลงไปใน well ด้วยปริมาณเท่ากัน (1:1)

3.2) นำ microtitre plate ที่เคลือบด้วยสารละลายพญายอ และ bicarbonate buffer ไปใส่ในกล่องรักษาความชื้น ปิดฝาไว้แล้วนำไปบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

3.3) ล้างสารละลายพญายอจาก well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย Low salt water (LSW)

3.4) เติม post-coat solution (3 % BSA) ปริมาณ 250 ul/well

3.5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

3.6) ล้าง well จำนวน 3 ครั้ง ด้วย LSW

3.7) เติม CN-Rabbit antiserum ที่เจือจางในระดับ 1:100 เป็นปริมาณ 100 ul/well

- 3.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.9) ล้าง well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย High salt water (HSW)
- 3.10) เติมสารละลาย conjugate ลงไปในปริมาณ 100 ul/well
- 3.11) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.12) ล้าง well จำนวน 5 ครั้ง ด้วย HSW
- 3.13) เติม substrate solution ในปริมาณ 100 ul/well
- 3.14) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 3.15) หยุดปฏิกิริยาของสารใน well ด้วย 2M H₂SO₄ ในปริมาณ 100 ul/well
- 3.16) นำ microtitre plate ไปอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA- Reader ที่ช่วงคลื่น 450 nm.

1.2.3.2 การตรวจสอบปริมาณสารสกัดพญายอในกึ่งที่ได้รับสารโดยการผสมอาหารให้กิน และโดยการป้อน

มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบอัตราการดูดซึมความคงตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งที่ได้รับสารจนกว่าจะไม่สามารถตรวจพบสารพญายอได้ (สนับสนุนผลงานวิจัยงวดที่ 1 กิจกรรมที่ 1.1 ข้อ 1.1.2)

1.2.3.2.1 การตรวจสอบปริมาณสารสกัดพญายอในกึ่งที่ได้รับสารโดยผสมอาหารให้กิน

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) เตรียมสารสกัดพญายอให้อยู่ในรูปของสารละลายในอัตราความเข้มข้น 100 mg/ml
- 2) พ่นสารละลายพญายอลงบนอาหารเม็ด จำนวน 100 g โดยให้สารละลายพญายอเคลือบอาหารจนทั่วทุกเม็ด ผึ่งไว้ให้แห้งสักครู่
- 3) เคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันหมึกจนทั่วถึงกัน แล้วผึ่งไว้ให้แห้ง
- 4) ให้กึ่งได้รับอาหารผสมสารสกัดพญายอ โดยวิธีกิน 2 มื้อ/วัน เช้า 8.00 น. และ เย็น 16.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงหยุดให้สารสกัด และเปลี่ยนเป็นอาหารปกติ
- 5) ดูดเลือดกึ่งมาตรวจสอบระดับสารสกัดพญายอในเลือดเป็นระยะๆ ตั้งแต่ 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง หลังจากกึ่งกินอาหารมื้อแรกของวันแรก โดยวิธี ELISA

- 6) ตรวจสอบระดับสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งต่อไปทุกวัน
จนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบสารสกัดพญายอในเลือดได้

1.2.3.2.2 การตรวจสอบปริมาณสารสกัดพญายอในกุ้งที่ได้รับสารโดยการป้อน อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) เตรียมสารสกัดพญายอในรูปสารละลายเข้มข้น 30 mg/ml
ค่อยๆ ป้อนเข้าปากตัวอย่างกุ้ง (เมื่อกุ้งเปิดปาก) โดยปล่อย
สารละลายให้ไหลไปตามสายยางที่ต่อปลายด้วยเข็มฉีดยา
ที่ละน้อย
- 2) ป้อนสารละลายพญายอในอัตรา 0.3 ml/ตัว ในกรณีที่เห็นว่า
กุ้งพ่นหรือคายสารออกมาให้เปลี่ยนตัวอย่างใหม่ โดยป้อน
ตัวละ 1 ครั้ง ในอัตราเดียว
- 3) ตรวจสอบปริมาณสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งเป็นระยะๆ
ตั้งแต่ 0, 30 นาที 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง จนกว่า
จะตรวจไม่พบสารสกัดในเลือดต่อไป (ตรวจสอบด้วยวิธี ELISA)

หมายเหตุ : การตรวจสอบแต่ละชุดทำ 10 ซ้ำ แล้วจึงนำผลที่อ่านได้มาหาค่าเฉลี่ย

2.2. ผลงาน

2.2.1 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพญายอที่ใช้ผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อ
ป้องกันการติดเชื้อไวรัส YHV และ SEMBV

2.2.1.1 การป้องกันโรคติดเชื้อไวรัส YHV

การทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอในการป้องกันโรคหัวเหลืองที่เกิด
จากเชื้อไวรัส YHV โดยการผสมสารสกัดพญายอกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้กุ้งกินวันละ 2 มื้อ ติด
ต่อกันทุกวันเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 8 ซึ่งปรากฏว่าหลังจากกุ้ง
กินอาหารผสมสารสกัดพญายอในระดับความเข้มข้นใน 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกัน
เป็นเวลา 7 วัน กุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดพญายอจะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้กินสารสกัด
จำนวนร้อยละ 33.04, 42.59 และ 7.40 ตามลำดับ โดยสารสกัดพญายอมีประสิทธิภาพในการ
ช่วยให้กุ้งสามารถป้องกันโรคไวรัส YHV ได้ในอัตราร้อยละ 44.91, 56.10 และ 9.75 ตามลำดับ
เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างกุ้งในกลุ่มที่ไม่ได้กินอาหารผสมสารสกัดพญายอ ซึ่งมีอัตราการตาย
สูงถึงร้อยละ 75.92 หลังจากถูก challenge ด้วยเชื้อไวรัส YHV

กลุ่มกุ้งกุลาดำที่ถูก challenge หลังจากกินอาหารผสมสารสกัดพญายอเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกันนาน 14 วัน มีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกับตัวอย่างกุ้งกุลาดำกลุ่มแรก คือ 44.45, 50.01 และ 37.05% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารสกัดจากการกินอาหารมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 27.78% เท่านั้น กุ้งที่ได้กินสารสกัดในกลุ่มนี้สามารถคุ้มกันการติดเชื้อโรคไวรัส YHV ได้ ในอัตรา 23.08, 30.77 และ 12.83% ตามลำดับ

สำหรับกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับการ challenge หลังจากกินอาหารผสมสารสกัดพญายอในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกันเป็นเวลานาน 21 วันนั้น มีอัตราการรอดชีวิตในระดับ 42.60, 35.19 และ 37.04% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มตัวอย่างกุ้งที่ไม่ได้กินอาหารผสมสารสกัดพญายอมีอัตราการรอดตายเพียง 29.64% และกุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอ มีความสามารถคุ้มกันการติดเชื้อโรคไวรัส YHV ได้ร้อยละ 18.42, 7.89 และ 10.52 ตามลำดับ เมื่อกุ้งได้กินอาหารผสมสารสกัดพญายอติดต่อกันเป็นเวลานาน 28 วัน กุ้งแต่ละชุดจะมีอัตราการรอดชีวิตจากการ challenge เชื้อไวรัส YHV เป็นจำนวนร้อยละ 25.01, 30.56 และ 41.67 โดยมีความสามารถคุ้มกันการติดเชื้อ YHV ได้ร้อยละ 18.18, 24.24 และ 36.36 ตามลำดับ

จากผลการทดลองครั้งนี้ จะเห็นว่ากุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0.01 และ 0.1 g/kg อาหาร เป็นระยะเวลา 7 วัน จะมีความคุ้มกันโรคอยู่ในระดับสูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆ

2.2.1.2 การป้องกันติดเชื้อไวรัส SEMBV

ตารางที่ 9 แสดงประสิทธิภาพการคุ้มกันการติดเชื้อไวรัส SEMBV ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญายอ โดยผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้กินในอัตรา 0.01, 0.1 และ 1 g ต่ออาหาร 1 kg โดยมีกลุ่มควบคุมกินอาหารเม็ดปกติที่ไม่ได้ผสมสารสกัดพญายอ เมื่อกุ้งกุลาดำกินอาหารผสมสารสกัดพญายอติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และถูก challenge ด้วยเชื้อไวรัส SEMBV ปรากฏว่ากุ้งที่กินสารสกัดมีอัตราการรอดชีวิต 16.67, 50.00 และ 30.56% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กินอาหารผสมสารสกัดพญายอ มีอัตราการรอดชีวิต 19.45% เมื่อนำค่าที่ตรวจพบได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคไวรัสชนิดนี้ ปรากฏว่า กุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดพญายอ 0.01 g/kg อาหาร ไม่สามารถคุ้มกันการติดเชื้อได้ โดยมี Relative percent survival (RPS)-3.45 ส่วนกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดในปริมาณ 0.1 และ 1 g/kg อาหาร มี RPS 37.93 และ 13.79 ตามลำดับ

กุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดในระยะที่ 2 คือ เมื่อครบ 14 วัน แล้วจึง challenge เชื้อไวรัสปรากฏว่า มีอัตราการรอดชีวิต 19.45, 16.67 และ 39.89% ตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 8.34% เท่านั้น และ RPS มีค่า 12.12, 9.09 และ 33.33 ตามลำดับ กลุ่มกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดพญายอต่อไปจนครบเวลา 21 วัน ปรากฏ ว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดมีอัตราการรอดชีวิต 58.34,

47.24 และ 55.56% และมีค่า RPS อยู่ในระดับ 34.79, 17.39, 30.44 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ร้อยละ 36.11 ตัวอย่างกึ่งที่ได้รับสารสกัดโดยผสมในอาหารให้กินนาน 28 วัน ติดต่อกัน มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในระดับร้อยละ 44.45, 16.71 และ 50.00 และคำนวณค่า RPS ได้ 16.66, -2.49 และ 24.99 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างกึ่งในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 33.34 ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างกึ่งที่กินอาหารผสมสารสกัดพญาขอในระดับ 0.1 g/kg อาหาร

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณสารสกัดพญาขอในระดับ 0.1 g ที่ผสมกับอาหารเม็ด สำเร็จรูป 1 kg ให้กึ่งกินติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ช่วยให้กึ่งสามารถรอดชีวิตจากการ challenge เชื้อไวรัส SEMBV ถึง 50% โดยมีค่า RPS ที่ 37.93 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ ทั้งหมด

2.2.2 ผลข้างเคียงของสารสกัดพญาขอที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งกุลาดำ

2.2.2.1 การกำจัดสิ่งแปลกปลอม (antigen) โดยขบวนการ phagocytosis (in vitro) ในระบบเลือดของกึ่งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญาขอ โดยผสมสารอาหารให้กินในปริมาณ เข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร เมื่อกึ่งทดลองได้กินอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน แสดง ผลอยู่ในตารางที่ 3 ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เลือดในกึ่งทดลองมี ค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) คือกึ่งที่ได้รับสารสกัดในปริมาณ 0.1 g/kg อาหาร จะมี เปอร์เซ็นต์ของเซลล์เลือดที่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมจำนวน 36.64 และ 14.81 ซึ่งน้อยกว่า กลุ่มควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เลือดที่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้สูงถึง 52.83 และ 19.35 ส่วนตัวอย่างกึ่งในกลุ่มอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างของค่า phagocytosis ทางสถิติ

กึ่งที่ได้กินอาหารผสมสารสกัดพญาขอในปริมาณ 0.01 และ 0.1 g/kg อาหาร ติดต่อกัน ครบ 14 วัน ในการทดลองครั้งที่ 1 มีค่า phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยมีค่าแตกต่างกัน ทางสถิติ ($P < 0.05$) และกึ่งที่กินอาหารที่มีสารสกัดพญาขอปริมาณ 1 g/kg อาหาร มีค่า phagocytosis ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 ปรากฏว่า กึ่งที่กิน อาหารผสมสารสกัดพญาขอในปริมาณ 0.1 g/kg อาหาร มีค่า phagocytosis ไม่แตกต่างกันทาง สถิติกับกลุ่มควบคุม สำหรับกึ่งทดลองในกลุ่มอื่นมีค่า phagocytosis แตกต่างกันทางสถิติกับ กลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1 แสดงขบวนการ phagocytosis ในเลือดกึ่งของกลุ่มที่ได้รับสารพญาขอ)

กึ่งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดผสมกับอาหารในปริมาณต่างๆ กัน นาน 21 วัน ติดต่อกัน จะ ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติของค่า phagocytosis แต่อย่างใด โดยผลเฉลี่ยของการกำจัด สิ่งแปลกปลอมในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 มีค่าอยู่ในระหว่าง 47.42-61.95 และ 27.59-33.55 ตาม ลำดับ

เมื่อกึ่งได้รับการให้อาหารผสมสารสกัดพญาขอเป็นเวลา 28 วัน กลุ่มกึ่งที่กินอาหารซึ่งมี สารสกัดผสมในปริมาณ 0.1 และ 1 g/kg จะมีค่า phagocytosis ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จะ

แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 ปรากฏว่า ไม่มีผลกระทบต่อขบวนการ phagocytosis ในตัวกึ่ง โดยกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองมีความสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ในช่วงเท่าๆ กัน คือตั้งแต่ 33.41-40.40

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งในด้านขบวนการ phagocytosis โดยใช้วิธีตรวจสอบขบวนการในตัวกึ่ง (in vivo) ซึ่งคณะวิจัยได้พัฒนาวิธีการให้ดียิ่งขึ้นกว่าการตรวจสอบแบบ in vitro ในระยะที่ 1 หลังจากกึ่งกินอาหารได้ครบ 7 วัน ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในเลือดกึ่งในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมทุกๆ กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอนาน 14 วัน กลุ่มกึ่งที่ได้รับสารสกัดในปริมาณ 0.1 g/kg มีค่า phagocytosis แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มอื่นๆ ทั้งหมด กลุ่มกึ่งทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดพญายอนาน 21 วัน แสดงค่า phagocytosis ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มทุกๆ กลุ่ม และเมื่อกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอต่อไปจนครบ 28 วัน กลุ่มกึ่งทดลองที่ได้รับสารสกัดปริมาณ 0.01 g/kg อาหาร จะมีค่า phagocytosis ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ และมีความแตกต่างกับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.2.2.2 การจับตัวและตกตะกอน(agglutinin) ของเลือดขาวกับสิ่งแปลกปลอม (antigen) ในกึ่งกุลาดำ

การศึกษาผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นในระบบภูมิคุ้มกันด้านของกึ่งกุลาดำที่กินอาหารผสมสารสกัดพญายอในด้านความสามารถในการจับตัวและตกตะกอนกับสิ่งแปลกปลอมของเลือดกึ่งได้แสดงผลการตรวจสอบไว้ในตารางที่ 12 การตรวจสอบครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 หลังจากกึ่งกินอาหารครบ 7 วันแล้ว ปรากฏว่า ค่า agglutinin ในเลือดกึ่งของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพญายอทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อกึ่งกินอาหารผสมสารสกัดพญายอต่อไปจนครบ 14 วัน ค่า agglutinin ในกึ่งที่ได้รับสารสกัดปริมาณ 0.01 และ 0.1 g/kg อาหาร จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดปริมาณ 1 g/kg อาหาร แต่ในการทดลองครั้งที่ 2 กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม กลับแสดงค่าที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การตรวจสอบกลุ่มตัวอย่างกึ่งที่กินอาหารครบกำหนด 21 วัน ปรากฏว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลกระทบต่อความสามารถในการ agglutinin ของกึ่งเลย สำหรับตัวอย่างกึ่งที่ได้รับสารสกัดพญายอที่ผสมในอาหารติดต่อกันนาน 28 วัน ปรากฏว่า ในการทดลองครั้งที่ 1 กึ่งที่กินอาหารผสมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0.01 และ 0.1 g/kg จะมีค่า agglutinin ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดปริมาณ 1 g/kg ผลการทดลองครั้งที่ 2 ปรากฏว่า กึ่งที่

กินอาหารผสมสารสกัดพญายอทุกๆ กลุ่ม มีค่า agglutinin สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 12)

2.2.3 ผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอที่มีต่อระบบเนื้อเยื่อภายในตัวกุ้ง

ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายในอวัยวะที่สำคัญของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญายอโดยผสมกับอาหารให้กินเป็นเวลาติดต่อกัน 7, 14, 21 และ 28 วัน ปรากฏว่ากุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01, 0.1 และ 1 g/kg ติดต่อกันเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ หรือ 21 วัน จะไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นสาเหตุให้มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน ซึ่งจะเห็นได้จากลักษณะของ tubules ที่อัดแน่นอยู่ในสภาพปกติและสม่ำเสมอ โดยมี B-cell F-cell และ R-cell ที่สมบูรณ์แบบไม่แตกต่างกับลักษณะของ cells ในกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด และระหว่าง tubules แต่ละอันจะล้อมรอบด้วย myoepithelial cells และ myoepithelial layer ซึ่งแทรกด้วยแองเกล็ด (sinus) ที่มีเม็ดเลือด (hemocyte) บรรจุอยู่ภายในอย่างปกติทุกๆ กลุ่ม ส่วนการตรวจสอบผลข้างเคียงที่มีต่อระบบเนื้อเยื่อในทางเดินอาหารพบว่า stomach epithelium และ midgut caecum ของกลุ่มกุ้งที่ได้รับสารสกัดพญายอในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 g/kg ติดต่อกันเป็นเวลานาน 21 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางผิดปกติแต่อย่างใด เมื่อเทียบกับลักษณะเนื้อเยื่อของกลุ่มควบคุม ยกเว้นเมื่อกุ้งทดลองได้รับสารสกัดเข้มข้น 1 g/kg เป็นเวลานาน 28 วัน จะพบว่าเกิดอาการผิดปกติขึ้นในเนื้อเยื่อชั้น mucosa epithelium โดยเนื้อเยื่อส่วนนี้จะแยกออกจากส่วนของ circular layer

