นิพนธ์ต้นฉบับ

การใช้สไปรูไลนา (*Spirulina platensis*) ในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระยะโพสท์ลาร์วาและระยะวัยรุ่น

ปิยาลัย เหมทานนท์[1] สถาพร ดิเรกบุษราคม[2] และวิษณุ บุญญาวิวัฒน์[3]

Abstract

Hemtanon, P.[1], Direkbusarakom, S.[2], and Bunyaviwat, V.[3]

Application of *Spirulina platensis* for prevention of white spot syndrome virus in post larvae and juvenile black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 253-263

In this study, the extract of *Spirulina platensis* were examined *in vitro* to inhibit white spot syndrome virus (WSSV) and application of dry *S. platensis* in diet for prevention of white spot syndrome (WSS) in post larvae and juvenile black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The results showed that the lowest concentration of the extract for inhibiting WSSV was 0.01 mg/ml, while the optimum concentration was found to be 0.1 mg/ml in which the mortality rate of the shrimp was 4 percents and infection was not detected from survival shrimp by the immunohistochemistry method.

Furthermore, The results showed that the survival rate of the post larvae fed on steamed egg containing dry *S. platensis* 5 g/kg of diet was higher than that of the control ($p<0.05$) when challenged with WSSV and no WSSV infected shrimp examine by polymerase chain reaction (PCR) assay. In the case of juvenile shrimp, the survival rate of shrimp fed pellets containing dry *S. platensis* 10 g/kg of diet was higher than that of the control group ($p<0.05$) after challenging with WSSV. Moreover percent of WSSV infection in the survival shrimp using the immunohistochemistry method was lower than that of the control group.

Key words : *Spirulina platensis*, white spot syndrome virus, black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

[1]Nakhon Si Thammarat Coastal Fisheries Research and Development Center, Sichon, Nakhon Si Thammarat 80120, [2]Institute of Agriculture Technology, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80160, [3]Faculty of Vaterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[1]วท.ม. (วิทยาศาสตร์การเกษตร) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง นักวิชาการประมง ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช 80120 [2]Ph.D. (Fish Diseases) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160 [3]Ph.D. (Veterinarian) คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Corresponding e-mail : piyalaih@yahoo.com

รับต้นฉบับ 15 พฤศจิกายน 2547 รับลงพิมพ์ 1 กุมภาพันธ์ 2548

บทคัดย่อ

ปิยาลัย เหมทานนท์ สถาพร ดิเรกบุษราคม และ วิษณุ บุญญาวิวัฒน์

การใช้สไปรูไลนา (*Spirulina platensis*) ในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระยะโพสท์ลาร์วาและระยะวัยรุ่น

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 253-263

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้สารสกัดจากสไปรูไลนายับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหลอดทดลอง และนำสไปรูไลนาแห้งผสมในอาหารเพื่อใช้ป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วา และระยะวัยรุ่น ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสไปรูไลนาสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งได้คือ 0.01 มก./มล. ขณะที่ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อไวรัส คือ 0.1 มก./มล. โดยกุ้งมีอัตราการตายเฉลี่ย 4% และไม่พบการติดเชื้อในกุ้งที่รอดตายเมื่อตรวจการติดเชื้อโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี

ผลการศึกษาการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าในลูกกุ้งระยะโพสท์ลาร์วาที่ได้รับไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก. มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดที่ได้รับไข่ตุ๋นอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และไม่พบการติดเชื้อเมื่อตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR) สำหรับการทดลองในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นที่ได้รับอาหารเม็ดผสมสไปรูไลนา 10 กรัม/กก. มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวดีที่สุด คือ กุ้งมีอัตรารอดตาย 100% ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อตรวจโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในกุ้งที่รอดตายเพียง 15% ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุม

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา มีปัญหาที่สำคัญคือการขาดระบบการจัดการภายในบ่อที่ดี ทำให้ประสบปัญหาต่างๆ โดยเฉพาะโรคกุ้ง ทั้งที่มีสาเหตุจากโปรโตซัว แบคทีเรีย และไวรัส โดยเฉพาะในช่วงปลายปี 2537 ต่อเนื่องปี 2538 ได้มีโรคระบาดอย่างรุนแรงในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งประสบภาวะการขาดทุนอย่างหนัก และผลผลิตรวมทั้งพื้นที่เลี้ยงกุ้งลดลงอย่างมาก กุ้งที่มีอาการจะทยอยตาย และจะตายหมดภายในเวลา 5-7 วัน (จิราพรและคณะ, 2538) ซึ่งไม่มีสารเคมีและยาที่ใช้รักษาโรคนี้ได้ ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยการใช้สารจากธรรมชาติเพื่อป้องกันโรคจากไวรัสชนิดนี้ในกุ้งกุลาดำ เช่น หญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) (สถาพร และคณะ, 2540) สารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวย (ชลิดา และคณะ, 2540) และฟูคอยแดน (fucoidan) ซึ่งเป็นสารกลุ่มซัลเฟต โพลีแซคคาร์ไรด์ สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ชื่อว่า *Cladosiphon okamuranus* (Takahashi, *et al*., 1998) เป็นต้น

