รายงานการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

สมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม
THAI HERBS SUBSTITUTE ANTIBIOTICS IN CULTURE OF *Macrobrachium rosenbergii*.

โดย

จิราพร โรจน์ทินกร จงกล พรมยะ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง

2552

รายงานการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง สมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม
THAI HERBS SUBSTITUTE ANTIBIOTICS IN CULTURE OF *Macrobrachium rosenbergii*.

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2547 - 2549
จำนวน 1,988,000.00 บาท

หัวหน้าโครงการ จิราพร โรจน์ทินกร
ผู้ร่วมโครงการ จงกล พรมยะ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
18 สิงหาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)) ปีงบประมาณ 2547 - 2549

ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย นักศึกษาช่วยงาน และบุคลากรในคณะทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

(ดร. จิราพร โรจน์ทินกร)

สิงหาคม 2552

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
สารบัญเรื่อง	ก
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทคัดย่อ	ฌ
ABSTRACT	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ด
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	
1. กุ้งก้ามกราม	7
2. โรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม	12
3. วิธีการรักษาโรคสัตว์น้ำ	19
4. ยาปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	20
5. พืชสมุนไพร	23
6. สมุนไพรในสัตว์น้ำ	30
อุปกรณ์และวิธีการ	
1. เชื้อแบคทีเรีย	43
2. กุ้งทดลอง	43
3. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร	43
4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี agar disc diffusion	43
5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรค โดยใช้หาค่า MIC/MBC	44
6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อกุ้งก้ามกราม โดยหาค่า LC_{50} 96 h	44
7. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อ *A.*	45

หน้า

hydrophila ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการแช่
8. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการกิน 45
9. การศึกษาปริมาณเซลล์เม็ดเลือดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเลือดของกุ้งก้ามกราม 46
10. การวิเคราะห์ข้อมูล 47
11. สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย 47

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิจัยปีที่ 1

1.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดสมุนไพร 50

ผลการวิจัยปีที่ 2

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้หาค่า MIC/MBC 65

2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อกุ้งก้ามกรามโดยหาค่า LC_{50} 96 h 72

2.3 สารสกัดสมุนไพรและความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม 80

ผลการวิจัยปีที่ 3

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการแช่ 81

3.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรไทยที่จะใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกรามโดยการแช่ 88

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการกิน 90

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณของสารสกัดสมุนไพรไทยที่จะใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกรามโดยผสมอาหารให้กิน 106

สรุปการวิจัย 107

บรรณานุกรม 113

ภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก ก

การนำเสนอผลงานวิชาการ 1 132

การนำเสนอผลงานวิชาการ 2 137

การนำเสนอผลงานวิชาการ 3 144

การนำเสนอผลงานวิชาการ 4 147

เอกสารเผยแพร่ เรื่อง การใช้สารสกัดสมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม 149

ภาคผนวก ข

เอกสารการจดอนุสิทธิบัตร 151

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*	16
2	ผลการทดสอบ Antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila, Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi*	50
3	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas .hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) และ *V. harveyi* (VH)	55
4	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 1 ชนิด จาก *Aeromonas .hydrophila* (AH) และ *Vibrio harveyi* (VH)	57
5	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 1 ชนิด จาก *Aeromonas .hydrophila* (AH) และ *Vibrio parahaemolyticus* (VP)	57
6	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 1 ชนิด จาก *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. parahaemolyticus* (VP)	58
7	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค*Aeromonas hydrophila* ชนิดเดียว	59
8	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* ชนิดเดียว	59
9	ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* ชนิดเดียว	60
10	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดสมุนไพร ต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. paraheamohyticus* (VP)	67
11	ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อลูกกุ้งก้ามกรามขนาด PL15	76
12	แนวทางการใช้สารสกัดด้วยเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทย โดย	89