2.2.4 กิจกรรมที่ดำเนินการทดสอบเพิ่มเติม

2.2.4.1 ผลของการใช้ CN antibody probe ตรวจวัดปริมาณสารสกัดพญายอเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ละลายในน้ำทะเลระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

หลังจากที่สารสกัดพญายอละลายในน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับที่เตรียมไว้แล้ว จึงได้ตรวจสอบปริมาณสารที่ละลายอยู่ในน้ำทะเล และพบว่า ในน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt สารสกัดพญายอเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ จะละลายได้ดีและละลายได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในความเค็ม 20 และ 30 ppt โดยสามารถตรวจพบในระดับ 1 และ 10, 0.984 และ 10 กับ 0.897 และ 9.987 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 สารละลายพญายอจะสลายตัวไปเล็กน้อย ทำให้มีปริมาณสารต่ำลงเป็น 0.99 และ 9.78, 0.96 และ 9.44 กับ 0.80 และ 9.00 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ จนเมื่อสารพญายอละลายในน้ำทะเลอยู่นานติดต่อกันเป็นเวลา 9 วัน สารสกัดพญายอเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ที่ละลายในน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับความเค็ม จะสลายตัวไปหมด โดยไม่สามารถจะตรวจสอบปริมาณได้ด้วยวิธีการ

ใช้ CN antibody probe สำหรับสารสกัดพญายอเข้มข้น 10 µg/ml ยังสามารถตรวจพบได้ แม้ว่า จะละลายในน้ำทะเลทั้ง 3 ระดับความเค็มเป็นเวลานานถึง 9 วันแล้ว โดยมีปริมาณที่ตรวจได้ใน ระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt ตามลำดับ ดังนี้ 2.010, 1.823 และ 1.008 µg/ml (ตารางที่ 13)

2.2.4.2 อัตราการสลายตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้ง เมื่อให้สารโดยการ ป้อนด้วยความเข้มข้น 30 µg/ml อัตรา 0.3 ml/ตัว

ผลการตรวจสอบอัตราการสลายตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งด้วยการใช้ CN antibody probe โดยการให้สารสกัดพญายอด้วยวิธีป้อนสารเข้มข้น 30 µg/ml ในอัตรา 0.3 ml/ตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 14 พบว่า หลังจากป้อนสารละลายพญายอเข้าปากกุ้งไปแล้ว เจาะเลือดกุ้งออกมาตรวจทันที สามารถตรวจพบปริมาณสารสกัดในเลือดได้ 270.06 µg/ml และ เมื่อทิ้งไว้อีก 30 นาที จะพบว่า สารสกัดได้เข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น โดยตรวจพบในปริมาณ 298.99 µg/ml หลังจากนั้นปริมาณสารพญายอในเลือดกุ้งทดลองจะลดลงไปเรื่อยๆ โดยในชั่วโมง ที่ 1, 3, 6, 9, 12 และ 15 จะตรวจพบสารพญายอในปริมาณ 254.98, 256.67, 187.26, 184.34, 75.84 และ 58.29 ตามลำดับ จนกระทั่งเมื่อกุ้งได้รับสารสกัดพญายอโดยการป้อนในอัตราข้างต้น เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมงแล้ว จะไม่สามารถตรวจพบสารพญายอในเลือดกุ้งตัวอย่างได้โดยการใช้ CN antibody probe อีกต่อไป

2.2.4.3 อัตราการสลายตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งเมื่อให้สารโดยการผสม อาหารให้กินด้วยความเข้มข้น 100 µg/ml/อาหาร 100 g อัตราให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัวอย่าง กุ้ง กิน 3 มื้อ เช้า กลางวัน และเย็น

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสารสกัดพญายอที่ตรวจพบในเลือดกุ้งกุลาดำหลังจากติดต่อกัน 5 วัน โดยตรวจสอบได้รับสารโดยการกินอาหารผสมสารสกัดพญายอเข้าไปเป็นเวลา 1-192 วัน หรือ ตั้งแต่ 1 ชั่วโมง จนถึง (8 วัน) ซึ่งพบว่าในช่วง 3 ชั่วโมงแรกหลังจากกุ้งได้รับสารสกัดโดยการ ผสมอาหารให้กินในมื้อแรก จะไม่สามารถตรวจพบสารพญายอในตัวอย่างกุ้งที่ทดลองได้เลย จน เมื่อเวลาผ่านไปได้ 5 ชั่วโมง จึงสามารถตรวจพบสารพญายอในเลือดได้ในปริมาณ 6.89 µg/ml และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 7 ปริมาณสารพญายอที่ตรวจพบในเลือดกุ้งจะเพิ่มขึ้นเป็น 54.14 µg/ml วันที่ 2 ของการทดลองจะสามารถตรวจพบปริมาณสารพญายอในเลือดกุ้งได้สูง 176.34 µg/ml และ ปริมาณสารพญายอจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 5 ปริมาณสารจะขึ้นสูงสุดถึง 243.59 µg/ml เมื่อ หยุดให้อาหารผสมสารสกัดแล้ว (วันที่ 6) ปริมาณสารพญายอในเลือดกุ้งจะลดลงเหลือ 146.65

µg/ml และตรวจในวันที่ 7 พบสารพญาขอในเลือดเหลือเพียง 39.67 µg/ml หลังจากเลี้ยงกุ้งต่อไปได้ 8 วัน จะไม่สามารถตรวจพบสารพญาขอในเลือดกุ้งทดลองได้โดยใช้ CN antibody probe อีกต่อไป

3.2 สรุปและวิจารณ์ผล

กิจกรรมที่ 1.2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพญาขอที่ใช้ผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส YHV และ SEMBV

ผลจากการทดลองในกิจกรรมนี้ แสดงให้เห็นว่า การให้สารสกัดพญาขอแก่กุ้งโดยผสมอาหารให้กินติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 7 วัน กุ้งที่ได้รับสารพญาขอในอัตราความเข้มข้น 0.1 g ต่ออาหาร 1 kg จะสามารถคุ้มกันการติดเชื้อไวรัส YHV ได้สูงที่สุด โดยคิดเฉลี่ยค่า RPS ได้ 55.94 เมื่อกุ้งกินอาหารผสมพญาขอติดต่อกันไปนาน 14 วัน ค่า RPS จะลดลงเหลือ 30.77 และความสามารถในการคุ้มกันโรคไวรัส YHV จะลดลงต่ำสุดในระยะที่ 3 คือ เมื่อกุ้งได้รับสารพญาขอรวม 21 วัน ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดพญาขอที่ผสมกับอาหารในอัตรา 1 และ 0.01 g/kg อาหารนั้นให้ผลการคุ้มกันโรคได้ต่ำกว่า และระยะเวลาการให้อาหารผสมสารสกัด ควรจะอยู่ในช่วง 7 วัน/ครั้ง ซึ่งนอกจากจะประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารสกัดพญาขอแล้ว ยังประหยัดเวลาในการเตรียมอาหาร ตลอดจนจะไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงจากการสะสมของสารพญาขอในเลือดกุ้งอีกด้วย

สำหรับการให้สารสกัดพญาขอโดยผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส SEMBV นั้น ปรากฏผลคล้ายกันกับการให้อาหารผสมสารสกัดเพื่อป้องกันไวรัส YHV กล่าวคือ อัตราที่เหมาะสมของสารสกัดที่จะใช้ผสมกับอาหารให้กุ้งกิน ควรจะอยู่ที่ 0.1 g/kg ซึ่งจะให้ผลในการคุ้มกันโรคหวั่นเหลือได้สูงที่สุด เมื่อให้กุ้งกินอาหารผสมพญาขอติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน เพราะหลังจากนั้น ความสามารถในการคุ้มกันการติดเชื้อ SEMBV จะต่ำลง และให้ผลไม่แน่นอน แม้ว่าอัตราสาร 1 g/kg จะให้ผลคุ้มกัน SEMBV ได้ดี แต่ผลกระทบที่เกิดขึ้นกับกุ้งที่ได้รับสารนานเกิน 21 วัน ควรจะนำมาพิจารณา

การผสมสารสกัดพญาขอในอัตราที่สูงกว่า 0.1 g/kg อาหาร เป็นปริมาณ 10 เท่า (1 g/kg) นั้น เมื่อกุ้งกินเข้าไปติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจจะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อในทางเดินอาหารจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพขึ้นในกุ้งบางกลุ่ม (ภาพที่ 4) ซึ่งอาจทำให้กุ้งกลุ่มนั้นไม่สามารถไปคุ้มกันโรคได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อให้กุ้งกินอาหารผสมสารสกัดพญาขอติดต่อกันเป็นเวลานานเกินกว่า 7 วันขึ้นไป ผลของการคุ้มกันโรคไวรัสจะแปรปรวนไปโดยบางครั้งจะสามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสดีและบางครั้งก็ต่ำลง ให้ผลไม่แน่นอน ส่วนความเข้มข้นของสาร

สัปดาห์สุดท้ายที่ใช้ผสมกับอาหารในปริมาณ 0.01 g/kg นั้น นับว่าเป็นปริมาณที่ต่ำมาก จึงอาจทำให้กิ้งไม่ได้รับสารสกัดเข้าไปในตัวได้เท่ากับปริมาณที่กำหนดไว้ เนื่องจากกิ้งเป็นสัตว์น้ำที่กินอาหารแบบแทะกินทีละน้อย สารสกัดที่เคลือบบนเม็ดอาหารในปริมาณต่ำอยู่แล้ว อาจจะไม่ละลายไปในน้ำบางส่วนก่อนที่จะกินอาหารหมดเม็ดแต่ละเม็ด ดังนั้นควรจะมีการศึกษาและพัฒนาการให้สารสกัดพญายอโดยผสมอาหารให้กิ้งกิน เพื่อให้กิ้งได้รับสารสกัดจากอาหารได้มากที่สุดเท่าที่ต้องการ ซึ่งอาจจะมีแนวทางพัฒนา 3 ด้าน ดังนี้

- 1) วิธีผสมสารสกัดพญายอในอาหารเม็ด
- 2) ปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดที่กิ้งได้รับแล้วสามารถคุ้มกันโรคได้สูงถึง 60% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
- 3) ระยะเวลาการให้สารสกัดอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

กิจกรรมที่ 1.2.2 ผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอต่อระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งกุลาดำ

จากผลการตรวจสอบผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอ ที่ผสมอาหารให้กิ้งกินเป็นระยะเวลา รวม 28 วัน โดยนำกิ้งขึ้นมาตรวจสอบทุกๆ 7 วันนั้น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพญายอไม่มีผลกระทบต่อทั้งทางบวกและทางลบต่อระบบภูมิคุ้มกันในด้านความสามารถของการกำจัด antigen ของเซลล์เม็ดเลือด และขบวนการจับตัว และตกตะกอนของเลือด กับ antigen แต่อย่างใด เนื่องจากไวรัสเป็นเชื้อโรคที่มีขนาดเล็กมาก และการเข้าไปอาศัยอยู่ในตัว host อยู่ในลักษณะ การเข้าไปอาศัยอยู่เหมือนกับเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์ในร่างกาย ซึ่งเป็นเรื่องยากที่จะศึกษาโดยวิธีทั่วๆ ไป แม้การทดลองในงวดที่ 1 พอจะทราบว่าสารสกัดสามารถลดความรุนแรงของเชื้อลงได้ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า การทำงาน (mechanism) ของสารสกัดพญายอต่อเชื้อไวรัส นั้น เป็นไปในรูปแบบใด ซึ่งควรจะมีการศึกษาวิจัยต่อไป

ผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอที่มีต่อระบบเนื้อเยื่อ

ผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอที่กิ้งได้รับโดยการผสมกับอาหารให้กินด้วยปริมาณเข้มข้น 1 g/kg อาหาร เป็นเวลาติดต่อกันนานเกิน 3 สัปดาห์ หรือ 21 วัน ขึ้นไป ไม่มีผลกระทบต่อระบบอวัยวะภายในที่สำคัญ ซึ่งได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร ตั้งแต่ผ่าน hepatopancrease ลงไปยังลำไส้ตอนบน ตอนกลาง ตลอดไปจนรูกัน (anus) ซึ่งจะเห็นว่าสภาพของเนื้อเยื่อในแต่ละส่วนตลอดทางเดินอาหารจะมีลักษณะปกติเหมือนกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดพญายอ แม้จะให้กิ้งกินสารพญายอนานถึง 28 วัน (ภาพที่ 2-7)

กิจกรรมที่ 1.2.3 อัตราการสลายตัวของสารสกัดพญายอ

1.2.3.1 การสลายตัวของสารสกัดพญายอ เมื่อละลายในน้ำทะเลความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt

1.2.3.2 การสลายตัวของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้ง เมื่อกุ้งได้รับสารโดยการป้อน และการผสมอาหารให้กิน

ผลการตรวจสอบการสลายตัวของสารสกัดพญายอที่ใช้งานในรูปแบบต่างๆ กันโดยวิธีตรวจด้วย CN antibody probe แสดงให้เห็นว่าน้ำทะเลในระดับความเค็มต่ำ จะเป็นตัวทำละลายสารสกัดได้ดีกว่าน้ำทะเลที่มีความเค็มสูง แต่เมื่อสารสกัดละลายตัวไปในน้ำทะเลแล้ว ปริมาณความคงตัวของสารที่เหลืออยู่ จะมีค่าเท่าๆ กัน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สารสกัดปริมาณ 1 µg/ml จะคงตัวอยู่ในน้ำนานประมาณ 7 วัน เท่านั้น และปริมาณที่ตรวจพบในวันที่ 7 ของการละลาย จะอยู่ในระดับต่ำมาก แต่จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคไวรัสของสารสกัดพญายอ 1 µg/ml ที่ละลายในน้ำทะเลความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt ของกิจกรรมในงวดที่ 1 นั้น ปรากฏว่าสารสกัดยังมีประสิทธิภาพในการคุ้มกันโรคไวรัส YHV และ SEMBV ได้ แม้จะอยู่ในสภาพสารละลายไปเป็นเวลา 7 วันแล้ว

ส่วนการป้อนสารสกัดนั้น กุ้งจะได้รับสารได้มากกว่าวิธีแช่และวิธีกินโดยสารสกัดจะเข้าสู่กระแสเลือดกุ้งทันทีหลังจากการป้อน และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในเวลา 30 นาทีหลังการป้อน หลังจากช่วง 30 นาทีไปแล้ว ปริมาณสารที่พบในเลือด จะลดลงตามลำดับจนเมื่อถึง 18 ชั่วโมง จะตรวจไม่พบสารสกัดเลย

แม้ว่าวิธีให้สารโดยการป้อนจะทำให้กุ้งได้รับสารปริมาณมากกว่าวิธีอื่นๆ แต่วิธีป้อนสารมักทำให้กุ้งอยู่ในภาวะเครียดและเกิดการบอบช้ำมากกว่าวิธีอื่นๆ คณะวิจัยจึงไม่สนับสนุนให้ใช้วิธีนี้ นอกจากจะใช้เพื่อการทดสอบและวิจัยในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

ปริมาณการดูดซึม และความคงตัวของสารสกัดพญายอที่ให้โดยการผสมอาหารให้กุ้งกินนั้น สารสกัดจะเข้าสู่กระแสเลือดกุ้งในระยะเวลาที่ช้ากว่าการให้โดยการป้อน และกุ้งจะได้รับสารสกัดในปริมาณต่ำกว่า เมื่อดูปริมาณของสารจากการตรวจสอบแล้ว จะเห็นว่า กุ้งได้รับสารสกัดพญายอในปริมาณที่ไม่แน่นอน จึงควรมีการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคไวรัส YHV ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญายอ
โดยผสมอาหารให้กินในระดับ 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกัน
เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ระยะเวลา ที่กินพญายอ	อัตราการตายของกุ้ง (%)				
	ความเข้มข้นพญายอที่ให้กิน (g/kg อาหาร)				
	0	0.01	0.1	1	
ระยะที่ 1, 7 วัน					
	R ₁	72.22	44.44	27.77	94.44
	R ₂	100	55.55	55.55	61.11
	R ₃	55.55	27.77	16.66	50.00
เฉลี่ย		75.92	42.58	33.33	68.52
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	43.91	56.10	9.75
ระยะที่ 2, 14 วัน					
	R ₁	88.88	66.66	83.33	66.66
	R ₂	61.11	44.44	22.22	66.66
	R ₃	66.66	55.55	44.44	55.55
เฉลี่ย		72.22	55.55	49.99	62.95
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	23.08	30.77	12.83
ระยะที่ 3, 21 วัน					
	R ₁	72.22	66.66	44.44	55.55
	R ₂	72.22	77.77	44.44	77.77
	R ₃	66.66	27.77	55.55	55.55
เฉลี่ย		70.36	57.4	48.14	62.96
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	18.42	31.58	10.52
ระยะที่ 4, 28 วัน					
	R ₁	83.33	94.44	44.44	83.33
	R ₂	100	55.55	94.44	33.33
เฉลี่ย		91.66	74.99	69.44	58.33
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	18.18	24.24	36.36