สไปรูไลนา (*Spirulina platensis*) เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีโปรตีนสูงถึง 70% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน และเมทไธโอนีน เป็นต้น และยังประกอบไปด้วยกรดไขมัน เช่น กรดไลโนเลอิก กรดไมริสติก และกรดโอเลอิก เป็นต้น แร่ธาตุ เช่น ทองแดง เหล็ก โพแทสเซียม และแมกนีเซียม เป็นต้น และวิตามินที่สำคัญหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินบี 6 และวิตามินบี 12 เป็นต้น (Hills, 1980) ในวงการสัตว์น้ำนิยมนำสไปรูไลนามาเสริมในอาหารเพื่อช่วยในเรื่องการเจริญเติบโตและการเร่งสี (Nakamura, 1982) นอกจากนี้สไปรูไลนายังมีสารที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด จากรายงานของ Hayashi และ Hayashi (1996) พบว่า สารแคลเซียมสไปรูแลน ซึ่งสกัดได้จากสไปรูไลนาสามารถยับยั้งไวรัสชนิดต่างๆ ที่มีเปลือกหุ้ม (envelope virus) ได้ เช่น ไวรัสโรคหัด (Measles virus) ไวรัสโรคเริม (Herpes simplex virus type 1) ไวรัสโรคคางทูม (Mumps virus) และไวรัสโรคเอดส์ (HIV-1) เป็นต้น ดังนั้นสารสกัดจากสไปรูไลนาน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (จิราพรและคณะ, 2538) เช่นกัน ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาโดยนำสารสกัดจากสไปรูไลนามาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส

ตัวแดงดวงขาว เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนานำสไปรูไลนาไปใช้ในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดจากสไปรูไลนา ในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหลอดทดลอง

1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดลองเป็นไวรัสตัวแดงดวงขาวสายพันธุ์สงขลา เตรียมตามวิธีของ สถาพรและคณะ (2540)

1.2 การเตรียมสารสกัดจากสไปรูไลนา

สไปรูไลนาที่ใช้ในการทดลอง นำมาจากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา เลี้ยงในอาหารสูตรของธิดา (2542) เก็บเกี่ยวทุก 7 วัน และนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำมาบดและสกัดตามวิธีของ Herunsalee และ Direkbusarakom (1993)

1.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100%

นำสารละลายไวรัสที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยสารละลาย LHM (Lobster Haemolymph Medium) (Boonyaratpalin, *et al.*, 2001) ให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละเชื้อลดลงครั้งละ 10 เท่า คือ ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} นำมาฉีดเข้ากุ้งกุลาดำทางกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้งจำนวน 5 ตัว ฉีดตัวละ 0.2 มล. สำหรับชุดควบคุมฉีดสารละลาย LHM จากนั้นบันทึกอัตราการตายหลังฉีดทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100% (ชลิดา และคณะ, 2540)

1.4 การทดสอบผลของสารสกัดจากสไปรูไลนาในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำสารสกัดจากสไปรูไลนามาเจือจางด้วยสารละลาย LHM ให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005 และ 0.0005 มก./มล. นำมาผสมกับเชื้อไวรัสความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100% ซึ่งเท่ากับ 10^{-5} ในอัตราส่วน 1:1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดออกฤทธิ์ นำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ในกุ้งขนาดน้ำหนัก 10-15 กรัม ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้ง 5 ตัว ฉีดตัวละ 0.2 มล. สำหรับชุดควบคุมที่ 1 ฉีดสารละลาย LHM ที่ไม่มีสารสกัด ชุดควบคุมที่ 2 ฉีดเชื้อไวรัสความเข้มข้น 10^{-5} จากนั้นน้ำกุ้งทั้ง 8 ชุดการทดลองไปเลี้ยงในตู้กระจก ซึ่งบรรจุน้ำ 25 ลิตร ให้กุ้งกินอาหารเม็ดในอัตรา 3.5% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 4 ครั้ง (7.00, 11.00, 15.00 และ 19.00 น.) ให้อากาศตลอดเวลา มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในช่วงเช้าทุกวัน วันละ 30% บันทึกอัตราการตายทุกวันหลังการฉีดเป็นเวลา 14 วัน และตรวจยืนยันเชื้อไวรัสในกุ้งที่รอดตาย โดยดองในน้ำยาที่ดัดแปลงจากสูตรเดวิดสัน (modified Davidson fixative) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี (immuno-histochemistry) ตามวิธีของสิริลักษณ์ (2545)

2. การใช้สไปรูไลนาในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

2.1 การใช้สไปรูไลนาในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วา

1) การเตรียมลูกกุ้งกุลาดำ

นำลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วาที่ 10 จากโรงเพาะฟักของสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดนครศรีธรรมราชมาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 200 ลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที เพื่อปรับสภาพให้ลูกกุ้งคุ้นเคยกับสภาพห้องทดลอง ประมาณ 5 วัน และให้อาหารไข่ตุ๋นในอัตรา 10% น้ำหนักตัว/วัน วันละ 5 มื้อ คือ 07.00, 11.00, 15.00, 19.00 และ 23.00 น.

2) การเตรียมอาหารไข่ตุ๋นสำหรับลูกกุ้งระยะโพสท์ลาร์วา

ดัดแปลงจากชาญเดช (2543) โดยใช้ไข่ไก่ 12 ฟอง นมผง 20 กรัม น้ำ 200 มล. ปั่นให้เข้ากัน แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 ไม่ผสมสไปรูไลนา ส่วนที่ 2 ผสมสไปรูไลนาแห้ง 5 กรัม/อาหาร 1 กก. ส่วนที่ 3 ผสมสไปรูไลนาแห้ง 50 กรัม/อาหาร 1 กก. นำไปนึ่ง 15-20 นาที จากนั้นนำแต่ละส่วนไปผ่านตะแกรงขนาด 300 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C (ไข่ตุ๋นเตรียมใหม่ทุก 3 วัน)

3) การทดสอบการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ทดลองอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วาที่ 15 ในตู้กระจก มีปริมาตรน้ำ 30 ลิตร โดยแบ่งการทดลอง

เป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 6 ซ้ำ (ซ้ำละ 100 ตัว) ดังนี้

ชุดการทดลองที่	Treatment
1	ให้อาหารไข่ตุ๋น
2	ให้อาหารไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก.
3	ให้อาหารไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 50 กรัม/กก.