ตารางที่		หน้า
	วิธีการแช่รักษาโรคแอโรโมแนส (MAS) ในกุ้งก้ามกราม	
13	จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด คือ granulocyte semi-granulocyte และ hyalinocyte ของตัวอย่างกุ้งในชุดการทดลองกลุ่มต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	99
14	แนวทางการใช้สารสกัดด้วยเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทย ผสมอาหารให้กินรักษาโรคแอโรโมแนส (MAS) ในกุ้งก้ามกราม	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม	7
2	โครงสร้างของฮีโมไซยานิน (hemocyanin)	9
3	ลักษณะเชื้อ *Aeromonas hydrophila*	13
4	ลักษณะเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*	15
5	ลักษณะเชื้อ *Vibrio harveyi*	17
6	โครงสร้างของออกซีเตตร้าซัยคลิน (oxytetracycline)	22
7	กลไกการทำลายหรือยับยั้งการทำงานเซลล์แบคทีเรียโดยสารสกัดสมุนไพร	29
8	แผนผังการทำงานวิจัยในระยะเวลา 3 ปี	48
9	ลักษณะวงใสของสารสกัดสมุนไพรด้วยเอธานอล 50% ในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila*	63
10	ลักษณะวงใสของสารสกัดสมุนไพรด้วยเอธานอล 50% ในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*	63
11	ลักษณะวงใสของสารสกัดสมุนไพรด้วยเอธานอล 50% ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*	64
12	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดกระเทียมด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	72
13	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดขาเขียวด้วยเอธานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	73
14	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดใบชะพลูด้วยเอธานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	73
15	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดเทียนตาตั๊กแตนด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	74
16	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	74
17	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	75

ภาพที่		หน้า
18	สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดหญ้าลิ้นงูด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง	75
19	อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่	83
20	อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดใบชะพลูด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่	84
21	อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดใบชาเขียวด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่	85
22	อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่	86
23	อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่	87
24	อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน	92
25	อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดใบชะพลูด้วยเอธานอล 50 %รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน	93
26	อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดชาเขียวญี่ปุ่นด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน	94
27	อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน	95

ภาพที่		หน้า
28	อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน	96
29	ลักษณะรูปร่างเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกราม	97
30	จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด หลังฉีดเชื้อ 1 วัน	101
31	จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด หลังฉีดเชื้อ 3 วัน	102
32	จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด หลังฉีดเชื้อ 7 วัน	103

สมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

จิราพร โรจน์ทินกร[1] จงกล พรมยะ[1] ศรีกาญจน์ คล้ายเรือง[2]

(1) คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ (2) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เกษตรกรต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ และมีการใช้ในปริมาณสูงเกินจำเป็น ส่งผลให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมน้ำ การได้รับยาปฏิชีวนะเป็นประจำจากการบริโภคกุ้งมีสารตกค้าง ก่อให้เกิดผลข้างเคียงในทางลบ เช่น ท้องเสียเรื้อรัง มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสรีระ ก่อการกลายพันธุ์ ก่อมะเร็ง เป็นต้น สมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญเพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อ มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งและสัตว์น้ำอื่นมากว่า 20 ปีแล้ว แต่ยังเป็นการใช้สมุนไพรเพียงบางชนิด และเป็นการใช้โดยนำสมุนไพรมาบดเป็นผงผสมอาหาร ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพไม่แน่นอน

ในงานวิจัยนี้ได้นำสมุนไพรไทยที่หาง่าย 98 ชนิด 112 ส่วน มาเตรียมสารสกัดด้วยสารละลาย 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอธานอล 50% และ 95% จึงได้สารสกัดสมุนไพร 336 ตัว และนำสารสกัดสมุนไพรมาทดสอบการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด คือ *Aero-monas hydrophila* (AH), *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. parahaemolyticus* (VP) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ (susceptibility test) ด้วยวิธี agar disc diffusion ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อโดยการหาค่า MIC (minimal concentration inhibition) ด้วยวิธี agar dilution และ MBC (minimal bactericidal concentration) ด้วยวิธี broth dilution และ total plate count และได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อลูกกุ้งขนาด PL15 โดยการหาค่าโดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกกุ้งตาย 50% ที่เวลา 96 ชั่วโมง (lethal concentration for 50% at 96 hours, LC_{50} 96 h) ด้วยวิธีการแช่ จากนั้นได้ทำการทดสอบการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งด้วยสารสกัดสมุนไพรโดยการผสมอาหารและแช่รักษา โดยได้เปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าไซคลิน