* R₁ - R₃ = จำนวนซ้ำ

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคไวรัส SEMBV ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญายอ
โดยผสมอาหารให้กินในระดับ 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกัน
เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ระยะเวลา		อัตราการตายของกุ้ง (%)			
ที่กินพญายอ		ความเข้มข้นพญายอที่ให้กิน (g/kg อาหาร)			
		0	0.01	0.1	1
ระยะที่ 1, 7 วัน					
	R ₁	61.11	100	22.22	66.66
	R ₂	100	66.66	77.77	72.22
เฉลี่ย		80.55	83.33	50.00	69.44
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	-3.45	37.93	13.79
ระยะที่ 2, 14 วัน					
	R ₁	94.44	100	88.88	100
	R ₂	88.88	61.11	77.77	22.22
เฉลี่ย		91.66	80.55	83.33	61.11
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	12.12	9.09	33.33
ระยะที่ 3, 21 วัน					
	R ₁	55.55	44.44	55.55	66.66
	R ₂	72.22	38.88	50.00	22.22
เฉลี่ย		63.89	41.66	52.76	44.44
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	34.79	17.39	30.44
ระยะที่ 4, 28 วัน					
	R ₁	55.55	66.66	88.88	66.66
	R ₂	77.77	44.44	77.77	33.33
เฉลี่ย		66.66	55.55	83.29	50.00
% ประสิทธิภาพการป้องกันโรค		0	16.66	-2.49	24.99

* R₁ - R₂ = จำนวนซ้ำ

ตารางที่ 10 ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยขบวนการ phagocytosis (in vitro) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญายอโดยผสมอาหารให้กินในปริมาณเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกันเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ระยะเวลาที่ กินอาหาร	จำนวน การทดลอง (ครั้ง)	% phagocytosis (cell)				% ความแตกต่าง ทางสถิติ (ANOVA)
		ความเข้มข้นพญายอที่ให้กิน (g/kg อาหาร)				
		0	0.01	0.1	1	
ระยะที่ 1, 7 วัน						
	1	52.83±23.20 ^a	54.07±14.23 ^a	36.64±12.25 ^b	51.55±19.22 ^a	P<0.05
	2	19.35±8.75 ^b	30.80±4.71 ^c	14.81±4.71 ^a	29.00±38 ^c	P<0.05
ระยะที่ 2, 14 วัน						
	1	33.23±14.98 ^a	58.52±20.16 ^b	49.75±20.42 ^b	33.05±12.66 ^a	P<0.05
	2	33.18±7.40 ^b	26.13±16.44 ^a	35.41±12.22 ^b	25.82±10.83 ^a	P<0.05
ระยะที่ 3, 21 วัน						
	1	49.91±15.88	47.42±26.53	61.95±22.08	53.66±13.65	NS
	2	30.27±14.97	27.59±15.42	33.55±18.97	30.07±13.01	NS
ระยะที่ 4, 28 วัน						
	1	72.51±11.52 ^a	74.11±10.17 ^a	80.29±5.59 ^b	82.42±5.48 ^b	P<0.05
	2	36.96±18.80	40.40±9.86	33.41±12.7	34.18±18.53	NS

หมายเหตุ : อักษร a-d ที่แตกต่างกันบนตัวเลขในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทดสอบตามสูตร ANOVA
P<0.05 หมายถึง ค่าตัวเลขมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95%
NS หมายถึง ค่าตัวเลขไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 11 ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยขบวนการ phagocytosis (in vivo) ของกิ้งกูดดำที่ได้รับสารสกัดพญายอโดยผสมอาหารให้กินในปริมาณเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกันเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ระยะเวลาที่ กินอาหาร	จำนวน การทดลอง (ครั้ง)	% phagocytosis (cell)				% ความแตกต่าง ทางสถิติ (ANOVA)
		ความเข้มข้นพญายอที่ให้กิน (g/kg อาหาร)				
		0	0.01	0.1	1	
ระยะที่ 1, 7 วัน						
	1	29.46±8.47	29.22±8.78	30.57±8.25	23.75±8.32	NS
	2	14.95±8.84	15.22±9.98	16.45±9.58	8.79±9.00	NS
ระยะที่ 2, 14 วัน						
	1	29.78±7.55 ^a	33.22±6.81 ^a	27.45±7.38 ^b	33.59±7.10 ^a	P<0.05
	2	14.60±7.42 ^a	18.49±10.71 ^a	11.35±7.42 ^b	18.20±7.72 ^a	P<0.05
ระยะที่ 3, 21 วัน						
	1	43.00±9.55 ^a	38.66±7.43 ^b	29.14±9.09 ^d	36.16±9.43 ^c	P<0.05
	2	31.72±12.23 ^a	24.77±9.50 ^b	13.44±9.96 ^c	21.84±10.73 ^b	P<0.05
ระยะที่ 4, 28 วัน						
	1	35.90±6.90 ^a	30.73±6.57 ^b	38.29±7.52 ^a	35.90±7.06 ^a	P<0.05
	2	22.39±8.76 ^a	13.86±7.26 ^b	23.33±9.16 ^a	19.80±8.82 ^a	P<0.05

หมายเหตุ : อักษร a-d ที่แตกต่างกันบนตัวเลขในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทดสอบตามสูตร ANOVA
P<0.05 หมายถึง ค่าตัวเลขมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95%
NS หมายถึง ค่าตัวเลขไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 12 ความสามารถของเลือดที่จับตัวและตกตะกอนกับสิ่งแปลกปลอม (agglutinin) ในกิ้งกูดดำ
ที่ได้รับสารสกัดพญายอโดยผสมอาหารให้กินในปริมาณเข้มข้น 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร
ติดต่อกันเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ระยะเวลาที่ กินอาหาร	จำนวน การทดลอง (ครั้ง)	agglutinin (dilution titre)				% ความแตกต่าง ทางสถิติ (ANOVA)
		ความเข้มข้นพญายอที่ให้กิน (g/kg อาหาร)				
		0	0.01	0.1	1	
ระยะที่ 1, 7 วัน						
	1	1349.3±1381.9	869.3±1034.4	869.3±1034.4	698.7±1150.4	NS
	2	1936.0±1602.2	757.3±670.1	1002.7±1132.7	1413.3±1347.2	NS
ระยะที่ 2, 14 วัน						
	1	1045.3±977.4 ^a	2016.0±61776.8 ^b	202.7±230.5 ^b	1024.0±1957.9 ^a	P<0.05
	2	74.7±55.9	165.3±66.4	128.0±64.0	165.3±157.8	NS
ระยะที่ 3, 21 วัน						
	1	364.8±341.1	614.4±204.8	384.0±128.0	748.4±691.2	NS
	2	557.3±507.4	210.7±158.1	412.0±386.6	322.7±172.6	NS
ระยะที่ 4, 28 วัน						
	1	439.4±211.6 ^b	725.3±598.9 ^c	618.7±506.2 ^c	192.0±230.8 ^a	P<0.05
	2	683.3±661.0 ^c	69.3±44.5 ^a	306.7±541.7 ^b	229.3±159.2 ^b	P<0.05

หมายเหตุ : อักษร a-d ที่แตกต่างกันบนตัวเลขในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติ
เมื่อทดสอบตามสูตร ANOVA
P<0.05 หมายถึง ค่าตัวเลขมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95%
NS หมายถึง ค่าตัวเลขไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 13 ปริมาณสารละลายพญายอเข้มข้น 1 และ 10 ug/ml เมื่อละลายในน้ำทะเล
ที่ระดับความเค็ม 10, 20 และ 30 ppt ตรวจสอบด้วย CN antibody probe

เวลาการละลาย (วัน)	ปริมาณพญายอที่ตรวจพบ (ug/ml)						กลุ่มควบคุม
	ระดับความเค็มน้ำทะเล (ppt)						
	10		20		30		
	ความเข้มข้นพญายอที่ใช้ละลาย (ug/ml)						
	1	10	1	10	1	10	
0	1.000	10.000	0.984	10.000	0.897	9.989	0.00
6 ชม.	0.991	9.789	0.957	9.442	0.802	9.001	0.00
12 ชม.	0.752	9.145	0.835	8.924	0.711	8.873	0.00
1	0.626	9.007	0.783	8.327	0.587	8.570	0.00
2	0.481	7.671	0.438	8.173	0.402	7.511	0.00
3	0.343	7.139	0.334	6.935	0.321	6.461	0.00
4	0.171	5.686	0.137	5.683	0.112	4.904	0.00
5	0.9	4.972	0.97	4.639	0.78	4.378	0.00
6	0.68	3.716	0.66	3.697	0.51	3.306	0.00
7	0.57	3.704	0.31	3.276	0.25	3.051	0.00
9	0.00	2.010	0.00	1.823	0.00	1.008	0.00

(กลุ่มควบคุม = น้ำทะเลที่ไม่ใส่สารพญายอ)

ตารางที่ 14 ปริมาณสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งกลาดำที่ได้รับสารโดยการป้อนด้วยความเข้มข้น 30 mg/ml ในอัตรา 0.3 ml/ตัว ตรวจสอบด้วย CN - antibody probe

เวลาหลังป้อน (ชม.)	ปริมาณพญายอเฉลี่ย (ug/ml)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่รับสาร	
0	0.00	270.06	0.00
1/2	0.00	298.99	+28.93
1	0.00	254.98	-44.01
3	0.00	256.67	+1.69
6	0.00	187.26	-69.41
9	0.00	184.34	-2.92
12	0.00	75.84	-108.5
15	0.00	58.29	-17.55
18	0.00	0	-58.29

หมายเหตุ : n = 20

+ = ปริมาณที่เพิ่มขึ้น หลังจากการตรวจครั้งก่อน

- = ปริมาณที่ลดลง หลังจากการตรวจครั้งก่อน

ตารางที่ 15 ปริมาณสารสกัดพญายอในเลือดกึ่งกลาดำหลังจากได้รับสารโดยการผสมอาหารให้กิน ด้วยความเข้มข้น 100 mg/ml/อาหาร 100 g ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัว โดยให้กิน 2 มื้อ เข้า-เย็น ตรวจสอบด้วย CN - antibody probe (กลุ่มควบคุม = ไม่ได้ป้อนสาร)

เวลาหลังจากได้รับสาร (ชม.)	ปริมาณพญายอเฉลี่ย (ug/ml)			หมายเหตุ
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่รับสาร		
1	0.00	0.00	0.00	
3	0.00	+0.00	0.00	
5	0.00	+6.89	6.89	
7	0.00	+47.25	54.14	
48	0.00	+122.20	176.34	
72	0.00	+12.92	189.26	
96	0.00	+3.39	192.65	
120	0.00	+50.94	243.59	
144	0.00	-96.94	146.65	หยุดให้อาหาร
168	0.00	-106.98	39.67	"
192	0.00	-39.67	0.00	"

หมายเหตุ : n = 20

+ = ปริมาณที่เพิ่มขึ้น หลังจากการตรวจครั้งก่อน

- = ปริมาณที่ลดลง หลังจากการตรวจครั้งก่อน

4.2 ความเห็นของผู้วิจัย

4.2.1 ข้อสรุป

4.2.1.1 การให้สารสกัดโดยผสมอาหารให้กุ้งกินในปริมาณ 0.1 g/kg อาหาร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองให้กุ้งกินอาหารผสมพญายอครั้งนี้ เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการคุ้มกันโรคไวรัส YHV และ SEMBV ได้สูงกว่าปริมาณความเข้มข้นอื่น อย่างไรก็ตามควรมีการวิจัยเพิ่มเติมในแง่ของวิธีผสมสารสกัดกับอาหาร และระยะเวลาการให้อาหารผสมพญายอเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการใช้งานสูงกว่านี้ เนื่องจากการให้สารสกัดโดยวิธีผสมอาหารให้กินเป็นวิธีที่เกษตรกรสามารถนำไปปฏิบัติได้ง่ายที่สุด และเป็นวิธีที่ไม่ทำให้กุ้งอยู่ในภาวะเครียด นอกจากนี้ยังไม่มีปัญหากับสิ่งแวดล้อมอื่นๆ มากเท่ากับการให้สารโดยละลายลงในน้ำ

4.2.1.2 ขณะนี้ยังไม่สามารถสรุปถึง mechanism ของสารสกัดที่เข้าไปในตัวกุ้ง และทำให้กุ้งสามารถคุ้มกันโรคไวรัสได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปให้เห็นผลชัดเจน

4.2.2 ปัญหาและอุปสรรค

4.2.2.1 ปัญหาเรื่องตัวอย่างกุ้งยังคงมีอยู่เช่นเดิม เนื่องจากบางครั้งกุ้งที่ซื้อมามีการติดเชื้อไวรัส และการขนส่งกุ้งในระยะทางไกล ทำให้กุ้งเครียดเมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการ กุ้งส่วนหนึ่งจะอ่อนแอ และติดเชื้อได้ง่าย จึงสูญเสียบในเรื่องนี้สูง

4.2.3 ความก้าวหน้าของกิจกรรมวิจัยที่เกินเป้าหมาย ที่ได้ดำเนินการไปแล้ว ได้แก่ การศึกษาผลข้างเคียงของสารพญายอต่อระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้ง ได้แก่

4.2.3.1 ระบบ phagocytosis ทั้งวิธี in vitro และการพัฒนาวิธีการแบบ in vivo

4.2.3.2 เนื่องจากสถาบันฯ ไม่มีเครื่องมือ sonicator ดังนั้นการวิจัยผลข้างเคียงของสารพญายอต่อระบบภูมิคุ้มกันในรูปของการตรวจสอบด้วยวิธี Phenoloxidase จึงทำไม่ได้ทั้งในปัจจุบันการศึกษาด้านภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำได้พัฒนาขึ้นมามาก และพบว่าวิธีศึกษา Phenoloxidase ให้ผลไม่แน่นอนนัก จึงได้เปลี่ยนแปลงไปใช้วิธีตรวจสอบด้วยวิธี agglutinin แทน

แผนการดำเนินงานในระยะ 6 เดือนต่อไป

1) ศึกษาผลข้างเคียงของสารสกัดพญายอ ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและระบบเนื้อเยื่อในตัวกุ้ง ในแง่ของการศึกษาขบวนการต่างๆ ดังนี้

- การ clearance antigen cell
- ศึกษาเพิ่มเติมในด้านผลกระทบต่อระบบเนื้อเยื่อเพื่อยืนยันผลให้แน่ชัดในแง่

ของการให้สารสกัดโดยผสมอาหารให้กินในอัตรา 1 g/kg นานกว่า 21 วันขึ้นไป

2) ศึกษาผลกระทบของการให้พญายอต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

3) ศึกษาผลกระทบของการใช้พญายอต่อชนิดและปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำ เมื่อกุ้งได้รับสารพญายอโดยผสมอาหารให้กิน

4) ศึกษาผลกระทบของการใช้พญายอ เมื่อละลายในน้ำทะเล ซึ่งจะมีผลต่อสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้แก่

- ชนิดและปริมาณแพลงก์ตอน
- คุณสมบัติน้ำ
- ปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัส

1. 3 กิจกรรมที่ได้ดำเนินการในช่วงที่ 3 (วันที่ 1 มกราคม ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2541)

1.3.1 ผลกระทบของการใช้พญายอต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

ก่อนที่จะนำสารพญายอไปใช้ในการป้องกันโรคไวรัสที่เกิดในกุ้งกุลาดำจำเป็นต้องศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้สารพญายอต่อการเจริญเติบโตของกุ้งที่ได้รับสารพญายอเข้าไปการทดลองในกิจกรรมนี้แบ่งการทดลองออกไปดังนี้

- 1) กุ้งที่ได้รับสารพญายอในอัตราที่แตกต่างกันคือ 0, 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร
- 2) กุ้งที่ได้รับสารพญายอในระยะเวลาแตกต่างกันคือ 7 วัน, 14 , 21 และ 28 วัน

วัตถุประสงค์

เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากผลกระทบของพญายอต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งไปใช้ในการกำหนดขนาดและระยะเวลาการใช้สารพญายอในกุ้งกุลาดำให้ถูกต้องโดยไม่เกิดผลกระทบและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของกุ้งที่เลี้ยง

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) นำกุ้งกุลาดำขนาด 45 ตัว/กก. จำนวน 400 ตัวมาแยกเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ 4 บ่อ เพื่อปรับสภาพให้กุ้งชินต่อการเลี้ยงดูในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 5 วัน โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติ วันละ 3 มื้อ มีการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20% ทุกวัน
- 2) เมื่อครบกำหนดการปรับสภาพตัวอย่างกุ้งแล้ว จึงเริ่มให้อาหารที่ผสมสารพญายอให้กุ้งกินวันละ 3 มื้อ โดยแต่ละบ่อให้กินอาหารดังนี้
 - บ่อที่ 1 ให้กินอาหารเม็ดปกติต่อไปจนจบการทดลอง
 - บ่อที่ 2 ให้กินอาหารเม็ดที่ผสมสารพญายอขนาด 0.01 g/kg ตลอดการทดลอง
 - บ่อที่ 3 ให้กินอาหารเม็ดที่ผสมสารพญายอขนาด 0.1 g/kg ตลอดการทดลอง
 - บ่อที่ 4 ให้กินอาหารเม็ดที่ผสมสารพญายอขนาด 1 g/kg ตลอดการทดลอง
- 3) เมื่อถึงกำหนดการเก็บตัวอย่างกุ้งมาตรวจสอบน้ำหนักจึงเก็บตัวอย่างกุ้งในแต่ละบ่อขึ้นมาชั่งน้ำหนัก จำนวนบ่อละ 30 ตัวอย่าง ระยะเวลาที่กำหนดในการตรวจสอบมีดังนี้
 - 3.1) 7 วัน หลังจากกุ้งได้รับสารพญายอ
 - 3.2) 14 วัน หลังจากกุ้งได้รับสารพญายอ
 - 3.3) 21 วัน หลังจากกุ้งได้รับสารพญายอ
 - 3.4) 28 วัน หลังจากกุ้งได้รับสารพญายอ