ให้อาหารไข่ตุ๋น 10% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 4 มื้อ คือ 06.00, 12.00, 16.00 และ 22.00 น. ดูดตะกอนวันละ 2 ครั้ง ให้กินอาหารเป็นเวลา 3 วัน แล้วแช่ในตู้ที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้นที่ทำให้ลูกกุ้งตาย 50% คือ 10^{-2} เลี้ยงต่อไปอีก 7 วัน นับจำนวนกุ้งที่เหลือรอด นำไปดองในแอลกอฮอล์ 70% เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธีทางพีซีอาร์ (PCR)

ทดสอบความแตกต่างโดยวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์อัตราการตายของกุ้ง ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1986) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2 การใช้สไปรูไลนาในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น

1) การเตรียมกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำขนาด 10-15 กรัม จำนวน 500 ตัว จากบ่อเลี้ยงของศูนย์พัฒนาประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่ผ่านการสุ่มตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธีพีซีอาร์ (PCR) มาพักในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำทะเลเตรียมไว้ 30 ตัน เป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน ให้อาหารเม็ดในอัตรา 3.5% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 4 ครั้ง (7.00, 11.00, 15.00 และ 19.00 น.) ให้อากาศตลอดเวลา ก่อนทดลองนำกุ้งมาเลี้ยงในตู้กระจก ซึ่งบรรจุน้ำ 80 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว ให้อาหารเม็ดวันละ 4 ครั้ง (7.00, 11.00, 15.00 และ 19.00 น.) ให้อากาศตลอดเวลา และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำช่วงเช้าทุกวัน ประมาณวันละ 30% เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อปรับให้เคยชินกับสภาพการทดลอง

2) การเตรียมอาหารเม็ดผสมสไปรูไลนา

เตรียมอาหารเม็ดตามวิธีการของทิพย์วรรณ (2542) คำนวณปริมาณโปรตีนในแต่ละสูตรอาหารให้ใกล้เคียงกัน

ผสมสไปรูไลนาแห้งในอัตราส่วน 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กก. นำเข้าเครื่องบดอัดเม็ดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มม. นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6-10 ชั่วโมง อาหารทดลองจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3) การทดสอบการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในตู้กระจก มีปริมาตรน้ำ 80 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่	Treatment
1	ให้กุ้งกินอาหารเม็ดปกติ (ชุดควบคุม)
2	ให้กุ้งกินอาหารเม็ดที่ผสมสไปรูไลนา 0.005 กรัม/กก.
3	ให้กุ้งกินอาหารเม็ดที่ผสมสไปรูไลนา 0.05 กรัม/กก.
4	ให้กุ้งกินอาหารเม็ดที่ผสมสไปรูไลนา 0.5 กรัม/กก.
5	ให้กุ้งกินอาหารเม็ดที่ผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก.
6	ให้กุ้งกินอาหารเม็ดที่ผสมสไปรูไลนา 10 กรัม/กก.

ให้กุ้งกินอาหารในอัตรา 3.5% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 4 มื้อ คือเวลา 06.00 12.00 16.00 และ 22.00 น. มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำช่วงเช้าทุกวัน ประมาณวันละ 30% ทดลองเป็นเวลา 7 วัน นำมาทดสอบการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งทดลองตาย 100% คือ 10^{-5} ฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้งกุลาดำ ตัวละ 0.2 มล. หลังจากนั้นให้กุ้งกินอาหารตามปกติ บันทึกอัตราการตายทุกวันหลังการฉีด เป็นเวลา 14 วัน นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการป้องกัน (protective efficacy) โดยใช้สูตรตาม Amend (1981)

$$\text{Protective efficacy} = \frac{(1-\%\text{mortality in experiment group}) \times 100}{\%\text{mortality in control group}}$$

ตรวจยืนยันเชื้อไวรัสในกุ้งที่รอดตาย โดยนำมาดองในน้ำยา Modified Davidson เพื่อนำไปตรวจหาการติดเชื้อโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรีตามวิธีของสิริลักษณ์ (2545)

ทดสอบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์อัตราการตายของกุ้ง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (Steel และ Torrie, 1986) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารสกัดจากสไปรูไลนา ในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหลอดทดลอง

การศึกษาผลของสารสกัดจากสไปรูไลนาในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยใช้เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้กุ้งทดลองตายใกล้เคียง 100% คือ 10^{-5} (Table 1) ผสมกับสารสกัดจากสไปรูไลนา พบว่า สารสกัดจากสไปรูไลนาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ คือ 0.01 มก./มล. กุ้งมีอัตราการตายเพียง 8±10.95% ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งที่รอดตาย โดยใช้วิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี พบว่ามีการติดเชื้อ 65.21% และระดับความเข้มข้นที่ 0.1 มก./มล. ไม่พบการติดเชื้อ ซึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมที่ได้รับเฉพาะเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีอัตราการตาย 100% แต่ไม่แตกต่างกับชุดควบคุมที่ได้รับเฉพาะสารละลายแอลเฮชเอ็ม ซึ่งมีอัตราการตาย 0% ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว คือ 0.1 มก./มล. (Table 2)

Table 1. Mortality (%) of *P. monodon* challenged with WSSV using injection bioassay method

Treatment	Mortality (%)[1] (No. of dead/No. of test)
LHM (Control)	0.00±0.00 (0/15)
WSSV (10^{-1})	100.00±0.00 (15/15)
WSSV (10^{-2})	100.00±0.00 (15/15)
WSSV (10^{-3})	93.33±11.55 (14/15)
WSSV (10^{-4})	100.00±0.00 (15/15)
WSSV (10^{-5})	93.33±11.55 (14/15)
WSSV (10^{-6})	53.33±46.19 (8/15)
WSSV (10^{-7})	13.33±23.09 (2/15)
WSSV (10^{-8})	0.00±0.00 (0/15)