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ พบว่า สารสกัดของสมุนไพรไทย 29 ชนิด ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสาม ได้แก่ กระวาน(ผล) กระสัง(ทั้งต้น) กล้วย(ผล) ขนุน(แก่น) ข้าวโพด(ซัง) ข้าวสาลี(เปลือก) คำฝอย(ดอก) จันทน์เทศ(ผล) ชะเอมเทศ(ทั้งต้น) ดีปลี(ผล) ต้อยติ่ง(ทั้งต้น) ตะไคร้(ทั้งต้น) เตย(ใบ) เตยหอม(ใบ) เทียนข้าวเปลือก(เมล็ด) บอระเพ็ด(กิ่ง) เปราะหอม(ต้น) ผักเค็ด(ทั้งต้น) ผักชี(ต้น) ผักชีลาว(ทั้งต้น) พริกไทยดำ(เมล็ด) ไพล(เหง้า) ฟ้าทะลายโจร(ใบสด) ไมยราบยักษ์(ใบ) มะม่วงหิมพานต์(เปลือกผล) มะยม(ใบ) หงอนไก่ (ใบ) หนุมานนั่งแท่น(ยางสด) และหญ้าพันงู(ทั้งต้น)

สารสกัดของสมุนไพร 23 ชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสามชนิด ได้แก่ กระเทียม(หัวสด) กระเพรา(ใบ) กานพลู(ดอก) จาสาบเสือ(ใบสดและแห้ง) เจตมูลเพลิงแดง(แก่น) ชะพลู(ใบ) ชาเขียวญี่ปุ่น(ใบ) ชุมเห็ดเทศ(ใบ) ทับทิม(เปลือกผล) เทียนตาตั๊กแตน(เมล็ด) น้อยหน่า(ใบ) ผักเผ็ด(ใบแห้งและสด) ฝาง(แก่น) พริกแดง(ดอก) พลู(ใบ) ฟ้าทะลายโจร(ใบ) มะระหวาน(ใบ) หูกวาง(ใบแห้งและสด) สะระแหน่(ใบ) และ อบเชย(เปลือก) ดังตารางที่ 3 และสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงมาก ได้แก่ กระเทียมสด เจตมูล-เพลิงแดง และ ใบหูกวาง ซึ่งสกัดด้วยเอธานอล

สารสกัดสมุนไพรไทยที่ยับยั้งได้ 2 เชื้อ ดังนี้ สารสกัดของสมุนไพร 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VH ได้แก่ ผักไผ่(ใบ) รางจืด(ทั้งต้น) ว่านหางจระเข้(วุ้น) มะยม(ผลสด) และเหงือกปลาหมอ(ใบ) สารสกัดของสมุนไพร 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VP ได้แก่ มะแข่น(ทั้งต้น) มะแว้ง และลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) สารสกัดของสมุนไพร 16 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH และ VP ได้แก่ กะเม็ง(ทั้งต้น) กระชายม่วง(เหง้า) ขี้เหล็ก(ใบ) ถั่วฝักยาว(ฝัก) เทียนบ้าน(ใบสด) บัวบก(ทั้งต้น) มะกรูด(ใบ) มะระขี้นก(ใบ) มังคุด(เปลือกผล) แมงลัก(ทั้งต้น) ไมยราบ(ใบ) ลำโพงขาว(ใบ) ว่านหางจระเข้(เปลือก) หญ้าลิ้นงู(ทั้งต้น) สะเดา(ใบ) และสาบเสือ(ใบ)

สารสกัดสมุนไพรไทยที่ยับยั้งเชื้อได้ชนิดเดียว ดังนี้ สารสกัดของสมุนไพร 9 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH ได้แก่ กระเพรา(ใบสด) จันทน์แปดกีบ(ดอก) ดาวเรือง(ดอก) ต้อยติ่ง(ใบ) บัวหลวง(เกสรตัวผู้+กลีบดอก) ผักบุ้งแดง(ใบสด) ผักบุ้งขาว(ใบสด) ผักปลัง(ใบ) และฝรั่ง(ใบ) สารสกัดของสมุนไพร 16 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH ได้แก่ กะทกรก(ผล) กระชายดำ(เหง้า) ขลู่(ใบ) คูน(ใบ) ต้นตายใบเป็น(ใบ) ผักเบี้ย(ใบ) ฝิ่น(ต้น) บัวบก(ทั้งต้นสด) เปล้าตองแตก(ใบ) พลูคาว(ใบ) หญ้ากรดน้ำ(ใบ) หญ้าสามวัน(ใบ) หญ้าหัวโม่ง(ใบ) หนุมานประสานกาย(ใบ) หมาก(ผล) และสาหร่ายไปรูลิน่า(เซลล์) สารสกัดของสมุนไพร 7 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VP ได้แก่ กุยช่าย(ใบ) น้ำนมราชสีห์(ใบ) มะระขี้นก(ผล) ยอ(ใบ) หนุมานประสานกาย(ใบสด) หม่อน(ใบ) และโหระพา(ใบ)