1.3.2 ผลกระทบของการใช้พญายอต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในกึ่งกลาดำที่ได้รับสารพญายอโดยการกิน

แบคทีเรียที่อยู่ในระบบย่อยอาหารสัตว์น้ำ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และอาจจะส่งผลไปถึงการมีชีวิตอยู่รอดของตัวสัตว์นั้นด้วย เมื่อสัตว์น้ำได้รับอาหารที่ผสมด้วยยาหรือสารฆ่าเชื้อเข้าไป สารหรือยาเหล่านั้นอาจไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรืออาจมีผลทำให้องค์ประกอบของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปจนขาดความสมดุล ซึ่งจะส่งผลไปถึงสุขภาพของกุ้งได้ ดังนั้นก่อนที่จะมีการนำพญายอมาใช้เพื่อควบคุมโรคไวรัสในการเลี้ยงกุ้งกลาดำ ควรมีการศึกษาถึงผลกระทบของพญายอต่อประชากรแบคทีเรียในอวัยวะสำคัญของกุ้งอันได้แก่ hepatopancreas, intestine และเลือด ทั้งนี้เพื่อจะได้นำข้อมูลไปพิจารณาหาทางแก้ไขปัญหา โดยอาจมีการเสริมปริมาณแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อระบบการย่อยอาหารกุ้งเพิ่มเข้าไปพร้อมกับการให้พญายอ เพื่อเป็นส่วนช่วยรักษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียให้ในตัวกุ้งให้อยู่ร่วมกันได้โดยกุ้งจะมีสุขภาพสมบูรณ์และมีภูมิคุ้มกันโรคไวรัสได้ตามเป้าหมายที่ตั้งไว้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลกระทบของการกินสารสกัดพญายอความเข้มข้น 3 ระดับ ที่มีต่อแบคทีเรียในระบบย่อยอาหารและระบบเลือดของกุ้งกลาดำ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) เก็บตัวอย่างกุ้งกลาดำที่ได้รับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้โดยเก็บตัวอย่าง 10 ตัว/บ่อ ตามเวลาที่กำหนดไว้ข้างต้น
- 2) นำตัวอย่างกุ้งที่ซังน้ำหนักแล้ว มาทำความสะอาดภายนอกด้วย 70% antiseptic solution แล้วจึงดูดเลือดกุ้งจากแอ่งเลือดตัวละ 2 ml โดยวิธี aseptic เพื่อเก็บไว้ศึกษาประชากรแบคทีเรียในเลือดต่อไป จากนั้นจึงผ่าตัดแยกเอา hepatopancreas และ intestine ออกมาที่ละส่วน และดำเนินการแยกแบคทีเรียจากอวัยวะของกุ้งตามวิธีของ Ruangpan, et al. (1994)
- 3) ดูดแบคทีเรียที่เจือจางใน phosphate buffer แต่ละระดับจำนวน 0.1 ml ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brom thymal blue (BTB, Teepol) และอาหาร Zobell อย่างละ 3 จ้า ป่มไว้ในตู้บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4) นับจำนวน colony ของแบคทีเรียบนผิวน้ำอาหาร และแยกกลุ่มแบคทีเรียตามความแตกต่างทาง morphology ทำการ purify ตัวอย่างเพื่อเก็บ stock ไว้ศึกษาขั้นต่อไป พร้อมทั้งบันทึกผลไว้เพื่อการคำนวณปริมาณของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม

5) ทดสอบคุณลักษณะของแบคทีเรียโดยยึดคุณลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยระบบ Api-20E และวิเคราะห์ตามวิธีของ Bauman & Bauman (1981)

1.3.3 ผลกระทบของสารพญายอที่ละลายในน้ำต่อประชากรแบคทีเรียในน้ำจากบ่อเลี้ยง

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ทราบถึงการใช้สารพญายอโดยการละลายลงในน้ำเลี้ยงกุ้งเพื่อป้องกันโรคไวรัสที่มีผลกระทบต่อประชากรแบคทีเรียในแหล่งเลี้ยงกุ้ง

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1) เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกลาดำมาแบ่งใส่ถังทดลองขนาด 100 ลิตร จำนวน 9 ถัง ให้ฟองอากาศและให้ได้รับแสงแดดตามธรรมชาติ การทดลองแบ่งเป็น 3 ชุด ๆ ละ 3 ถังดังนี้

ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม (ไม่ใส่พญายอ)

ชุดที่ 2 ใส่สารพญายอ 0.1 mg/l

ชุดที่ 3 ใส่สารพญายอ 1 mg/l

2) หลังการเติมสารสกัดพญายอเป็นระยะ 1, 3, 5 และ 7 วัน จึงเก็บตัวอย่างน้ำแต่ละถังขึ้นมาเพื่อตรวจสอบประชากรแบคทีเรียในน้ำตามวิธีการของ Ruangpan, et al. (1995) โดยใช้อาหาร Zobell และ BTB

3) นับปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัส และแยกชนิดของแบคทีเรียไวรัส

4) ศึกษาซ้ำด้วยวิธีเดียวกัน 10 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้งในแหล่งอื่น ๆ จนครบ 10 แหล่ง

1.3.4 ผลกระทบของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแพลงก์ตอน

วัตถุประสงค์

การจะนำสารใดๆ ใส่ลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกลาดำจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงผลกระทบของสารนั้นๆ ต่อระบบนิเวศในบ่อด้วย เพราะถ้าระบบนิเวศในบ่อถูกทำลายก็ย่อมมีผลกระทบต่อกุ้งแพลงก์ตอนเป็นปัจจัยหลักในการทำให้เกิดสีน้ำในบ่อเลี้ยง ทั้งเป็นส่วนสำคัญของระบบนิเวศในบ่อเลี้ยง โดยเฉพาะการเป็นห่วงโซ่อาหาร นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการช่วยควบคุมสภาพน้ำ เช่น อุณหภูมิ pH ความโปร่งใส แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจน (ชะลอ, 2534; ธิดา, 2538) ในทำนองเดียวกันแพลงก์ตอนสัตว์ก็เป็นส่วนสำคัญของระบบนิเวศในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งในการ

เตรียมบ่อโดยทำให้เกิดแพลงก์ตอนอย่างอุดมสมบูรณ์จะทำให้ลูกกุ้งเจริญเติบโตดี เกษตรกรบางรายถึงกับเตรียมแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น อาร์ทีเมียใส่ลงในบ่อเลี้ยงกุ้งด้วย ในขณะที่การเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนเหล่านี้ขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการ เช่น แสง อุณหภูมิและอาหาร สารบางอย่างก็อาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของมัน ดังนั้นเมื่อต้องการใช้สารสกัดพญายอในบ่อเลี้ยงกุ้งจึงจำเป็นต้องศึกษาผลของสารพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของแพลงก์ตอนด้วยทั้งนี้เพื่อหาทางปรับปรุงหรือแก้ไขปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นต่อไป การศึกษาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

- 1) ศึกษาผลกระทบของพญายอต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนโดยใช้แพลงก์ตอนตัวแทนจากห้องปฏิบัติการ
- 2) ศึกษาผลกระทบของสารพญายอที่เติมลงไปใต้น้ำต่อแพลงก์ตอนซึ่งในน้ำที่ใช้ทดลองเป็นน้ำตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ดังนี้

1.3.4.1 การศึกษาผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ตัวอย่างแพลงก์ตอนที่ใช้จะคัดเลือกมาจากแพลงก์ตอนชนิดสำคัญที่มักจะมีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งได้แก่ แพลงก์ตอนพืชที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งมักจะเป็นกลุ่มไดอะตอม (*Bacillariophyta*) กลุ่มสาหร่ายสีเขียว (*Chlorophyta*) และกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (*Cyanophyta*) ส่วนแพลงก์ตอนสัตว์ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งคือ โรติเฟอร์ และแพลงก์ตอนสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่เกษตรกรนิยมใส่ลงในบ่อเลี้ยงกุ้งคือ อาร์ทีเมีย จากนั้นจึงกำหนดระดับความเข้มข้นของสารสกัดพญายอให้ครอบคลุมตั้งแต่ระดับต่ำสุดจนถึงระดับสูงสุดที่อาจจะเกิดจากการสะสมของสารสกัดนี้ซึ่งอาจจะหลงเหลือในอาหารส่วนที่กุ้งไม่ได้กิน โดยทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการด้วยการเตรียมพันธุ์ นำแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์แต่ละชนิดแล้วนำมาเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 250 มล. (ยกเว้นอาร์ทีเมียซึ่งเลี้ยงในขวดแก้ว รูปทรงกระบอกขนาด 10 ลิตร) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดๆ ละ 3 ขั้ว ใส่สารสกัดพญายอในระดับ 0, 0.1, 1.0, 10 และ 100 mg/l ทำการผสมตัวอย่างมานับปริมาณแพลงก์ตอนทุกวัน สำหรับแพลงก์ตอนพืช ทำการศึกษาโดยใช้ความเค็ม 25 ppt ที่อุณหภูมิ 27-29.5 °C ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ วันละ 10 ชม. ด้วยความเข้มแสง 3000 ลักซ์ แพลงก์ตอนพืชที่นำมาศึกษาคือ *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp., *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros gracilis* และ *Spirulina platensis* ส่วนแพลงก์ตอนสัตว์คือ โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) และ *Artemia* sp.

1.3.4.2 การศึกษาผลกระทบของสารสกัดพญายอที่เติมลงไปใต้น้ำต่อแพลงก์ตอนในน้ำตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งมาแบ่งใส่ถังทดลองขนาด 100 ลิตร จำนวน 9 ถัง ให้ฟองอากาศและ ให้ได้รับแสงแดดตามธรรมชาติ การทดลองแบ่งเป็น 3 ชุด ๆ ละ 3 ถัง ดังนี้
ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม (ไม่ใส่พญายอ)
ชุดที่ 2 ใส่สารสกัดพญายอ 0.1 mg/l
ชุดที่ 3 ใส่สารสกัดพญายอ 1 mg/l
- 2) สุ่มตัวอย่างน้ำไปตรวจสอบชนิดและปริมาณของแพลงก์ตอนที่พบในถังทดลองทุกถังเป็นประจำทุกวัน
- 3) ทำซ้ำกันโดยนำน้ำตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้งเป็น จำนวน 10 แห่ง

1.3.5 ผลกระทบของสารพญายอต่อคุณภาพน้ำที่สำคัญบางประการ

วัตถุประสงค์

เพื่อต้องการทราบผลของสารสกัดพญายอ ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งอาจจะมีส่วนทำให้เกิดอันตรายต่อกุ้งและสัตว์น้ำอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

- 1) นำตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกลาดำบ่อละ 1,000 ลิตร แบ่งใส่ถังขนาด 100 ลิตร จำนวน 9 ถัง ให้ฟองอากาศและให้ได้รับแสงแดดตามธรรมชาติ
- 2) แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ๆ ละ 3 ถัง โดยชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม (ไม่ใส่สารสกัดพญายอ) ชุดที่ 2 ใส่สารสกัดพญายอในปริมาณที่มีผลยับยั้งเชื้อไวรัส (0.1 mg/l) และชุดที่ 3 ใส่สารสกัดพญายอในประมาณ 10 เท่าของระดับที่มีผลยับยั้งเชื้อไวรัส (1.0 mg/l)
- 3) ตรวจสอบคุณภาพน้ำที่มีความสำคัญในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ COD (Chemical Oxygen Demand), BOD (Biochemical Oxygen Demand), TOC (Total Organic Carbon), TKN (Total Kjeldahl Nitrogen), pH และ Alkalinity. ทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วันติดต่อกัน
- 4) ศึกษาซ้ำด้วยวิธีเดียวกัน 10 ครั้ง โดยใช้ตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในแหล่งอื่น ๆ จนครบ 10 แหล่ง

1.3.5 กิจกรรมที่ทำเพิ่มเติมเพื่อการยืนยันผล ในการทดลองที่ผ่านมาในงวด 2

1.3.6.1 การศึกษาปริมาณของสารสกัดพญายอที่สะสมในเลือดกึ่งโดยการกิน สารพญายอที่ผสมกับอาหาร

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ทราบปริมาณการสะสมของสารพญายอในเลือดกึ่งที่ได้รับพญายอขนาด 0.1 g/kg โดยการผสมให้กึ่งกินทุกวันติดต่อกัน ตามเวลากำหนด

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

เมื่อถึงกำหนดเวลาจึงนำกึ่งมาตรวจสอบปริมาณการสะสมของสารพญายอในเลือดกึ่ง และหลังจากนั้นให้อาหารเม็ดปกติเลี้ยงกึ่งต่อไปเรื่อย ๆ และนำกึ่งตัวอย่างขึ้นมาตรวจสอบสารพญายอในเลือดกึ่งต่อไปทุกวัน จนกว่าจะตรวจไม่พบ หรือตรวจไม่ได้แล้ว

1.3.6.2 ประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัสหัวเหลือง

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัสหัวเหลือง (YHV) โดยการผสมอาหารให้กึ่งกินและโดยการแช่กึ่งในสารละลายพญายอ

1.3.6.2.1 ประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัสหัว เหลืองโดยการกินอาหารผสมพญายอ

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1) นำกึ่งกุลาดำขนาดเฉลี่ยน้ำหนักประมาณ 40 ตัว/กก. เลี้ยงในบ่อซีเมนต์จำนวน 4 บ่อ เพื่อปรับสภาพให้กึ่งชินต่อการเลี้ยงดูในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 5 วัน โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติวันละ 3 มื้อ มีการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20% ทุกวัน

2) เมื่อครบกำหนดการปรับสภาพตัวอย่างกึ่งแล้ว จึงเริ่มให้อาหารที่ผสมสารพญายอให้กึ่งกินวันละ 3 มื้อ โดยแต่ละบ่อให้กินอาหารดังนี้

บ่อที่ 1 กินอาหารเม็ดปกติต่อไปจนครบกำหนดการทดลอง

บ่อที่ 2 กินอาหารเม็ดผสมสารพญายอในอัตรา 0.1g/kg อาหาร จนครบกำหนดการทดลอง

3) เมื่อถึงกำหนดการทดสอบประสิทธิภาพของสารพญายอจึงนำตัวอย่างกุ้งจากบ่อซีเมนต์ไปใส่ในตู้ทดลองที่เตรียมใส่เชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) ไว้สำหรับการ challenge ตัวละ 6 ตัว จำนวนชุดละ 3-5 ซ้ำ แล้วจึงเลี้ยงกุ้งโดยให้กินอาหารเม็ดปกติต่อไปจนครบ 14 วัน กำหนดการ challenge มีดังนี้

- 3.1) หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอ ครบ 7 วัน
- 3.2) หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอ ครบ 14 วัน
- 3.3) หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอ ครบ 21 วัน
- 3.4) หลังจากกุ้งกินอาหารผสมพญายอ ครบ 28 วัน

4) ตรวจสอบอาการกุ้งที่ได้รับการ challenge เชื้อ YHV และบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุกชั่วโมงใน 3 วันแรก และทุกวันในระยะต่อมาจนครบ 14 วัน แล้วจึงนำผลไปคำนวณค่า RPS (Relative percent survival) ตามวิธีของ Amend (1981)

หมายเหตุ : วิธีเตรียมเชื้อและการ challenge แสดงรายละเอียดไว้ในรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 (1 กรกฎาคม - 31 ธันวาคม 2540) และการทดสอบประสิทธิภาพทำซ้ำ 4 ครั้ง

1.3.6.2 ประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัสหัวเหลืองโดยการแช่

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ละลายสารสกัดพญายอลงในน้ำทะเลที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบแช่กุ้งโดยให้ความเข้มข้นของสารสกัดพญายอ 0.1 g/l และกำหนดเวลาการ challenge ดังนี้

- 1) ฉีดเชื้อแล้วนำกุ้งไปแช่ในสารสกัดพญายอที่ละลายน้ำไปแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2) ฉีดเชื้อแล้วนำกุ้งไปแช่ในสารสกัดพญายอที่ละลายน้ำไปแล้วเป็นเวลา 9 ชั่วโมง
- 3) กลุ่มควบคุมแช่ในน้ำทะเลที่ไม่ได้เติมสารสกัดพญายอและนำกุ้งที่ challenge ลงแช่ในช่วงเวลาเดียวกับกลุ่มที่รับการแช่ในสารละลายพญายอ