[1]Mortality (%) = (No. of dead shrimp/No. of test shrimp) x 100

Table 2. Antiviral activity of *S. platensis* extract against WSSV in *P. monodon*

Treatment	Mortality (%) (No. of dead/No. of test)	WSSV infection (%)
WSSV 10^{-5} (Positive control)	100± 0.00[a] (25/25)	- (n=0)
LHM [1] (Negative control)	0±0.00[b] (0/25)	ไม่ติดเชื้อ (n=13)
S. *platensis extract* 0.1 mg/ml + WSSV (10^{-5})	4±8.94[b] (1/25)	ไม่ติดเชื้อ (n=13)
S. *platensis extract* 0.05 mg/ml + WSSV (10^{-5})	20±14.14[c] (5/25)	ไม่ติดเชื้อ (n=13)
S. *platensis extract* 0.025 mg/ml + WSSV (10^{-5})	12±17.89[bc] (3/25)	23 (n=13)
S. *platensis extract* 0.01 mg/ml + WSSV (10^{-5})	8±10.95[bc] (2/25)	65 (n=14)
S. *platensis extract* 0.005 mg/ml + WSSV (10^{-5})	100±0.00[a] (25/25)	- (n=0)
S. *platensis extract* 0.0005 mg/ml + WSSV (10^{-5})	100±0.00[a] (25/25)	- (n=0)

[1]Mortality (%) = (No. of dead shrimp/No. of test shrimp) x 100
Mean values within the same column having the same superscript are not significantly different at 95% levels.

2. การใช้สไปรูไลนาในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

การใช้สไปรูไลนาควบคุมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วา โดยการผสมสไปรูไลนาแห้ง 0, 5 และ 50 กรัม/อาหารไข่ตุ๋น 1 กก. ให้ลูกกุ้งกินเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบโดยการแช่ลูกกุ้งในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้น 10^{-2} โดยลูกกุ้งที่กินไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก. มีอัตราการตายน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อทดสอบการติดเชื้อโดยวิธีพีซีอาร์พบว่าชุดควบคุมมีการติดเชื้อทั้ง 6 ซ้ำ ในขณะที่ลูกกุ้งกินไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก. ไม่พบการติดเชื้อทั้ง 6 ซ้ำ และชุดที่ให้ไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 50 กรัม/กก. พบการติดเชื้อ 1 ซ้ำ อัตราการติดเชื้อ 16.67% (Table 3)

การใช้สไปรูไลนาในการควบคุมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น โดยการผสมสไปรูไลนาแห้งในอาหารเม็ดในอัตราส่วน 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กก. ให้กุ้งกินเป็นเวลา 7 วัน เมื่อทดสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเม็ดผสมสไปรูไลนา 10 กรัม/กก. ไม่มีการตายเกิดขึ้น แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 100% (Table 4)

เมื่อนำกุ้งกุลาดำที่รอดตายไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเม็ดผสมสไปรูไลนา 10 กรัม/กก. มีอัตราการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวน้อยที่สุด รองลงมาคือกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเม็ดผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก. (Table 4) ซึ่งเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาวมีหลายส่วน เช่น ส่วนเหงือก (gill) ส่วนสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic) กล้ามเนื้อ (mus-cle) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) (Figure 1 A-D) ซึ่งจะเห็นส่วนที่ติดเชื้อเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มเมื่อเปรียบ

Table 3. Percent mortality and percent of WSSV infection in postlarvae challenged with WSSV

Concentration of dry *S. platensis* in steamed egg (g/kg)	Mortality[1] (%)	WSSV infection[2] (%)
0	26.25±10.34[a]	100 (6/6)
5	13.50±8.80[b]	0 (0/6)
50	16.83±3.87[ab]	16.67 (1/6)

[1]Mortality (%) = (No. of dead shrimp/No. of test shrimp) x 100
[2]WSSV infection (%) = (No. of infected replication/ No. of replication) x 100
Mean values within the same column having the same superscript are not significantly different at 95% levels.

Table 4. Mortality, protective efficacy and WSSV infection of orally administered *S. platensis* on WSSV in juvenile *P. monodon*

Concentration of dry S. platensis in pellet (g/kg)	Mortality (%)1 (No.of dead /No.of test)	protective efficacy (%)	WSSV infect (%)
0 (Control)	60(37.42a (30/50)	0.00a	75.00 (n=18)
0.005	56(38.47a (28/50)	6.67a	66.67 (n=18)
0.05	36(40.99ab (18/50)	40.00ab	50.00 (n=18)
0.5	52(37.68a (26/50)	13.33a	83.33 (n=18)
5	28(38.99ab (14/50)	53.33ab	22.22 (n=18)
10	0(0.00b (0/50)	100.00b	15.00 (n=20)

[1]Mortality (%) = (No. of dead shrimp/No. of test shrimp) x 100
Mean values within the same column having the same superscript are not significantly different at 95% levels