4.) หลังจากนำกุ้งที่ challenge เชื้อไวรัสลงแช่ในสารละลายพญายอในข้อ 1-3 แล้วจึงเลี้ยงกุ้งต่อไป โดยตรวจสอบอาการและอัตราการตายทุกชั่วโมงใน 3 วันแรก และทุกวันในช่วงหลังจนครบ 14 วัน จึงสิ้นสุดการทดลอง

1.3.6.3 การศึกษาผลข้างเคียงของพญายอต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

ศึกษาโดยการวิเคราะห์ระดับการจับตัวตกตะกอนในเลือด (Agglutinin titer) ของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับสารพญายอกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

หลังจากที่ให้งูรับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้กินตามวิธีข้างต้น จึงนำตัวอย่างงูขึ้นมาดูคัดเลือกและตรวจสอบระดับ Agglutinin titer ของงูตามวิธีการของ Sritunyalucksana (1995) ตามกำหนดที่งูได้รับพญายอครบ 7, 14, 21 และ 28 วัน ตามลำดับ

2.3 ผลงาน

2.3.1 ผลกระทบของการใช้พญายอต่อการเจริญเติบโตของงูกลาดำ

ผลของสารพญายอต่อการเจริญเติบโตของงูกลาดำโดยผสมสารพญายอในอาหารเม็ดให้งูกิน ตามขนาดและกำหนดเวลาได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งจากการตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตของงูในกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารพญายอความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร โดยการใช้น้ำหนักงูเป็นดัชนีในการตรวจสอบ ผลปรากฏว่าน้ำหนักงูในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารพญายอไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของงูที่ได้รับสารเข้าไปในระดับที่ทดสอบ

ตารางที่ 16 น้ำหนักเฉลี่ยของงูกลาดำในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้กินในขนาดและกำหนดระยะเวลาต่างกัน

เวลาที่ให้งูกินพญายอ (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ยของงู (กรัม)			
	ความเข้มข้นสารพญายอ (g/kg)			
	0	0.01	0.1	1
7	24.00	24.33	33.33	24.66
14	26.00	25.96	26.31	26.24
21	27.81	28.62	29.21	30.00
28	29.33	30.00	29.98	31.21

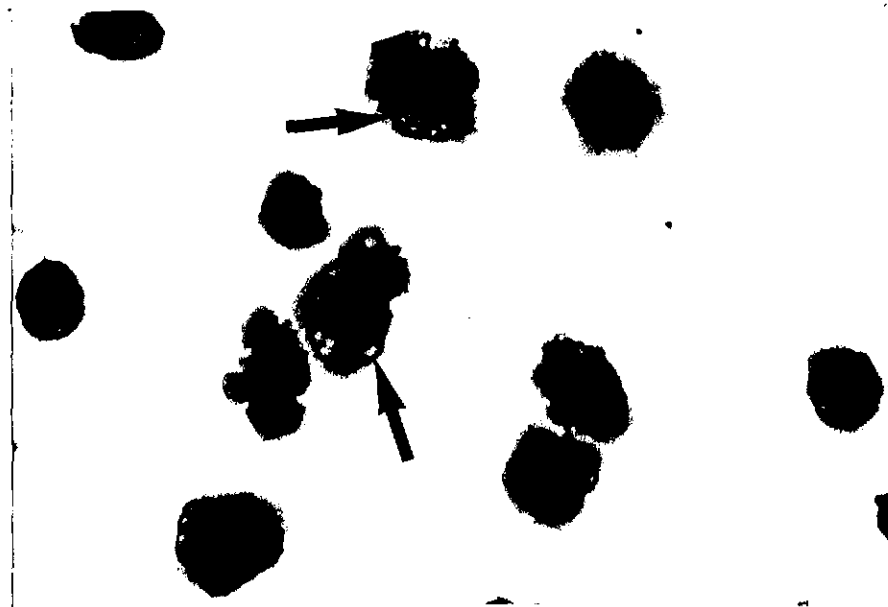
นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ยังได้เก็บตัวอย่างงูในกลุ่มทดลองทุกกลุ่มไปศึกษาผลข้างเคียงของสารพญายอที่มีต่อเนื้อเยื่อภายในตัวงูตามวิธีการศึกษาของ Bell and Lightner (1988) ปรากฏว่า งูที่ได้รับสารสกัดพญายอทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นสาเหตุให้มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ซึ่งจะเห็นได้จากลักษณะของ tubules ที่อัดกันแน่นสม่ำเสมออยู่ในสภาพปกติ โดยมี B-cells, F-cells และ R-cells ที่สมบูรณ์แบบไม่แตกต่างกับลักษณะของ cells ในกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด และระหว่าง tubules แต่ละอันจะ

ล้อมรอบด้วย myoepithelium cells และ myoethelial layer ซึ่งแทรกด้วยแองเงอเล็ด (sinus) ที่มีเม็ดเลือด (hemocyte) บรรจุอยู่ภายในเป็นปกติทุกๆ กลุ่มการทดลอง (รูปที่ 1) ส่วนการตรวจสอบผลข้างเคียงที่มีผลต่อระบบเนื้อเยื่อผิวหนังทางเดินอาหารพบว่า epithelial cells (รูปที่ 4) hind gut (รูปที่ 5) รวมทั้งส่วนของ anus (รูปที่ 6) อยู่ในสภาพที่ปกติทุกประการ จึงสรุปได้ว่าสารพญายอในระดับ 0.01, 0.1 และ 1 g/kg ที่กุ้งได้รับ โดยการกินเป็นเวลานาน 28 วัน ไม่มีผลข้างเคียงที่กระทบต่อระบบเนื้อเยื่อ และอวัยวะภายในของกุ้งแต่อย่างใดเลย

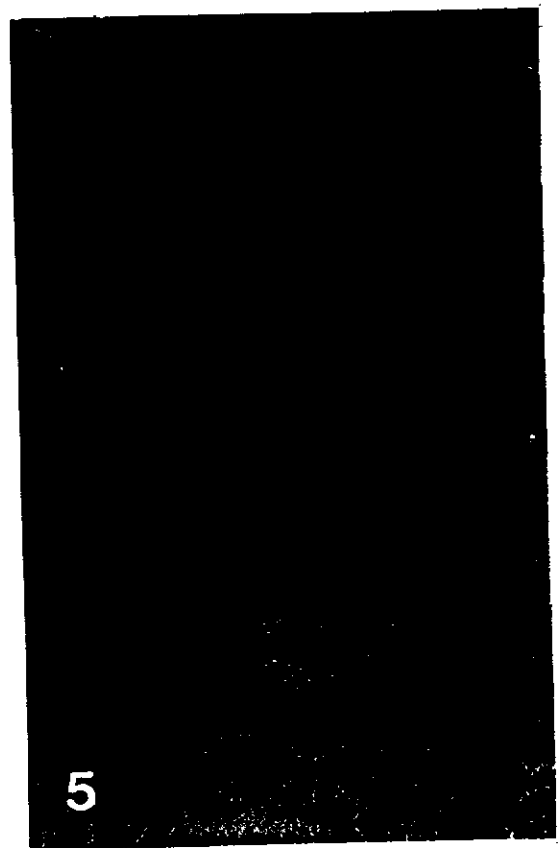
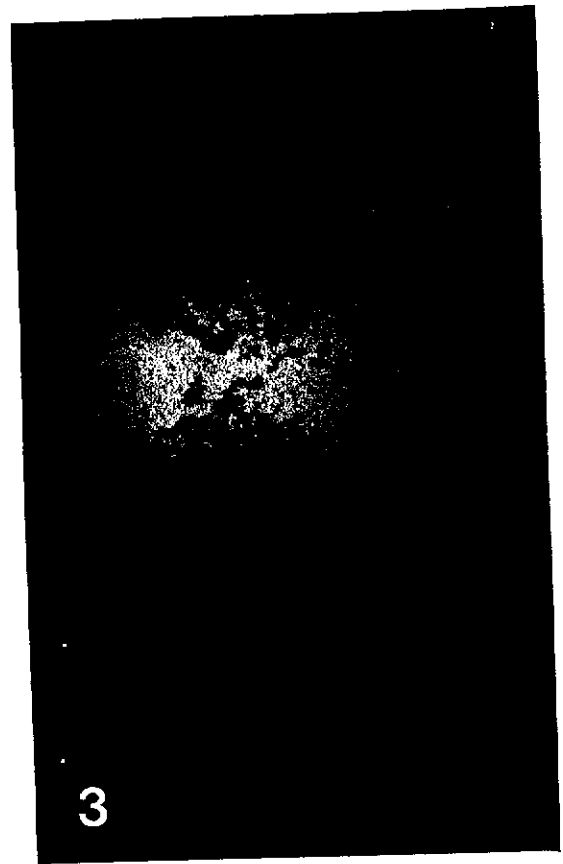
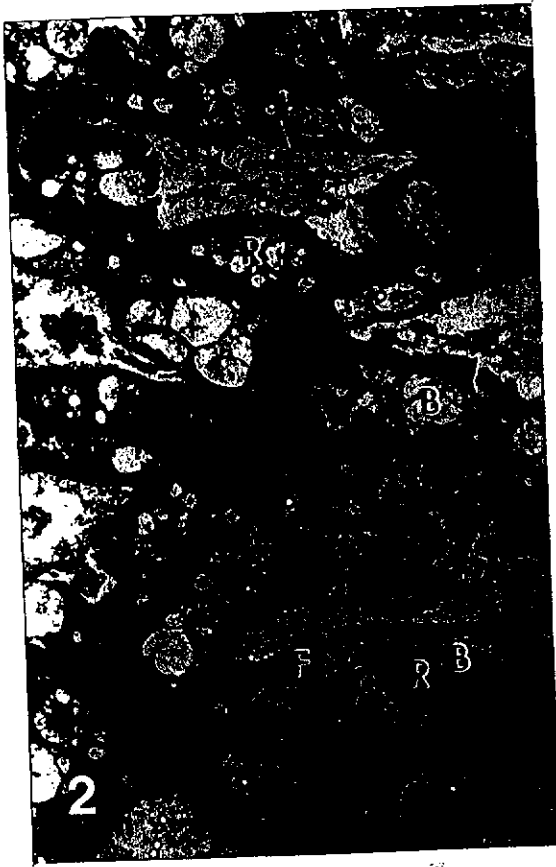
2.3.2 ผลกระทบของสารพญายอต่อประชากรแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ

จากการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในตับและตับอ่อน, ลำไส้ และเลือดของกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารพญายอความเข้มข้นต่างระดับกัน ผลปรากฏว่าประชากรของแบคทีเรียรวมและแบคทีเรีย *Vibrio* ในอวัยวะที่สำคัญของกุ้งกุลาดำที่กล่าวมาข้างต้นทั้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้กินสารพญายอและกลุ่มที่กินสารพญายอทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 17-19) ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณแบคทีเรียในตับ/ตับอ่อน, ในเลือด และในลำไส้ มีอยู่ในระดับปกติคล้ายกับที่พบในกุ้งเลี้ยงทั่วไป (Ruangpan, 1994) ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารพญายอจากอาหารที่กิน แม้ว่ากุ้งจะกินพญายอเป็นระยะเวลาจนถึง 28 วัน

สำหรับชนิดของแบคทีเรียที่พบในอวัยวะทั้ง 3 ส่วนของกุ้งกุลาดำที่ทดสอบในครั้งนี้นำประกอบด้วยกลุ่ม *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* และแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ชนิดของ *Vibrio* ที่ตรวจพบได้แก่ *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* และ *V. mimicus* สัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งจากการวิเคราะห์สัดส่วนของแบคทีเรียในลำไส้, เลือด และตับ/ตับอ่อน ปรากฏว่า มีความคล้ายคลึงกันทั้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารพญายอ และในกลุ่มที่ได้รับสารพญายอทั้ง 2 ระดับ ตามระยะเวลาต่างกัน จึงสรุปได้อย่างชัดเจนว่าสารพญายอไม่มีผลข้างเคียงต่อชนิดและปริมาณแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ ที่ได้รับสารโดยการกินในระดับสูงถึง 1 g/kg อาหาร เป็นเวลานานถึง 28 วัน



ภาพที่ 1 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) กู้กลาดำที่กำลังทำลายสิ่งแปลกปลอม (antigen) ใน
ขบวนการทดสอบภูมิคุ้มกันเชื้อโดยขบวนการ phagocytosis (ใช้ latex bead เป็นตัว
ทดสอบ)





ภาพที่ 2 Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดพญายอระดับความเข้มข้น 1 กรัม/1กก. ติดต่อกันเป็นเวลานาน 28 วัน จะเห็น B-cells (B), F-cells (F) และ R-cells (R) อยู่สภาพปกติ

ภาพที่ 3 Epithelial cells บริเวณ midgut ส่วนต้น (anterior midgut caecum) มีลักษณะเซลล์ที่ปกติ (ครี)

ภาพที่ 4 Epithelial cells บริเวณ midgut ส่วนท้าย (posterior midgut caecum) มีลักษณะเซลล์ที่ปกติ (ครี)

ภาพที่ 5 Epithelial cells บริเวณ midgut ส่วนกลางที่ตัดตามยาว (longitudinal) มีลักษณะเซลล์ที่ปกติ (ครี) ช่องว่างตรงกลางคือ ทางเดินอาหารไปสู่ hind gut

ภาพที่ 6 ส่วนปลายของทางเดินอาหาร (hind gut) เห็นสภาพ Epithelium (ครี) และ tegmental gland ที่ลักษณะเซลล์ยังปกติ

ภาพที่ 7 ส่วนของ anus ซึ่งมีสภาพ epithelial cells ที่ปกติ (ครี)

ตารางที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียรวม (T) และไวรัส (V) ในตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ได้รับพญายอ โดยการกินในระดับความเข้มข้นและกำหนดเวลาต่างกัน

ระยะเวลาที่ กินพญายอ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)							
	ความเข้มข้นพญายอ (g/kg)							
	0		0.01		0.1		1	
	V	T	V	T	V	T	V	T
7	1.4×10^2	6.6×10^3	1.2×10^3	1.3×10^4	1.7×10^2	1.9×10^3	2.9×10^2	7.8×10^3
14	5.9×10^2	6.1×10^3	4.3×10^2	8.4×10^3	3.5×10^2	3.3×10^3	3.8×10^2	7.7×10^3
21	5.2×10^2	2.9×10^3	3.4×10^2	4.3×10^3	2.8×10^2	5.1×10^3	1.1×10^3	1.2×10^4
28	6.9×10^2	4.9×10^3	3.7×10^2	6.9×10^3	4.9×10^2	7.1×10^3	6.9×10^2	1.4×10^4

ตารางที่ 18 ปริมาณแบคทีเรียรวม (T) และไวรัส (V) ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับพญายอ โดยการกินในระดับความเข้มข้น และกำหนดเวลาต่างกัน

ระยะเวลาที่กิน พญายอ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml)							
	ความเข้มข้นพญายอ (g/kg)							
	0		0.01		0.1		1	
	V	T	V	T	V	T	V	T
7	1.0×10	2.1×10	1.0×10	3.0×10	0.8×10	2.4×10	0.7×10	1.2×10
14	0.8×10	1.4×10	3.4×10	6.0×10	1.2×10	2.1×10	1.1×10	1.7×10
21	1.2×10	2.1×10	1.2×10	1.4×10	1.0×10	1.9×10	1.5×10	2.4×10
28	1.9×10	2.9×10	1.7×10	2.9×10	1.7×10	3.0×10	1.4×10	2.7×10

ตารางที่ 19 ปริมาณแบคทีเรียรวม (T) และไวรัส (V) ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับพญายอ โดยการกินในระดับความเข้มข้น และกำหนดเวลาต่างกัน

ระยะเวลาที่กิน พญายอ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)							
	ความเข้มข้นพญายอ (g/kg)							
	0		0.01		0.1		1	
	V	T	V	T	V	T	V	T
7	3.2x10 ⁴	2.3x10 ⁶	6.5x10 ⁴	8.2x10 ⁶	5.0x10 ³	3.5x10 ⁶	1.8x10 ⁵	5.8x10 ⁷
14	4.5x10 ⁴	7.1x10 ⁵	5.1x10 ⁴	7.2x10 ⁵	8.7x10 ⁴	2.6x10 ⁷	2.9x10 ⁴	6.6x10 ⁸
21	9.2x10 ³	6.9x10 ⁵	7.8x10 ³	1.3x10 ⁶	1.9x10 ⁵	5.2x10 ⁸	8.1x10 ⁴	4.2x10 ⁶
28	1.0x10 ⁵	3.1x10 ⁷	9.2x10 ⁴	3.7x10 ⁶	8.7x10 ⁴	1.6x10 ⁶	7.5x10 ⁵	8.1x10 ⁶

ตารางที่ 20 การเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรีย *Vibrio* spp. (V), *Pseudomonas* spp. (P), *Aeromonas* spp. (Ae) และ Other group (Ot) ในลำไส้, ตับ/ตับอ่อน และเลือดกุ้งกุลาดำ ของชุดควบคุม และชุดที่ได้รับสารพญายอในระดับ 0.01, 0.1 และ 1 g/kg อาหาร ติดต่อกันเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

อวัยวะ	เวลา	ประชากรแบคทีเรีย (%)															
	ที่กิน	ชุดควบคุม				พญายอ 0.01 g/kg				พญายอ 0.1 g/kg				พญายอ 1 g/kg			
	(วัน)					อาหาร				อาหาร				อาหาร			
		V	P	Ae	Ot	V	P	Ae	Ot	V	P	Ae	Ot	V	P	Ae	Ot
ลำไส้	7	12.4	60.0	4.0	23.6	14.3	57.4	3.5	24.8	21.8	50.2	5.9	22.1	25.8	61.0	2.3	10.9
	14	13.5	58.2	1.6	26.7	20.2	60.3	2.7	16.8	16.7	59.4	4.8	19.1	19.3	54.5	4.1	22.1
	21	31.4	49.5	3.2	15.9	29.6	53.8	4.6	12.0	35.9	48.7	3.1	12.3	21.7	56.8	2.8	18.7
	28	35.7	50.6	1.7	12.0	30.8	61.5	1.3	6.4	10.7	54.5	3.0	1.8	32.7	48.0	3.2	16.1
ตับ/ตับอ่อน	7	34.5	40.9	3.6	21.0	28.9	53.7	4.9	12.5	30.0	55.4	7.1	7.5	41.1	55.0	3.4	0.5
	14	33.4	45.3	2.3	19.0	40.2	41.8	4.0	14.0	32.7	59.0	3.9	4.4	35.1	58.1	2.8	3.4
	21	30.9	55.0	1.0	13.1	41.1	50.5	3.2	5.2	41.3	47.8	3.0	17.9	30.0	64.3	2.8	2.9
	28	54.6	28.5	1.2	16.6	48.7	30.0	2.7	18.6	45.2	50.0	2.7	2.1	42.0	48.5	3.0	6.5
เลือด	7	69.8	26.4	0.0	3.8	59.7	33.7	0.3	6.3	60.4	34.4	1.2	4.0	45.8	40.8	2.8	10.6
	14	65.1	33.5	0.0	1.4	69.6	29.0	0.8	0.6	57.9	40.3	1.8	0.0	52.7	35.6	8.3	3.4
	21	56.3	43.7	0.0	0.0	64.8	30.1	0.5	4.6	55.4	40.0	2.2	2.4	60.1	25.4	3.7	10.8
	28	62.4	37.6	0.0	0.0	56.4	40.1	0.0	3.2	62.3	35.7	0.7	1.3	53.0	30.9	7.0	9.1

2.3.3 ผลกระทบของการใช้สารพญายอต่อประชากรแบคทีเรียในน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

จากการทดลองเติมสารพญายอลงในตัวอย่างน้ำที่นำมาจากบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 10 แห่ง พบว่า ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในน้ำของชุดควบคุม และชุดที่เติมพญายอในระดับ 0.1, และ 1.0 mg/l ที่ตรวจสอบในวันที่ 1, 3 และ 7 หลังจากการเติมพญายอ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในแง่ของสัดส่วนของประชากรแบคทีเรียที่ตรวจสอบพบในการทดลองทั้ง 10 ครั้ง (ตารางที่ 21-22)

ตารางที่ 21 ปริมาณแบคทีเรียรวม (T) และแบคทีเรีย vibrios (V) ในตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งของกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมพญายอ และกลุ่มทดลองที่เติมพญายอ 2 ระดับ จากการเก็บตัวอย่างในช่วง 1, 3 และ 7 วันหลังจากเติมสาร

เวลา (วัน)	ความเข้มข้น		ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml)									
	พญายอ (mg/l)	ชนิด แบคทีเรีย	จำนวนตัวอย่างน้ำ (บ่อ)									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	V	1.3x10 ³	6.4x10 ²	1.8x10 ²	2.3x10 ³	5.8x10 ³	3.7x10 ⁴	3.0x10 ³	2.4x10 ²	1.1x10 ³	2.7x10 ²
		T	4.3x10 ⁴	1.1x10 ³	5.1x10 ³	9.1x10 ³	6.4x10 ⁴	6.5x10 ⁴	6.1x10 ³	3.1x10 ³	4.8x10 ³	1.2x10 ³
	0.1	V	5.9x10 ³	6.0x10 ³	4.8x10 ²	2.8x10 ³	3.9x10 ³	2.2x10 ⁴	2.1x10 ³	4.2x10 ²	2.1x10 ²	4.5x10 ²
		T	5.4x10 ⁴	3.8x10 ²	3.6x10 ³	3.8x10 ⁴	3.5x10 ⁴	3.1x10 ⁴	4.2x10 ⁴	1.4x10 ³	4.2x10 ³	7.8x10 ²
	1	V	4.3x10 ³	4.5x10 ⁴	4.8x10 ²	4.1x10 ³	1.2x10 ³	3.3x10 ⁴	3.1x10 ³	8.2x10	8.1x10 ²	2.7x10 ³
		T	4.9x10 ⁴	1.5x10 ⁴	5.1x10 ³	4.5x10 ⁴	4.6x10 ³	3.8x10 ⁴	7.8x10 ³	1.9x10 ³	2.2x10 ³	4.9x10 ³
3	0	V	1.3x10 ³	2.4x10 ²	4.4x10 ²	1.1x10 ³	2.2x10 ³	3.4x10 ³	4.1x10 ⁴	4.5x10 ²	1.0x10 ³	2.0x10 ³
		T	1.4x10 ⁴	4.3x10 ³	9.9x10 ³	7.2x10 ³	1.3x10 ⁴	8.7x10 ³	2.1x10 ⁴	8.7x10 ²	4.3x10 ³	4.5x10 ³
	0.1	V	2.0x10 ³	1.6x10 ²	4.9x10 ²	1.3x10 ³	2.3x10 ³	4.4x10 ³	6.2x10 ³	1.9x10 ³	2.8x10 ²	5.1x10 ²
		T	8.4x10 ³	5.1x10 ³	1.3x10 ⁴	4.6x10 ³	2.0x10 ⁴	1.7x10 ⁴	1.4x10 ⁴	4.8x10 ³	5.7x10 ³	6.2x10 ³
	1	V	6.8x10 ²	8.4x10 ²	5.4x10 ²	1.2x10 ³	5.9x10 ³	8.9x10 ³	3.2x10 ³	2.2x10 ³	1.1x10 ³	2.9x10 ²
		T	1.4x10 ⁴	1.2x10 ⁴	2.3x10 ⁴	2.3x10 ⁴	8.0x10 ³	1.6x10 ⁴	8.7x10 ³	9.1x10 ³	4.8x10 ³	7.8x10 ²
7	0	V	7.9x10 ²	6.3x10 ²	1.4x10 ³	6.6x10 ³	2.3x10 ³	5.2x10	9.2x10 ²	8.4x10 ²	7.2x10 ²	1.4x10 ³
		T	1.2x10 ⁴	3.1x10 ³	6.3x10 ³	6.0x10 ⁴	9.5x10 ³	9.7x10 ²	1.4x10 ³	1.7x10 ³	3.4x10 ³	4.1x10 ³
	0.1	V	1.4x10 ³	1.2x10 ³	1.2x10 ³	2.2x10 ⁴	1.2x10 ⁴	2.9x10 ³	1.7x10 ³	2.3x10 ²	2.2x10 ⁴	4.9x10 ³
		T	7.7x10 ³	4.9x10 ³	5.1x10 ³	2.6x10 ⁴	1.8x10 ⁴	3.4x10 ³	2.8x10 ³	3.1x10 ³	2.4x10 ⁴	1.0x10 ⁴
	1	V	2.4x10 ³	9.8x10 ²	5.4x10 ²	4.3x10 ³	2.4x10 ³	2.4x10 ³	1.1x10 ³	2.4x10 ³	4.1x10 ³	3.5x10 ³
		T	7.0x10 ³	6.9x10 ³	3.2x10 ³	8.2x10 ⁴	1.1x10 ⁴	5.2x10 ³	8.2x10 ³	4.2x10 ³	7.3x10 ³	9.1x10 ⁴

ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรีย *Vibrio* spp. (V) *Pseudomonas* spp. (P) และกลุ่มอื่นๆ (Ot) ในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งที่นำมาทดสอบ โดยมีชุดควบคุมและชุดที่เติมพญายอ 0.1 และ 1 mg/l ทำการตรวจสอบในวันที่ 1, 3 และ 7 หลังจากการเติมพญายอ

วัน	ประชากรแบคทีเรีย (%) ในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้ง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) ¹								
	ชุดควบคุม			พญายอ 0.1 mg/l			พญายอ 1 mg/l		
	V	P	Ot	V	P	Ot	V	P	Ot
1	59.0 $\pm$ 6.8	22.9 $\pm$ 5.8	18.1 $\pm$ 3.3	58.7 $\pm$ 7.1	24.9 $\pm$ 5.9	20.0 $\pm$ 11.8	55.3 $\pm$ 5.5	23.8 $\pm$ 4.0	20.9 $\pm$ 7.1
3	55.4 $\pm$ 7.1	24.7 $\pm$ 6.8	19.9 $\pm$ 7.2	50.7 $\pm$ 9.3	26.6 $\pm$ 4.4	22.7 $\pm$ 8.4	52.8 $\pm$ 10.1	24.8 $\pm$ 7	22.4 $\pm$ 8.7
7	53.6 $\pm$ 5.6	27.3 $\pm$ 5.9	19.1 $\pm$ 8.0	53.0 $\pm$ 7.7	27.3 $\pm$ 4.9	19.7 $\pm$ 7.4	56.1 $\pm$ 10.2	27.2 $\pm$ 7.5	16.7 $\pm$ 6.1

¹ ประชากรแบคทีเรียในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้งเฉลี่ยจากการตรวจสอบตัวอย่างน้ำ 10 แห่ง

2.3.4 ผลกระทบของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของแพลงก์ตอน

2.3.4.1 การศึกษาผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์

1) ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของ *Chorella* sp.

จากการทดลองปรากฏว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Chorella* sp. (ตารางที่ 23) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในตู้ควบคุมกับตู้ที่ใส่สารพญายอมีปริมาณ *Chorella* sp. ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 23 ปริมาณของ *Chorella* sp. ในตู้ควบคุมและในตู้ที่ใส่สารสกัดพญายอ ความเข้มข้น 4 ระดับ

ระยะเวลา (วัน)	ความหนาแน่นของ <i>Chlorella</i> ($\times 10^4$ cell/ml)				
	ความเข้มข้นสารพญายอ (mg/l)				
	0	0.1	1	10	100
1	18.0	18.0	19.0	19.6	19.7
2	30.9	32.7	29.1	31.7	32.0
3	47.3	43.5	44.4	47.3	47.3
4	51.0	52.1	48.2	57.0	53.0
5	72.0	71.8	73.2	74.0	76.3
6	86.9	88.8	83.8	88.3	92.8
7	100.0	119.0	99.5	120.0	100.0
8	261.5	269.0	275.5	265.0	270.8

2) ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของ *Tetraselmis* sp.

จากการทดลองพบว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Tetraselmis* sp (ตารางที่ 24) ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณเซลล์ในตู้ควบคุมกับตู้ที่ใส่สารพญายอไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 24 ปริมาณของ *Tetraselmis* sp. ในตู้ควบคุมและในตู้ที่ใส่สารสกัดพญายอ ความเข้มข้น 4 ระดับ

ระยะเวลา (วัน)	ความหนาแน่นของ <i>Tetraselmis</i> ($\times 10^4$ cell/ml)				
	ความเข้มข้นในสารพญายอ (mg/l)				
	0	0.1	1	10	100
1	4.4	4.3	4.6	4.4	4.5
2	7.8	7.6	7.9	7.7	7.8
3	15.0	15.3	15.4	15.0	15.9
4	21.8	21.7	22.3	23.9	22.0
5	38.2	39.0	38.6	37.4	37.7
6	54.5	59.5	56.7	53.5	56.4
7	59.8	61.2	60.0	59.3	62.2
8	67.1	69.7	68.0	70.1	67.1

3) ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโต *Skeletonema costatum*

จากการทดลองพบว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Skeletonema costatum* (ตารางที่ 25) ซึ่งจำนวนเซลล์ในทุกตู้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 25 ปริมาณของ *Skeletonema costatum* ในตู้ควบคุมและตู้ที่ใส่สารสกัดพญายอ ความเข้มข้น 4 ระดับ

ระยะเวลา (วัน)	ความหนาแน่นของ <i>Skeletonema</i> ($\times 10^4$ cell/ml)				
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)				
	0	0.1	1	10	100
1	3	2.8	2.8	3.2	3.2
2	4.9	5.3	5.9	5.9	5.6
3	6.4	6.4	7.1	6.9	6.4
4	9.7	9.7	10.5	10.1	10.2
5	9.9	9.8	9.4	9.5	9.7
6	6.4	6.2	6.7	5.9	6.1
7	2.6	2.1	2.9	2.7	2.4

4) ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของ *Spirulina platensis*

Spirulina platensis เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืด สามารถเจริญเติบโตในน้ำเค็มและสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากมันมีลักษณะเป็นเส้นที่มีความยาวไม่เท่ากัน จึงตรวจสอบการเพิ่มจำนวนโดยการวัดค่า Optical Density (O.D.) แทนการนับจำนวนด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของมัน (ตารางที่ 26) ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณของสาหร่ายในตู้ทดลองเกือบทุกตู้มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 26 ปริมาณของ *Spirulina platensis*, (ค่า O.D.) ตู้ควบคุมและตู้ที่ใส่สารสกัดพญายอ ความเข้มข้น 4 ระดับ ต่าง ๆ

ระยะเวลา (วัน)	ความหนาแน่นของ <i>Spirulina</i> ($\times 10^4$ cell/ml)				
	ความเข้มข้นสารพญายอ (mg/l)				
	0	0.1	1	10	100
1	0.19	0.19	0.19	0.19	0.20
2	0.23	0.24	0.24	0.24	0.26
3	0.29	0.28	0.29	0.29	0.30
4	0.33	0.33	0.34	0.34	0.35
5	0.41	0.41	0.41	0.40	0.40
6	0.42	0.42	0.43	0.44	0.45
7	0.57	0.54	0.55	0.56	0.58
8	0.66	0.62	0.63	0.65	0.66

5) ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*)

เมื่อทดลองเลี้ยงโรติเฟอร์ 10 ตัว/ml. ด้วย *Chlorella* 5×10^6 cell/ml. ที่อุณหภูมิ 30 °C ทั้งหมด 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยในตู้ทดลองใส่สารสกัดพญายอความเข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 10 และ 100 mg/l เป็นเวลา 2 วัน ทำ 2 ครั้ง พบว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโรติเฟอร์ ภายใน 2 วัน โดยโรติเฟอร์จะเพิ่มจำนวนได้มากกว่าเดิม 11-12.8 เท่า (ตารางที่ 27)

ตารางที่ 27 ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของ โรติเฟอร์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)	โรติเฟอร์เริ่มต้น (cell/ml)	โรติเฟอร์สิ้นสุด (cell/ml)	การเพิ่ม (เท่า)
0.0	10	128	12.3
0.1	10.5	119.3	11.4
1.0	11.5	138.8	12.0
1.0	12.5	136.8	11.1
100	12.5	156.4	12.8

6) ผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.)

เมื่อนำอาร์ทีเมียมาเลี้ยงในขวดแก้วรูปทรงกระบอกขนาด 10 ลิตร โดยให้รำละเอียดเป็นอาหาร และทดสอบผลของสารสกัดพญายอต่อการเจริญเติบโตของอาร์ทีเมียโดยเติมสารลงไป 5 ระดับ คือ 0, 0.1, 1.0, 10 และ 100 ppm เลี้ยงอาร์ทีเมียเป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเจริญเติบโต (ความยาว) และอัตราการรอดแล้วพบว่าสารสกัดพญายอ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของอาร์ทีเมีย (ตารางที่ 28-29)

ตารางที่ 28 ปริมาณการรอดตายของอาร์ทีเมีย (%) ที่เลี้ยงในน้ำที่ไม่ได้เติมและในน้ำที่เติมสารสกัดพญายอในระดับ 0.1, 1.0, 10 และ 100 mg/l

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณอาร์ทีเมีย(ตัว)				
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)				
	0	0.1	1	10	100
1	100	100	100	100	100
2	100	95.2	94.5	88.3	85.7
3	90.6	87.3	93.1	84.4	81.5
4	82.6	76.7	90.3	80.5	75.7
5	60.0	63.5	87.5	73.4	74.3
6	60.0	57.6	58.2	62.4	58.6

ตารางที่ 29 การเจริญเติบโต (ความยาว) ของอาร์ทีเมียที่เลี้ยงในน้ำที่ไม่ได้เติมและเติมสารสกัด
พญายอในระดับ 0.1, 1.0, 10 และ 100 mg/l

ระยะเวลา (วัน)	ความยาวของอาร์ทีเมีย (μ)				
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)				
	0	0.1	1.0	10	100
1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
3	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1
4	1.9	1.8	1.8	1.7	1.8
5	2.7	2.2	2.2	2.1	2.0
6	3.0	2.9	2.9	2.8	2.9

2.3.4.2 ผลกระทบของสารพญายอที่เติมลงไปในน้ำต่อแพลงก์ตอนตัวแทนจากห้องปฏิบัติการ

แพลงก์ตอนที่พบในน้ำตัวอย่างจากอ่าวเลี้ยงกุ้งทั้ง 10 ตัวอย่าง แยกได้ชนิดที่เป็น dominant และพบบ่อยที่สุดจำนวน มี 4 ชนิด คือ

- 1) *Trichodesmium* sp.
- 2) *Spirulina* sp.
- 3) *Chlorella* sp.
- 4) *Chaetoceros* sp.

1) *Trichodesmium* sp.