เทียบกับเนื้อเยื่อปกติ (Figure 2 A-B) ที่ไม่มีจุดสีน้ำตาล เกิดขึ้น

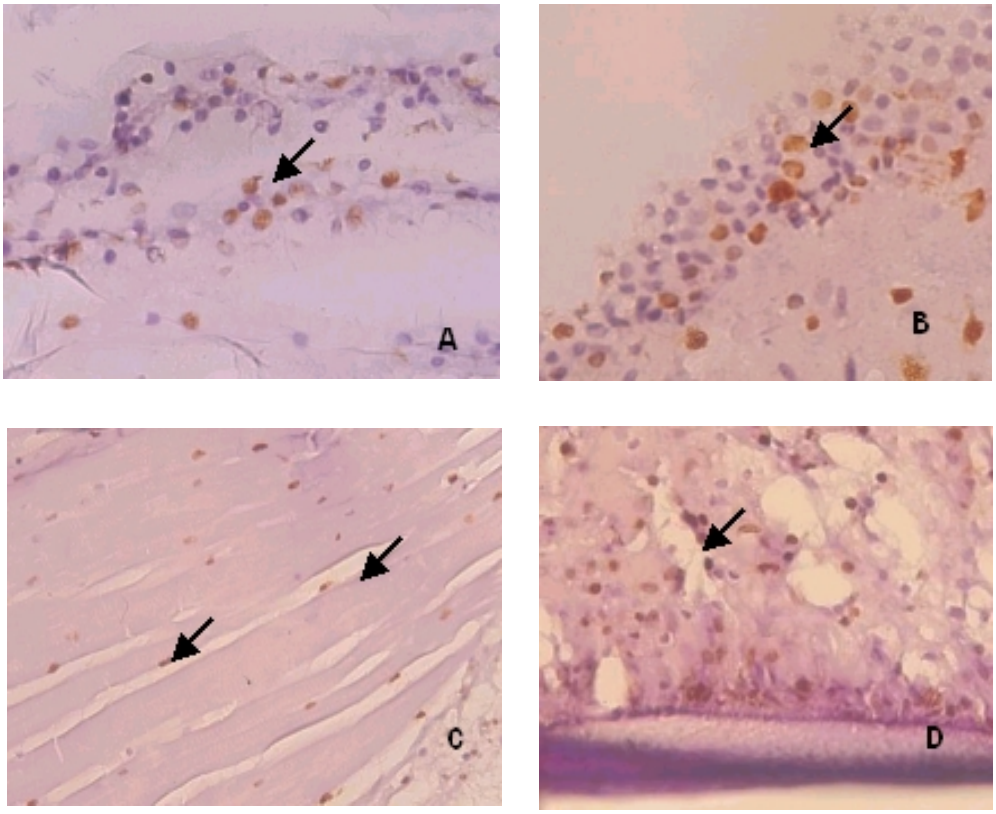

Figure 1. Immunohistochemistry of tissue from WSSV infected *P. monodon*. The dark brown precipitate (arrow) indicates a positive reaction. (A) gill, (B) hematopoietic, (C) muscle and (D) connective tissue. (100X)

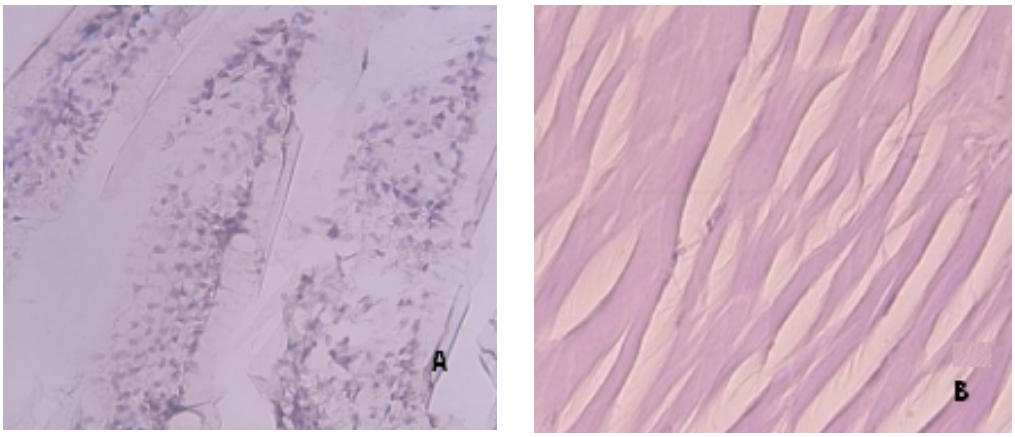

Figure 2. Immunohistochemistry of tissue from negative control of *P. monodon*. Show negative reaction. (A) gill and (B) muscle. (100X)

สรุปผลการศึกษา

1. การศึกษาผลของสารสกัดจากสไปรูไลนา ในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหลอดทดลอง

ในปัจจุบันได้มีรายงานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส เช่น ฟูคอยแดน (fucoidan) ซึ่งเป็นสารกลุ่มซัลเฟต โพลีแซคคาร์ไรด์ สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ชื่อว่า *Cladosiphon okamuranus* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้ม ได้แก่ ไวรัสโรคเริม (herpes simplex virus, HSV) ไวรัสโรคคางทูม (human cytomegalo virus, HCM) และไวรัสเอดส์ (human immunodeficiency virus, HIV) เป็นต้น โดยมีกลไกยับยั้งไวรัสในระยะที่ไวรัสมีการเชื่อมติดกับผิวเซลล์ (adsorption) (Baba, *et al.,* 1988) และซัลโฟไลปิด (Sulfolipid) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มกรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งสกัดได้จากแพลงก์ตอนพืช ชื่อว่า *Lyngbya lagerheimii* และ *Phormidium tenue* สามารถยับยั้งไวรัสโรคเอดส์ได้ (Gustafson, *et al.,* 1989) เป็นต้น จากการทดลองครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากสไปรูไลนามีผลยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hayashi และคณะ (1993) ที่พบว่าสารสกัดจากสไปรูไลนาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสเอดส์ ไวรัสโรคเริม ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A (Influenza A virus) ไวรัสโรคคางทูม และไวรัสโรคหัด (Measles virus) ซึ่งไวรัสเหล่านี้เป็นไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้ม (Enveloped virus) เช่นเดียวกับไวรัสตัวแดงดวงขาว (จิราพร และคณะ, 2538) นอกจากนี้ Ayehunie และคณะ (1998) ได้รายงานว่าสารสกัดน้ำจากสไปรูไลนาสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเอดส์ ในส่วนของทีเซลล์ (T-cell) และส่วนรอบนอกของเม็ดเลือด (peripheral blood mononuclear cells, PMBC) ได้ โดยสารสกัดที่ได้จากสไปรูไลนาที่มีผลยับยั้งไวรัส เรียกว่า แคลเซียมสไปรูแลน (calcium spirulan) เป็นโมเลกุลน้ำตาลโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบไปด้วย แรมโนส (rhamnose) ไรโบส (ribose) แมนโนส (manose) ฟรุคโตส (fructose) กาแลคโตส (galactose) ไซโลส (xylose) กลูโคส (glucose) กรดกลูคิวโรนิค (glucuronic acid) กาแลคทูโรนิค (galacturonic) ซัลเฟต (sulfate) และแคลเซียม (calcium) นอกจากนี้ แคลเซียม สไปรูแลนมีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณเท่ากับ 2.6 x 10^5 และ 3.1 x 10^5 ตามลำดับเมื่อใช้วิธี gel filtration และ light scattering (Hayashi and Hayashi, 1996) โดย Ayehunie และคณะ (1998) ได้อธิบายกลไกในการทำงานของสารสกัดแคลเซียม สไปรูแลนไว้ว่า การเข้าเกาะของไวรัสจะเข้าเกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ แต่เมื่อมีสารสกัดจากสไปรูไลนาไวรัสจึงไม่สามารถเจาะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ในขั้นสุดท้ายจะถูกกำจัดโดยกลไกการป้องกันโดยธรรมชาติของร่างกาย นอกจากนี้ Ayehunie และคณะ (1998) ได้รายงานกลไกการยับยั้งไวรัสเอดส์ของสารสกัดจากสไปรูไลนา โดยส่วนของโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เชื่อมกับส่วนซีดี 4 (CD4) ของเซลล์ ทำให้ส่วนจีพี 120 (gp120) ของไวรัสเอดส์ ชนิด 1 ไม่สามารถจับกับส่วนของซีดี 4 บนผิวเซลล์ได้ สารสกัดสไปรูไลนาจึงมีประโยชน์ในการรักษาและช่วยยืดระยะการรักษาผู้ป่วยเอดส์ออกไปได้

จากการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากสไปรูไลนาในการยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัด 0.1 มก./มล. กุ้งมีอัตราการตายเฉลี่ย 4% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากใบมะม่วงเขียวเสวยถึง 100 เท่า (10 มก./มล.) (ชลิดา และคณะ, 2540) และจากการศึกษาของสถาพร และคณะ (2540) ที่พบว่าสารสกัดจากต้นหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) ความเข้มข้น 1 มก./มล. สามารถยับยั้งเชื้อได้ 100% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดต่างกัน ถึงแม้ว่าสารสกัดสไปรูไลนาที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.025 มก./มล. จะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้เช่นกัน แต่เมื่อตรวจการติดเชื้อในกุ้งที่รอดตาย โดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี พบว่ามีอัตราการติดเชื้อไวรัส 22.72 และ 65.21% ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 0.1 มก./มล. ไม่พบการติดเชื้อแต่อย่างใด ซึ่งนับว่าเป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยและเหมาะสมที่นำไปใช้ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เพราะในกลุ่มที่พบการติดเชื้อในกุ้งที่รอดตาย อาจกลายเป็นพาหะนำโรคตัวแดงดวงขาวได้ในอนาคต เช่นการศึกษาของ Muroga และ Nishizawa (2001) พบว่ากุ้งกุลาดำที่รอดตายจากฟาร์มที่เกิดโรคตัวแดงดวงขาวระบาด เมื่อนำมาทำให้เกิดความเครียด จะเป็นโรคตัวแดงดวงขาวอีกครั้งหนึ่ง

การยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของสารสกัดจากสไปรูไลนา ไม่ได้เกิดจากคุณสมบัติความเป็นกรดด่างหรืออุณหภูมิของสารสกัด ซึ่งจากการศึกษา Chang และคณะ (1998) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เช่น หากไวรัสอยู่ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 90 นาที จะทำให้เชื้อหมดฤทธิ์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้บ่มเชื้อไวรัสกับสารสกัดที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 60 นาที ดังนั้นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในครั้งนี้จึงไม่มีผลในการทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์ นอกจากนี้หากเชื้ออยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรดด่าง 3 และ 12 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 10 นาที ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องจะมีผลให้เชื้อหมดฤทธิ์เช่นกัน แต่ในการทดลองครั้งนี้วัดความเป็นกรดด่างของสารสกัดได้ 6-7 ดังนั้นความเป็นกรดด่างของสารสกัดจึงไม่มีผลในการทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์

2. การใช้สไปรูไลนาในการป้องกันโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

จากการทดลองข้างต้น พบว่าสารสกัดจากสไปรูไลนาสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหลอดทดลอง จึงได้ทดลองนำสไปรูไลนามาใช้ผสมอาหาร โดยใช้ในรูปสไปรูไลนาแห้ง เนื่องจากการหากนำสไปรูไลนามาใช้ในรูปสารสกัด จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และเกษตรกรนำไปใช้ได้ยาก ในการอนุบาลกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วา ได้ใช้สไปรูไลนาผสมอาหารไข่ตุ๋น พบว่าสามารถใช้สไปรูไลนาในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยเมื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธีทางพีซีอาร์ พบว่าลูกกุ้งที่ให้ไข่ตุ๋นผสมสไปรูไลนา 5 กรัม/กก. ไม่มีการติดเชื้อ ในขณะที่ลูกกุ้งในชุดควบคุมมีการติดเชื้อไวรัสทั้ง 6 ซ้ำ และการที่ชุดทดลองที่ให้ไข่ตุ๋น 50 กรัม/กก. มีการติดเชื้อ 1 ซ้ำ อาจเกิดจากผลของแคลเซียมในสไปรูไลนาที่มากเกินไป จากรายงานของ Belay (1997) พบว่าในสไปรูไลนาแห้ง 100 กรัม จะมีแคลเซียม 700 มก. ซึ่งจากการทดลองของ Gollas-Galvan และคณะ (1997) พบว่าปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase Activating System) ในเลือดกุ้งสีน้ำตาล (*Penaeus californiensis,* Holmes) โดยความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะลดลง ทำให้กุ้งมีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายขึ้น

การใช้สไปรูไลนาผสมในอาหารเม็ดให้กุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นกิน ในอัตราส่วน 10 กรัม/กก. ไม่มีการตายเกิดขึ้น แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 100% และเมื่อนำกุ้งกุลาดำที่รอดตายไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโดยวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมิสตรี พบว่ามีอัตราการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวน้อยที่สุด ซึ่งเมื่อคิดเป็นน้ำหนักของสารสกัดในสไปรูไลนา จะมีค่าเท่ากับ 1.2 กรัม เปรียบเทียบกับการศึกษาของลิลา และคณะ (2543) ที่ใช้สารสกัดจากพญายอผสมในอาหารให้กุ้งกินในอัตราส่วน 1 กรัม/อาหาร 1 กก. ที่มีประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อเป็น 33.33% แล้วพบว่าการใช้สไปรูไลนามีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อได้ดีกว่า จากการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1998) พบว่าฟูคอยแดนเป็นสารกลุ่มซัลเฟต โพลีแซคคาไรด์ โดยสกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลชื่อว่า *Cladosiphon okamuranus* สามารถควบคุมโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งคุรุมาได้ โดยใช้ในอัตราส่วน 60 และ 50 มก./น้ำหนักกุ้ง 1 กก. ซึ่งกลไกการทำงานของสารตัวนี้ จะไปยับยั้งไม่ให้ไวรัสเข้าเกาะติดบนผิวเซลล์ และจากการศึกษาของ Hayashi และ Hayashi (1996) พบว่าสารสกัดจากสไปรูไลนาที่ยับยั้งเชื้อไวรัสก็เป็นสารกลุ่มซัลเฟต โพลีแซคคาไรด์ เช่นกัน Ayehunie และคณะ (1998) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารสกัดจากสไปรูไลนาในการยับยั้งเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV-1) ระหว่างการที่เซลล์ได้รับเชื้อก่อนได้รับสารสกัด การที่เชื้อได้รับสารสกัดก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์ และการที่เซลล์ได้รับสารสกัดก่อนได้รับเชื้อ พบว่าการยับยั้งไวรัสในเซลล์จะได้ผลดีก็ต่อเมื่อเซลล์มีโอกาสได้รับสารสกัดแคลเซียม สไปรูแลนก่อนที่จะได้รับเชื้อไวรัส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ คือ การป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้ผลดีกว่าคือต้องให้กุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมสไปรูไลนาติดต่อกันก่อนที่จะได้รับเชื้อ โดยมีกลไกของสารกลุ่มซัลเฟต โพลีแซคคาไรด์เข้ายับยั้งไวรัสที่จะเข้าเกาะเซลล์ของกุ้งกุลาดำเป็นผลให้สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

การที่จะนำสไปรูไลนามาใช้ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกันไวรัสตัวแดงดวงขาว ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เพิ่มขึ้น เช่น อาหาร และคุณภาพน้ำ (ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความเป็นด่าง

ความโปร่งแสง และอื่นๆ) เป็นต้น เพราะการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองในสภาวะที่สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้ เช่น คุณภาพอาหาร และคุณภาพน้ำ ซึ่งอาจจะไม่เหมือนกับสภาพการเลี้ยงจริงที่ไม่สามารถควบคุมปัจจัย ได้ทุกอย่าง ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวและชนิดของปุ๋ยที่ใช้เลี้ยงสไปรูไลนาอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งไวรัสตัวแดงดวงขาวแตกต่างกันได้ เช่น การทดสอบของ Unander และคณะ (1990 อ้างโดยสถาพร และคณะ, 2540) พบว่าสารสกัดที่ได้จากหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) ที่ได้รับปุ๋ยมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสสูงเป็น 2 เท่า ของหญ้าใต้ใบที่ปลูกในแหล่งที่ไม่ใช้ปุ๋ย จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้ด้วย นอกจากนี้ สิ่งที่ควรคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่ง คือต้นทุน เนื่องจากสไปรูไลนาแห้งเกรดสำหรับสัตว์ที่มีขายตามท้องตลาด ราคาประมาณ 400-600 บาท/กก. ซึ่งหากใช้ตามอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ คือ 10 กรัม/อาหาร 1 กก. จะทำให้ราคาอาหารกุ้งมีต้นทุนเพิ่มขึ้น 4-6 บาท ดังนั้นหากจะนำสไปรูไลนามาใช้ ควรศึกษาการลดต้นทุนการผลิตสไปรูไลนา เช่น การเลี้ยง สไปรูไลนาในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (สรวิศ, 2543)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์เรื่อง "ผลของสารต้านไวรัสและสารต้านแบคทีเรียจากสไปรูไลนา (*Spirulina platensis*) ในการป้องกันโรคติดเชื้อจากไวรัสตัวแดงดวงขาว และ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ" ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบการวิจัยจากทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (BT-B-06-50-48-443) ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ คุณวีระ เจริญพักตร์ หัวหน้าสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งนครศรีธรรมราช และ คุณพิษณุ นาอนันต์ ผู้อำนวยการศูนย์พัฒนา ประมงพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่อนุเคราะห์พันธุ์กุ้งกุลาดำ ขอขอบคุณ คุณอรวรรณ บุตรดี คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบด้านเนื้อเยื่อและการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

เอกสารอ้างอิง

จิราพร เกษรจันทร์ สิทธิ บุณยรัตผลิน เรวัตร คงประดิษฐ์ และ อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์. 2538. ไวรัสรูปแท่ง สาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2538. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา. 10 น.