จากการแยกชนิดแพลงก์ตอนในน้ำตัวอย่างพบว่า *Trichodesmium* sp. เป็นชนิดที่พบได้สูงมากคือ พบ 9 ใน 10 ครั้งที่น่าตัวอย่างมาศึกษา และเมื่อทดสอบผลกระทบของสารพญายอแล้วปรากฏว่า สารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนชนิดนี้ (ตารางที่ 30) ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณของ *Trichodesmium* sp. แตกต่างกันไปเล็กน้อยและไม่มีความสำคัญ

2) *Spirulina* sp.

จากการแยกชนิดแพลงก์ตอนในน้ำตัวอย่างจากนากุ้ง 10 แหล่ง พบว่า *Spirulina* sp. มีอยู่ในน้ำทั้ง 4 ใน 10 ปริมาณน้อย แต่อย่างไรก็ตามแพลงก์ตอนชนิดนี้มีความสำคัญจึงจำเป็นต้อง

ศึกษาและพบว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนนี้ (ตารางที่ 31) ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณของ *Spirulina* sp. ในตู้ทดลองต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 30 ปริมาณของ *Trichodesmium* sp. ($\times 10^4$ cell/ml.) ในน้ำชุดควบคุมและชุดที่เติมสาร

พญายอความเข้มข้น 3 ระดับ			
ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณ <i>Trichodesmium</i> sp. ($\times 10^4$, cell/ml)		
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)		
	0	0.1	1.0
1	47.5	46.9	42.3
2	46.4	42.1	41.2
3	34.0	39.5	36.8
4	36.3	42.0	41.6
5	34.5	42.3	34.7
6	36.3	37.9	30.3
7	27.9	30.0	29.4
8	14.0	18.2	15.8

ตารางที่ 31 ปริมาณของ *Spirulina* sp. ($\times 10^4$ cell/ml) ในความเข้มข้นของสารสกัดพญายอ 3 ระดับ

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณ <i>Spirulina</i> sp. ($\times 10^4$ cell/ml)		
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)		
	0	0.1	1.0
1	1.2	1.4	1.1
2	1.4	1.2	1.2
3	0.8	0.9	0.8
4	1.0	0.8	0.7
5	0.8	0.5	0.9
6	0.4	0.5	0.2

3) *Chorella* sp.

Chorella sp. เป็นแพลงก์ตอนที่พบทุกครั้งที่นำตัวอย่างน้ำจากนาุ้งมาศึกษา และจากการทดลองพบว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนชนิดนี้ (ตารางที่ 32) ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณของ *Chorella* sp. ในตู้ต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4) *Chaetoceros* sp.

Chaetoceros sp. ที่พบจะเป็นกลุ่มที่เซลล์ต่อกันเป็นสายยาว มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก พบ 5 ใน 10 ครั้งที่ทำการศึกษาในปริมาณที่ต่ำมากอยู่ในช่วง $1 \times 10^3 - 6.3 \times 10^4$ cell/ml. และพบในช่วงสั้นเพียง 1-4 วัน โดยมีปริมาณลดลงตามเวลาที่เลี้ยง หรือกล่าวได้ว่าไม่มีการเจริญเติบโตของ *Chaetoceros* sp. ในน้ำตัวอย่างที่นำมาศึกษา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดพญายอไม่มีผลต่อการลดลงของแพลงก์ตอนชนิดนี้ (ตารางที่ 33) โดยแสดงให้เห็นผลจากการทดลอง ซึ่งพบ *Chaetoceros* sp. มีอายุยาวนานที่สุดคือ 4 วันเท่านั้น ปริมาณที่พบในตู้ทดลองมีระดับใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 32 ปริมาณของ *Chorella* sp. ($\times 10^4$ cell/ml) ในความเข้มข้นของสารสกัดพญายอ 3 ระดับ

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณ <i>Chorella</i> sp. ($\times 10^4$ cell/ml)		
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)		
	0	0.1	1.0
1	25.0	25.7	26.9
2	30.5	26.5	28.1
3	18.0	18.1	18.7
4	13.8	14.0	12.7
5	12.0	12.9	10.9
6	11.8	12.1	11.4
7	10.3	11.4	9.5

ตารางที่ 33 ปริมาณของ *Chaetoceros* sp. ($\times 10^4$ cell/ml.) ในความเข้มข้นของสารสกัดพญายอ 3 ระดับ

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณ <i>Chaetoceros</i> sp. ($\times 10^4$ cell/ml)		
	ความเข้มข้นพญายอ (mg/l)		
	0	0.1	1.0
1	4.5	5.3	5.6
2	1.3	2.0	1.1
3	0.4	0.1	0.2
4	0.2	0.4	0.1

2.3.5 ผลกระทบของสารพญายอต่อคุณภาพน้ำที่สำคัญบางประการ

2.3.5.1 ผลของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นด่างในน้ำ (Alkalinity)

จากการทดลองทั้งหมด 10 ตัวอย่างปรากฏว่ามีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ค่า Alkalinity ในชุดควบคุมและชุดใส่สารพญายอในปริมาณ 0.1 mg/l แตกต่างจาก ชุดที่ใส่สารสกัดพญายอในปริมาณ 10 เท่า อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 34) ส่วนการทดลองตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งอื่น ๆ อีก 9 บ่อ ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งตลอดระยะเวลาการทดลอง Alkalinity มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 21.25 – 129.46 mg/l

ตารางที่ 34 ค่าเฉลี่ย (Alkalinity) ในชุดทดลองที่เติมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0, 0.1 และ 1 mg/l ในการทดสอบตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 10 บ่อ

ปริมาณพญายอ ในน้ำ (mg/l)	ค่าเฉลี่ย Alkalinity (mg/l)									
	จำนวนตัวอย่างน้ำ (บ่อ)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	25.04 ^a	34.21 ^a	48.29 ^a	71.50 ^b	67.92 ^a	56.08 ^a	21.25 ^a	54.87 ^a	128.87 ^a	79.87 ^a
0.1	24.00 ^a	34.67 ^a	46.17 ^a	71.00 ^b	65.50 ^a	57.54 ^a	21.67 ^a	52.58 ^a	129.46 ^a	78.92 ^a
1.0	24.04 ^a	33.25 ^a	44.25 ^a	69.13 ^a	62.88 ^a	55.21 ^a	22.54 ^a	54.67 ^a	126.42 ^a	78.54 ^a

2.3.5.2. ผลของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของ BOD ในน้ำ

จากการทดลองเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งมาตรวจสอบจำนวน 10 แห่ง มีการทดลอง 2 ครั้งที่ไม่สามารถจะนำข้อมูลมาคำนวณได้ เนื่องจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิ 20°

C ที่ตลอดทั้ง 5 วัน จึงมีข้อมูลในการทดลองเพียง 8 บ่อเท่านั้น และปรากฏว่าผลการทดลอง 2 ครั้งที่ BOD จากการใส่สารสกัดพญายอในปริมาณ 10 เท่าแตกต่างกันชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 35) และผลจากการทดลอง 1 บ่อที่มีค่า BOD ในชุดที่ใส่สารสกัดพญายอในปริมาณ 0.1 mg/l แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและมีการทดลองอีก 1 บ่อที่มีค่า BOD ในชุดที่ใส่สารสกัดพญายอทั้ง 2 ระดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในการทดลองครั้งอื่นๆ มีค่า BOD ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าเฉลี่ย BOD เปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 1.90 – 8.89 mg/l

2.3.5.3. ผลของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า COD ในน้ำ

จากการทดลองน้ำจากบ่อกึ่งจำนวน 10 ตัวอย่าง ปรากฏว่ามีในตัวอย่างน้ำจาก 2 บ่อ มีค่าเฉลี่ย COD ที่คำนวณจากการใส่สารสกัดพญายอ 10 เท่า (1 mg/l) มีความแตกต่างกับชุดทดลองที่ใช้เป็นตัวควบคุม (0 mg/l) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 36) และในตัวอย่างอีกจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ใส่สารสกัดพญายอทั้ง 2 ระดับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (0 mg/l) ส่วนการทดลองตัวอย่างน้ำจากบ่ออื่น ๆ ได้ครั้งอื่น ๆ ค่า COD ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยในระยะที่ทำการทดลองค่า COD มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 53.34 – 126.06 mg/l

2.3.5.4. ผลของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในน้ำ

จากผลการทดลองน้ำจากบ่อกึ่งจำนวน 10 บ่อ พบว่าค่าเฉลี่ย pH ของน้ำทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่ค่า pH เฉลี่ย ตลอดระยะเวลาของการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 6.85 – 8.49 (ตารางที่ 37)

ตารางที่ 35 ค่าเฉลี่ย (BOD) ในชุดทดลองที่เติมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0, 0.1 และ 1 mg/l ในการทดสอบตัวอย่างน้ำจากบ่อกึ่ง 10 บ่อ

ปริมาณพญายอ ในน้ำ (mg/l)	ค่าเฉลี่ย BOD (mg/l)									
	จำนวนตัวอย่างน้ำ (บ่อ)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	5.95 ^a	6.91 ^{ab}	3.04 ^a	7.09 ^a	8.89 ^a	ND	ND	2.14 ^a	1.97 ^a	3.31 ^a
0.1	6.21 ^{ab}	7.33 ^b	2.71 ^a	7.02 ^a	8.89 ^a	ND	ND	1.90 ^a	2.44 ^{ab}	3.77 ^b
1.0	6.98 ^b	6.52 ^a	3.34 ^a	7.25 ^a	8.84 ^a	ND	ND	1.97 ^a	2.93 ^b	2.68 ^a

ND = ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 36 ค่าเฉลี่ย (COD) ในชุดทดลองที่เติมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0, 0.1 และ 1 mg/l ใน การทดสอบตัวอย่างน้ำจากบ่อกึ่ง 10 บ่อ

ปริมาณพญายอ ในน้ำ (mg/l)	ค่าเฉลี่ย COD (mg/l)									
	จำนวนตัวอย่างน้ำ (บ่อ)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	58.99 ^a	75.00 ^a	95.42 ^b	116.10 ^a	119.51 ^a	114.53 ^a	71.61 ^a	60.98 ^a	53.34 ^a	81.55 ^a
0.1	63.52 ^{ab}	79.15 ^a	78.35 ^a	115.35 ^a	121.18 ^a	121.07 ^a	64.48 ^a	66.14 ^{ab}	55.67 ^a	75.03 ^a
1.0	70.29 ^b	78.49 ^a	86.81 ^{ab}	126.06 ^a	122.98 ^a	122.49 ^a	79.67 ^a	74.37 ^b	58.03 ^a	78.70 ^a

ตารางที่ 37 ค่าเฉลี่ย (pH) ในชุดทดลองที่เติมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0, 0.1 และ 1 mg/l ใน การทดสอบตัวอย่างน้ำจากบ่อกึ่ง 10 บ่อ

ปริมาณพญายอ ในน้ำ (mg/l)	ค่าเฉลี่ย pH									
	จำนวนตัวอย่างน้ำ (บ่อ)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	7.38 ^a	7.57 ^a	7.74 ^a	8.22 ^a	8.36 ^a	8.49 ^a	6.85 ^a	7.77 ^a	8.24 ^a	8.17 ^a
0.1	7.33 ^a	7.64 ^a	7.80 ^a	8.20 ^a	8.25 ^a	8.42 ^a	6.93 ^a	7.75 ^a	8.22 ^a	8.18 ^a
1.0	7.32 ^a	7.64 ^a	7.78 ^a	8.28 ^a	8.28 ^a	8.23 ^a	6.95 ^a	7.74 ^a	8.18 ^a	8.22 ^a

2.3.5.5. ผลของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า TKN ในน้ำ

ผลการทดลองน้ำจากบ่อกึ่งจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า TKN ของน้ำทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ในบ่อที่ 1, 2 และ 7 โดยที่ในชุดการทดลอง ที่เติมสารสกัดพญายอมีความเข้มข้นกว่าปกติ 10 เท่า (1 mg/l) มีค่า TKN มากกว่าชุดควบคุม (0 mg/l) 1 บ่อ ชุดการทดลองที่ใส่สารสกัดพญายอ 0.1 mg/l ปกติ มีค่า TKN น้อยกว่า ชุดควบคุม 1 บ่อ และค่า TKN ในชุดควบคุมและชุดเติมสารสกัดพญายอมีความเข้มข้นกว่าปกติ 10 เท่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองที่เติมสารสกัดพญายอ 0.1 mg/l ในบ่อที่ 7 โดยที่ตลอด ระยะเวลาการทดลอง TKN มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.84 – 2.24 mg/l (ตารางที่ 38)

ตารางที่ 38 ค่าเฉลี่ย (TKN) ในชุดทดลองที่เติมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0, 0.1 และ 1 mg/l ในการทดสอบตัวอย่างน้ำจากบ่อทุ่ง 10 บ่อ

ปริมาณพญายอ ในน้ำ (mg/l)	ค่าเฉลี่ย TKN (mg/l)									
	จำนวนน้ำตัวอย่าง (บ่อ)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	1.08 ^a	1.30 ^b	1.25 ^a	1.58 ^a	2.21 ^a	1.70 ^a	1.87 ^b	1.04 ^a	0.84 ^a	1.55 ^a
0.1	1.14 ^b	1.24 ^a	1.20 ^a	1.62 ^a	2.22 ^a	1.68 ^a	1.73 ^a	1.03 ^a	0.85 ^a	1.37 ^a
1.0	1.06 ^a	1.29 ^b	1.19 ^a	1.54 ^a	2.24 ^a	1.76 ^a	2.02 ^c	1.18 ^a	0.85 ^a	1.46 ^a

2.3.5.6. ผลของสารสกัดพญายอต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า TOC ในน้ำ

จากการทดสอบน้ำจากบ่อทุ่งทั้ง 10 ตัวอย่าง ปรากฏว่าน้ำจากบ่อทุ่งในตัวอย่างที่ 4 และ 5 เครื่องมือวิเคราะห์ TOC เกิดการชำรุดใช้งานไม่ได้ จึงคงเหลือการทดลองตัวอย่างเพียง 8 ตัวอย่าง พบว่ามีน้ำจากบ่อทุ่ง 3 บ่อคือบ่อ 1, 7 และ 9 มีค่า TOC จากชุดเติมสารสกัดพญายอ เข้มข้นกว่าปกติ 10 เท่า (1 mg/l) แตกต่างกับชุดควบคุมและชุดที่เติมสารสกัดพญายอ 0.1 mg/l โดยที่ตลอดระยะเวลาของการทดลองค่าเฉลี่ย TOC อยู่ระหว่าง 1.52 – 9.01 mg/l (ตารางที่ 39)

ตารางที่ 39 ค่าเฉลี่ย (TOC) ในชุดทดลองที่เติมสารสกัดพญายอในปริมาณ 0, 0.1 และ 1 mg/l ในการทดสอบตัวอย่างน้ำจากบ่อทุ่ง 10 บ่อ

ปริมาณพญายอ ในน้ำ (mg/l)	ค่าเฉลี่ย TOC (mg/l)									
	จำนวนน้ำตัวอย่าง (บ่อ)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.0	4.02 ^a	7.32 ^a	6.04 ^a	ND	ND	8.81 ^a	0.51 ^a	1.52 ^a	2.02 ^a	2.85 ^a
0.1	4.43 ^{ab}	8.56 ^a	6.48 ^a	ND	ND	9.01 ^a	0.44 ^{ab}	1.62 ^a	2.20 ^a	2.47 ^a
1.0	4.54 ^b	7.47 ^a	6.55 ^a	ND	ND	8.80 ^a	0.65 ^b	1.73 ^a	2.48 ^b	2.57 ^a

2.3.6 กิจกรรมที่ทำเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลในการทดลองงวดที่ 2

2.3.6.1 ผลการศึกษาการสะสมของปริมาณสารสกัดพญายอในเลือดกุ้ง

ปริมาณของสารสกัดพญายอในเลือดกุ้งที่กินอาหารผสมพญายอในอัตรา 0.1 g/kg วันละ 3 มื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีสารสะสมในเลือด 3.08 ug/ml และเมื่อกุ้งกินพญายอต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงระยะ 14, 21 และ 28 วัน ปริมาณของพญายอในเลือดจะสะสมมากขึ้นตามลำดับคือ 33.85, 141.59 และ 284.38 ug/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงเกินค่าที่จะไปยับยั้งเชื้อไวรัสหลายร้อยเท่า (ตารางที่ 40)

ตารางที่ 40 ปริมาณของสารพญายอที่สะสมในเลือดกึ่งกลางดำที่ได้รับสารโดยการกินอาหารผสม พญายอในอัตรา 0.1 g/kg อาหารวันละ 3 มื้อติดต่อกัน

ระยะเวลาที่กึ่งกินอาหาร (วัน)	ปริมาณสารพญายอเฉลี่ยที่พบในเลือด (µg/ml)
ชุดควบคุม	0
7	3.08
14	33.85
21	141.59
28	284.38

2.3.6.2 ผลของการทดสอบประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัส หัวเหลืองโดย การกินพญายอ