ชลิดา ชมานนท์ สมภพ รุ่งสุภา และ วีณา เคยพุดซา. 2540. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะม่วงต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 41 น.

ชาญเดช วังสะวิบูลย์. 2543. ผลของการใช้คลอเรลลาในการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสท์ลาร์วา (พี 5-พี 15) ที่ให้อาหารมีชีวิตและไม่มีชีวิต.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาการเพาะเลี้ยง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทิพย์วรรณ ปริพัฒนานนท์. 2542. แนวทางการผลิตอาหารกุ้งด้วยตัวเอง การเตรียมและเทคนิคการให้อาหารกุ้งกุลาดำ. น. 21-26. **ใน** เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี ชีวภาพแห่งชาติ, นครศรีธรรมราช.

ธิดา เพชรมณี. 2542. คู่มือปฏิบัติการการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำโดยไม่ใช้อาร์ทีเมีย. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, สงขลา. 12 น.

ลิลา เรืองแป้น สถาพร ดิเรกบุษราคม เยาวนิตย์ ดนยดล ธิดา เพชรมณี ยงยุทธ ปรีดาลัมภะบุตร และ จิตเกษม จันทร์ผ่อง. 2543. ประสิทธิภาพและผลกระทบของการใช้พญายอ (*Clinacanthus nutants*) ป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ. น. 15. **ใน** บทคัดย่อการประชุมสัมมนาวิชาการประจำปี 2543 กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สถาพร ดิเรกบุษราคม เครือวัลย์ อ่อนทอง สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ และ นิพัทธ์ โชติการ. 2540. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. น. 145-150. **ใน** การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาประมง วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ คหกรรมศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ศึกษาศาสตร์ และเศรษฐศาสตร์, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สรวิศ เผ่าทองศุข. 2543. สาหร่าย: ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 356 น.

สิริลักษณ์ เจริญผล. 2545. การโคลนยีนและผลิตโปรตีนโครงสร้างส่วนสำคัญของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุวิศวกรรมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccine. International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. Developments in Biological Standardization. 49: 447-454.

Ayehunie, S., Belay, A., Hu, Y., Baba, T. and Ruprecht, R. 1998. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of Spirulina platensis (*Arthrospira platensis*). J. Acq. Imm. Def. Synd. and Hum. Retr. 18: 7-12.

Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R. and de Clercq, E. 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, human cytomegalo virus and human immunodeficiency virus. Antimicrobe Agents Chemother 32: 1742-1745.

Belay, A. 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors. The Earthrise farm experience. pp. 131-158. **In** Von Shak, A. (ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, cell-biology and Biotechnology. Taylor and Francis. London, England.

Boonyaratapalin, M., Supamattaya, K., Verakunpiriya, V. and Suprasert, D. 2001. Effect of alfatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus). Aquacult. Res. 32: 388-394.

Chang, P.S., Chen, L.J. and Wang, Y.C. 1998. The effect of ultraviolet irradiation, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. J. of Aquacult. 166: 1-17.

Gollas-Galvan, T., Jorge, H.L. and Francisco, V.A. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown Shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). Comparative Biochem. and Physio. 117A (3): 419-425.

Gustafson, K., Carellina, J.H., and Fuller, R.W. 1989. AIDS-anti-viral sulfolipids from cyanobacteria (blue green algae). J. the National Cancer Institute 81 : 1254-1258.

Hayashi, K., Hayashi, T., Morita, N. and Kojma, I. 1993. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into hela cells. Phytotherapy Research. 7: 76-80.

Hayashi, T. and Hayashi, K. 1996. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from blue-green alga *Spirulina platensis*. J. Natural Products. 59: 83-87.

Herunsalee, A. and Direkbusarakom, S. 1993. Investigation on the bioactive thai medicinal plants to virus in tiger prawn. pp. 104-106. **In** Menasavet, P. (ed.), Proceed-ings of Conference on Marine Biotechnology in the Asian Pacific Region 16-20 November 1993, Bangkok, Thailand.

Hills, C. 1980. It would be the Manna from Heven; New Food and New Aspirations Food from Sunlight, King Sport Press, pp 322-334.

Muroga, K. and Nishizawa, T. 2001. Quasi-immune response in kuruma prawn to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). p. 51-64. **In** Proceedings of the JSPS-NRCT: International Symposium on Sustainable Shrimp Culture and Health Management Disease and Environment 30 Sep 2001. Tokyo University of Fisheries.

Nakamura, H. 1982. *Spirulina* Food for Hungry World, a Pioneer's story in aquaculture. University of the Trees Press, Boulder Creek, California. 215 p.

Takahashi, Y., Uehara, K., Watanabe, R., Okumura, T., Yamashita, T., Omura, H., Yomo, T., Kawano, T., Kanemitsu, A., Narasaka, H., Suzuki, N. and Itami, T. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. p. 171-173. **In** Flegel TW (ed.), Advances in Shrimp Biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1960. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill, New York, 481p.