ผลการทดสอบให้กึ่งกินอาหารผสมในอาหารในอัตรา 0.1 g/kg ทุกวัน ติดต่อกันเป็น ระยะ 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้วจึง Challenge เชื้อไวรัส แสดงไว้ในตารางที่ 26 การทดสอบในหัว ข้อนี้ได้ทำซ้ำ 4 ครั้ง เพื่อให้ได้ผลที่แน่นอน ปรากฏว่า อัตราการรอดของกึ่งกลางดำที่ได้รับสารพญายอ เป็นระยะ 7-14 วัน มีระดับสูงขึ้นตามลำดับของระยะเวลาที่กึ่งได้รับสาร คือตั้งแต่ 50.00 จนถึง 72.22% และในกึ่งที่ได้รับสารพญายอเป็นเวลา 21-28 วัน มีอัตราการรอดตายที่ 55.60 และ 94.44% ตามลำดับ (ตารางที่ 41) ส่วนในชุดควบคุมกึ่งมีอัตราตายถึง 100% เมื่อคิดค่า RPS แล้ว จะอยู่ในเกณฑ์ 50.00-94.44%

ตารางที่ 41 ประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัสหัวเหลือง (YHV) โดยการผสม อาหารให้กึ่งกินติดต่อกันเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

ระยะเวลากิน พญายอ (วัน)	อัตราการรอดตายของกึ่งหลังการ challenge			เฉลี่ย	% RPS
	1	2	3		
ชุดควบคุม	0	0	0	0	0
7	66.67	66.67	16.67	50.00	50.00
14	100	100	16.67	72.22	72.22
21	66.67	33.33	66.67	55.60	55.60
28	100	100	83.33	94.44	94.44

2.3.6.3 ผลของการศึกษาประสิทธิภาพของพญายอในการป้องกันไวรัสหัวเหลืองโดยวิธีแช่กุ้งในสารละลายพญายออัตรา 0.1 mg/l

การทดลองประสิทธิภาพของพญายอโดยวิธีแช่กุ้ง ผลปรากฏว่าหลังจากการแช่กุ้งในสารพญายอได้ 1 ชั่วโมง แล้วจึง challenge เชื้อ พบว่ากุ้งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย 66.67% ในขณะที่ชุดควบคุมรอดตาย 16.67% คิดค่า RPS ได้ 60.00% และเมื่อแช่กุ้งในสารละลายพญายอต่อไปเป็นเวลา 9 วัน จะมีอัตราการรอดตายต่ำกว่าชุดควบคุม โดยคิดค่า RPS ได้ 15.69% (ตารางที่ 42)

ตารางที่ 42 ประสิทธิภาพของสารพญายอในการป้องกันโรคไวรัสหัวเหลือง (YHV) โดยวิธีแช่น้ำทะเลที่เติมสารพญายอเพียงครั้งเดียวและทิ้งไว้เป็นเวลานาน • 1 ชั่วโมง และ 9 วัน ก่อนที่จะนำมาแช่กุ้งที่ถูก challenge เชื้อไวรัส

อายุของสารละลายพญายอ	อัตราการรอดตายของกุ้งหลังจากการ challenge					
	1	2	3	4	เฉลี่ย	% RPS
ชุดควบคุม	0	16.67	16.67	16.67	16.67	0
1 ชั่วโมง	66.67	83.33	50	66.67	66.67	60.00
9 วัน	50	33.34	20	16.67	29.75	15.69

2.3.6.4 ผลข้างเคียงของพญายอต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารพญายอโดยการกิน ในอัตรา 0.01, 0.1 และ 1 g/kg เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

การศึกษาจากค่า agglutinin titer ของเลือดกุ้งที่ได้รับสารพญายอโดยการกินแสดงไว้ในตารางที่ 43-46 ปรากฏว่า agglutinin titer ในกลุ่มที่ได้รับสารพญายอทั้ง 3 ระดับ เป็นเวลา 7 วัน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนกุ้งที่ได้รับสารพญายอเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ในชุดควบคุมมีค่า agglutinin titer ต่ำกว่าชุดที่ได้รับสารพญายอทุกชุด และชุดที่ได้รับสารปริมาณสูงจะมีค่า agglutinin titer สูงกว่าชุดที่ได้รับสารปริมาณต่ำ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ $P = .001$ และ $.002$ (ตารางที่ 44)

เมื่อกุ้งกินพญายอต่อไปเป็นเวลา 21 วัน agglutinin titer ในชุดควบคุมและชุดที่กินสารจะมีระดับใกล้เคียงกันมากจนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 45) กุ้งที่ได้รับสารพญายอติดต่อกันเป็นเวลา 28 วัน จะมีค่า agglutinin แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.001$ และ $P = 0.006$ โดยชุดควบคุมมีค่า agglutinin titer สูงกว่าชุดที่ได้รับสารทุกชุด และชุดที่ได้รับสารพญายอ 1 g/kg มี agglutinin titer ต่ำที่สุด (ตารางที่ 46)

ตารางที่ 43 ระดับของการจับตัวตกตะกอน (Agglutinin titer) ของเลือดกุ้งที่ได้รับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้กินติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน

ปริมาณพญายอที่ผสม ใน อาหาร (g/kg)	ระดับการจับตัวตกตะกอนของเลือดกุ้ง		
	1	2	เฉลี่ย
ชุดควบคุม	1936 ± 1602	108 ± 61	1022
0.01	757 ± 670	94 ± 58	425.5
0.10	1003 ± 1132	110 ± 47	556.6
1.00	1413 ± 1347	87 ± 33	750
ANOVA	P = 0.3	P = 0.5	

ตารางที่ 44 ระดับของการจับตัวตกตะกอน (Agglutinin titer) ของเลือดกุ้งที่ได้รับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้กินติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน

ปริมาณพญายอที่ผสม ใน อาหาร (g/kg)	ระดับการจับตัวตกตะกอนของเลือดกุ้ง		
	1	2	เฉลี่ย
ชุดควบคุม	75 ^a ± 55.9	75 ^a ± 24	75
0.01	165 ^a ± 66	96 ^{ab} ± 32	130.5
0.10	128 ^b ± 64	117 ^{ab} ± 24	122.5
1	165 ^b ± 157	149 ^b ± 48	157
ANOVA	P = .001	P = .002	

ตารางที่ 45 ระดับของการจับตัวตกตะกอน (Agglutinin titer) ของเลือดกุ้งที่ได้รับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้กินติดต่อกันเป็นเวลา 21 วัน

ปริมาณพญายอที่ผสม ใน อาหาร (g/kg)	ระดับการจับตัวตกตะกอนของเลือดกุ้ง		
	1	2	เฉลี่ย
ชุดควบคุม	557 ± 507	89 ± 65	323
0.01	211 ± 158	101 ± 38	156
0.10	412 ± 387	76 ± 36	244
1.00	323 ± 173	117 ± 68	220
ANOVA	P = 0.1	P = 0.5	

ตารางที่ 46 ระดับของการจับตัวตกตะกอน (Agglutinin titer) ของเลือดกุ้งที่ได้รับสารพญายอโดยการผสมอาหารให้กินติดต่อกันเป็นเวลา 28 วัน

ปริมาณพญายอที่ผสม ใน อาหาร (g/kg)	ระดับการจับตัวตกตะกอนของเลือดกุ้ง		
	1	2	เฉลี่ย
ชุดควบคุม	685 ^a + 661	60 ^a + 26	372.5
0.01	229 ^{ab} + 159	28 ^b + 23	128.5
0.1	307 ^{ab} + 542	52 ^b + 17	179.5
1	69 ^b + 45	16 ^b + 11	42.5
ANOVA	P = 0.006	P = 0.001	

3.3. สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการวิจัยของโครงการพัฒนาการใช้พญายอในการป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำที่ได้ดำเนินการมาในช่วง 1 มกราคม ถึง 31 สิงหาคม 2541 สรุปได้ดังนี้

3.3.1 การศึกษาผลกระทบของการใช้พญายอต่อกุ้งกุลาดำ การใช้พญายอโดยผสมอาหารให้กุ้งกินในระดับ 0.1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และแม้จะเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าของปริมาณนี้ โดยให้กุ้งกินทุกมื้อทุกวันเป็นเวลาติดต่อกันนานถึง 28 วัน ปรากฏผลดังนี้

3.3.1 ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำทั้งทางด้านน้ำหนักและ
ความยาวของตัวกุ้ง

3.3.2 ไม่มีผลกระทบต่อชนิดและปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำ

3.3.3 ไม่มีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในแง่ humoral immune system ในตัวกุ้ง
กุลาดำ

3.3.4 ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนที่เป็นตัวแทนในการทดลองแต่
อย่างใด

3.3.5 ไม่มีผลกระทบต่อระบบเนื้อเยื่อภายในตัวกุ้งโดยเฉพาะในอวัยวะที่สำคัญ
ได้แก่ ตับ/ตับอ่อน และลำไส้

3.3.2 การศึกษาผลกระทบของการใช้พญายอต่อสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง กรณี
ที่จะใช้พญายอโดยวิธีแช่จำเป็นต้องละลายสารพญายอลงในน้ำและเมื่อทดลองใช้พญายอใน
ปริมาณ 0.1 mg/l จนถึง 1 mg/l ละลายลงในน้ำที่นำมาจากบ่อเลี้ยงกุ้ง จะไม่ทำให้เกิดผลกระทบ
ต่อสิ่งแวดล้อมในน้ำที่ทดสอบดังนี้

3.4.1 ไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อชนิดและปริมาณแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอน
สัตว์ในน้ำเลี้ยงกุ้งแต่ประการใด

3.4.2 ไม่ทำให้คุณภาพน้ำที่สำคัญๆ ในแง่ของการเพาะเลี้ยงต่ำลง หรือมีการเปลี่ยน
ไปจากปกติแต่อย่างใด

3.4.3 ปริมาณแบคทีเรียรวมและไวรัสยังคงอยู่ในระดับปกติ ตลอดระยะเวลาการ
ใช้สารพญายอ

ดังนั้นการใช้สารพญายอโดยวิธีผสมอาหารให้กินในปริมาณ และระยะเวลาที่กำหนดจากการ
วิจัยครั้งนี้ จะไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพ และการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ และการใช้โดยวิธี
ละลายลงในน้ำจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาในด้านสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง และในแหล่งน้ำธรรมชาติอีก
ด้วย

3.3.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอในการป้องกันโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อ
YHV โดยการผสมพญายอในอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้กุ้งกินติดต่อกันนาน 7, 21 และ 28 วัน พบว่าใน
การทดสอบครั้งแรกในช่วงกิจกรรมงวดที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของพญายอต่อไวรัส YHV และ
SEMBV จำเป็นต้องมีการทดสอบซ้ำ เนื่องจากตัวอย่างกุ้งที่นำมาทดสอบในระยะเวลาต่าง ๆ กันมา
จากแหล่งที่แตกต่างกัน และครีววิจัยได้เก็บตัวอย่างกุ้งไว้ในบ่อ stock เป็นเวลานานเกินไป กุ้งที่
ทดสอบในชุดหลัง ๆ จึงค่อนข้างอ่อนแอ ทำให้ผลการทดลองทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่ม challenge
มีความผันแปรมาก หลังจากการทดสอบซ้ำในกิจกรรมงวดที่ 3 ผลปรากฏว่ากุ้งที่ได้รับสารพญายอมี

อัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้กินอาหารผสมพญายอและประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสจะสูงขึ้นในชุดที่ได้รับสารพญายอติดต่อกันเป็นระยะเวลานานขึ้น

3.3.4 ประสิทธิภาพของสารสกัดพญายอในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส YHV

โดยวิธีแช่กุ้ง พบว่าการแช่กุ้งในระยะ 1 ชั่วโมงแรกหลังจากการเติมสารสกัดพญายอละลายลงไปในน้ำจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค ได้สูงกว่าและเมื่อทิ้งสารละลายไว้นาน 9 วัน ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจะลดลงจนเกือบหมด

4. ข้อคิดเห็นและเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลืองครั้งนี้ พบว่า ผลเฉลี่ยอัตราการรอดตายของกุ้งในการทดลองโดยการให้กินสารอยู่ในระดับที่พอจะใช้ได้ คือมีค่า RPS อยู่ระหว่าง 50-94% แม้ว่าการทดลองบางชุดจะมีระดับที่ยังไม่สูงนัก และการใช้โดยวิธีแช่จะมีค่า RPS อยู่ในช่วง 60% ซึ่งให้ผลค่อนข้างจะดีกว่าในระยะชั่วโมงแรก แต่เมื่อสังเกตผลจากการทดลองในแต่ละซ้ำหรือตู้ทดลองแต่ละตู้แล้วปรากฏว่าประสิทธิภาพในการป้องกันโรคยังไม่สม่ำเสมอและไม่คงที่ โดยจะมีการแปรปรวนอยู่ในช่วง 50, 70 และ 90% ทั้งนี้อาจจะขึ้นอยู่กับสุขภาพของกุ้งแต่ละชุดที่นำมาใช้ในการทดลอง ผลที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นค่าโดยประมาณเท่านั้น

ข้อคิดเห็นอีกประการหนึ่งก็คือ การใช้สารพญายอจำเป็นจะต้องใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน เนื่องจากความคงตัวของสารพญายอจะลดลงค่อนข้างเร็วหลังจากการหยุดให้สารแก่กุ้ง ดังนั้นวิธีการเช่นนี้ ผู้ใช้ที่ต้องการสารพญายอควรจะทำความเข้าใจให้ดีและมีการเตรียมสารไว้ให้พร้อมที่จะใช้ติดต่อกันได้อย่างไม่ติดขัด

จากการศึกษาในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยขั้นต่อไปดังนี้

1. ควรมีการวิจัยในด้านการสกัดสารออกฤทธิ์จากพญายอเพื่อให้ได้สารที่สามารถยับยั้งหรือป้องกันไวรัส ซึ่งจะช่วยให้มีความสะดวกในการเก็บรักษาและการใช้งานให้ได้ประสิทธิภาพอย่างสม่ำเสมอ
2. วิจัยในด้านการผสมสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ในอาหารเม็ดสำเร็จรูป โดยจะต้องไม่ทำให้สารออกฤทธิ์เสื่อมคุณภาพ
3. วิจัยถึงความคงตัวของสารที่เคลือบไว้หรือผสมอาหารเก็บไว้แล้วคงตัวได้นานเท่าไร เพื่อความประหยัดเวลาและการทำแบบอุตสาหกรรมได้
4. ทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันไวรัสกับพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส และอาจจะถ่ายทอดไปสู่ลูกกุ้ง ซึ่งจะช่วยในการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสได้ เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์กุ้งมีจำนวนน้อย การปฏิบัติงานจะค่อนข้างง่ายและรวดเร็วไม่ว่าจะใช้วิธีแช่หรือวิธีฉีด ที่จะทำให้งุ้งได้รับพญายอในปริมาณที่แน่นอนได้ง่ายและรวดเร็ว

5. ทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันไวรัสกับลูกกุ้งขนาด Postlarvae ระยะ 10 – 15 ซึ่งเป็นระยะที่เกษตรกรต้องการปล่อยลงเลี้ยง โดยใช้วิธีแช่พญาอไปในช่วงการขนส่งลูกกุ้งไปปล่อย ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการแพร่เชื้อไวรัสไปกับลูกกุ้งที่จะปล่อยลงบ่อเลี้ยงได้

เอกสารอ้างอิง

- ชลอ ลัมสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. บริษัทฐานเศรษฐกิจ จำกัด กรุงเทพฯ ฯ. หน้า 36-50.
- ธิดา เพชรมณี. 2538. ผลกระทบและการควบคุมปริมาณของแพลงก์ตอนพืชที่พบในบ่อกุ้ง. เอกสารประกอบการบรรยายในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่องกลยุทธ์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในสภาพการณ์ปัจจุบัน ระหว่างวันที่ 4-5 พฤศจิกายน 2538 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. 7 หน้า
- นภาศรี ธรรมครองอาตม์. 2518. การสำรวจสาหร่ายในเขตอำเภอเมืองสมุทรปราการ จังหวัดสมุทรปราการ. ปรินญาณพนธ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 165 หน้า
- ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และนิคม ละอองศิริวงศ์. 2540. การเปลี่ยนแปลงและความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำกับแพลงก์ตอนพืชในทะเลสาบสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2540. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง. 49 หน้า
- APHA, AWWA and WPCP. 1980. Standard method for the examination of water and waste water. 15th edition. American Public Health Publisher, New York. 1134 p.
- Baumann, P. and L. Baumann. 1981. The marine gram-negative eubacteria. In: Mortimer P. Starr et al. (eds.). The Prokaryotes Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin. 168 p.
- Bell, T. A. and Lightner, D. V. 1988. A handbook of normal Penaeid Shrimp Histology, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Cupp, E. E. 1943. Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. 236 p.
- Ruangpan, L. R. Tabkaew and K. Sangrungruang. 1994. Bacterial flora of intensive cultured black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Suisangoshoku 42:3(485-490).
- Ruangpan, L. R. Tabkaew, and K. Sangrungruang. 1995. Bacterial in ponds with different stocking densities of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In : Shariff M et al. (eds) Diseases in Asian Aquaculture II. Fish Health Section. Asian Fisheries Society Manila p. 141-149.

- Sritungalucksana K. 1995. Study of the humoral defense factors in the black tiger prawn, *Penaeus Monodon*. Master of Science Thesis Dept. of Biotechnology, Fac. Of Graduate Studies, Mahidol Univ. 95 p.
- Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Bulletin 167. Ottawa. 310 p.
- Taylor F. J. R. 1964. Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. Institute of Oceanography and Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, Canada. 133 p.
- Wood, E.J.F. 1986. Dinoflagellates of the Caribbean Sea and Adjacent Areas. University of Miami Press. Coral Gables, Florida. 143 p.