สำหรับเชื้อ AH สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด 3 อันดับ คือ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50% ใบหูกวางสกัดสดและแห้งด้วยเอธานอล 95% มีขนาดวงใส เท่ากับ 17.52, 15.78 และ 14.18 mm ตามลำดับ สำหรับเชื้อ VH สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด 3 อันดับ คือ เจตมูลเพลิงแดงสกัดเอธานอล 50 และ 95% และกระเทียมสดสกัดด้วยเอธานอล 50% มีขนาดวงใส เท่ากับ 24.12, 22.30 และ 19.80 mm ตามลำดับ สำหรับเชื้อ VP สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด 3 อันดับ คือ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50% ใบหูกวางแห้งสกัดเอธานอล 95 และ 50% มีขนาดวงใส เท่ากับ 21.10, 19.35 และ 18.45 mm ตามลำดับ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด พบว่า ค่า MIC/MBC สูงสุด สำหรับเชื้อ AH ได้แก่ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50 (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และ 95% (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และอบเชยสกัดด้วยเอธานอล 50% (MIC = 3 ml/l, MBC = 10 ml/l) และ 95%(MIC = 2 ml/l, MBC = 5 ml/l)สำหรับเชื้อ VH ได้แก่ ใบหูกวางแห้งสกัดด้วยเอธานอล 50% (MIC = 1 ml/l, MBC = 12 ml/l) และ 95% (MIC = 1 ml/l, MBC = 9 ml/l) และใบมะระหวานสกัดด้วยเอธานอล 50% (MIC = 2 ml/l, MBC = 10 ml/l) และ 95% (MIC = 2 ml/l, MBC = 10 ml/l) สำหรับเชื้อ VP ได้แก่ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50% (MIC = 1 ml/l, MBC = 2 ml/l) และ 95% (MIC = 1 ml/l, MBC = 3 ml/l) และใบหูกวางแห้งสกัดด้วยเอธานอล 50% (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และ 95% (MIC = 2 ml/l, MBC = 3 ml/l)

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อลูกกุ้งก้ามกราม พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษสูง ได้แก่ กระชายม่วง สกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 0.92 ml/l) สกัดด้วยเอธานอล 95% (LC_{50} = 0.94 ml/l) กระเทียมสกัดด้วยเอธานอล 95% (LC_{50} = 1.83 ml/l) และเทียนตาตั๊กแตนสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 1.65 ml/l) เอธานอล 95% (LC_{50} = 1.09 ml/l) ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษต่ำ ได้แก่ ผลมะระขี้นกสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 32.63 ml/l) และใบหูกวางสกัดด้วยน้ำกลั่น (LC_{50} = 33.46 ml/l)

ได้เลือกสมุนไพรไทยหาง่ายมา 5 ชนิด และนำสารสกัดสมุนไพรไทยเหล่านี้มาทำทดสอบการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในกุ้ง ด้วยวิธีแช่รักษาและผสมอาหารกิน โดยได้เปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้า พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพรักษาเทียบเท่ายาปฏิชีวนะ โดยสามารถกำหนดโปรแกรมในการรักษาด้วยวิธีแช่ ดังนี้ กระเทียมสกัดด้วยเอธานอล 50% 3-5 ml/l แช่สั้น ชะพลูด้วยเอธานอล 95% 5 ml/l แช่สั้น ชาเขียวสกัดด้วยเอธานอล

95% 5 ml/l แช่สั้น ทับทิมสกัดด้วยเอธานอล 50% 4-9 ml/l แช่ยาว และใบหูกวางสกัดด้วยเอธานอล 50% 5-10 ml/l แช่ยาว ส่วนการรักษาด้วยวิธีกิน ได้แก่ สารสกัดกระเทียม 5 - 10 ml/อาหาร 100 g สารสกัดใบชะพลู ที่ปริมาตร 5 – 10 ml/อาหาร 100 g สารสกัดใบชาเขียว ที่ปริมาตร 5 - 10 ml/อาหาร 100 g สารสกัดเปลือกผลทับทิม ที่ปริมาตร 4 - 9 ml/อาหาร 100 g และสารสกัดใบหูกวาง ที่ปริมาตร 10 ml/อาหาร 100 g โดยผสมอาหารเป็นเวลา 7 วัน ดังนั้น สารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้ สามารถใช้เพื่อรักษาโรคแบคทีเรียสำคัญในกุ้งก้ามกรามทดแทนยาปฏิชีวนะได้ดี

จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสมุนไพรท้องถิ่นหาง่ายหลายชนิด มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดี และสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาเชื้อแอโรโมแนสได้ทั้งการผสมอาหารและการแช่ จึงควรมีการนำสารสกัดสมุนไพรไทยเหล่านี้ไปพัฒนาต่อไป เพื่อใช้ให้เป็นประโยชน์ในการผลิตกุ้งก้ามกรามปลอดสาร คุณภาพสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับกุ้งและสัตว์น้ำชนิดอื่นได้เช่นกัน ผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นการสนับสนุนระบบการผลิตสัตว์น้ำปลอดสาร ได้แก่ GAP CoC อินทรีย์ ซึ่งเป็นการช่วยลดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์และอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิต-ภัณฑ์สัตว์น้ำของไทยโดยใช้วัตถุดิบในประเทศ ช่วยลดการนำเข้า เพิ่มการส่งออกสินค้ากลุ่มผลิตภัณฑ์ประมงที่มีคุณภาพสูง

Thai Herbs Substitute Antibiotics in Culture of *Macrobrachium resenbergii*.

Jirapom Rojtinnakorn[(1)], Jongkol Promya [(1)] and Srikajana Klairuang[(2)]

(1) Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resource

(2) Department of Biology, Faculty of Science

Abstract

In prawn culture, farmers usually use antibiotics and chemicals with ignorance, less carefulness and overdose causing residues problem to the products and water environ-ment. Often consuming the residue prawn products causes negative side effect such as diarrhea, changing in physiological system, mutagen, carcinogen, etc. The most efficient alternative strategy to substitute those antibiotics is considered to be herb application. Medical plants or herbs have been applied in aquaculture for 2 decades. But the application is still limited in not only some plants but also directly using herb powders mixing with feed that cause uncertain efficiency.

In this study, 112 parts of 98 plentiful Thai herbs had been extracted with 3 solvents (distilled water, 50% and 95% ethanol) achieving 336 extracts, and screened for their antibacterial activities to the 3 particular bacterial pathogens of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*); i.e. *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio harveyi* (VH) and *V. parahaemolyticus* (VP). The susceptibilities of the herb extracts were tested by agar disc diffusion method and inhibition clear zones were identified. Their efficiencies were tested for MIC (minimal inhibition concentration) by agar dilution method and MBC (minimal bactericidal concentration) by broth dilution and total plate count methods. Their toxicity were values with LC50 96 h (lethal concentration for 50% at 96 hours) for PL15

prawn larvae by bathing method. Then their efficacy of treatments by bathing and feed additive were investigated with comparison to antibiotic (oxytetracycline) as well.

For susceptibility test, it was resulted that extracts of 29 Thai herbs show no antibacterial activity for these 3 pathogens i.e. Siam cardamom, pepperomia, banana, jackfruit core, corncob, shell wheat, safflower, nutmeg fruit, licorice, Indian long pepper, popping pod stem, lemon grass, screw-pine, fragant screw-pine, sweet fennel seed, heart-leaved moonseed, galangal, pak ked, parsley, dill plant, black pepper, plai, kalmegh fresh leaf, cat-clow mimosa leaf, cashew peel, star gooseberry leave, common cockscomb leaf, gout stalk, and prickly chaff-flower.

There were extracts of 23 herbs that showed inhibition against the 3 pathogens i.e. fresh garlic, basil, clove, guacos, rose colored leadwort, betel, green tea, ringorm bush, pomegranate, dill seed, custard apple, para cress leaf, sappen wood, red chili flower, betel pepper, kalmegh leaf, chayote leaf, tropical almond leaf, spearmint, and cinnamon. The 3 herbs of high inhibition activities were belonged to ethanol extracts of fresh garlic, rose colored leadwort, and tropical almond leaf.

For 2 pathogens inhibition, there were extracts of 5 herbs inhibiting AH and VH i.e. Rau ram Vietnamese coriander, blue trumpet vine, aloe gel, star gooseberry fresh fruit, and sea holly. For inhibiting AH and VP, there were extracts of 3 herbs i.e. prickly ash, fig, and stonebreaker. For inhibiting VH and VP, there were extracts of 16 herbs i.e. false daisy, purple fingerroot, Thai copper pod leaf, cowpea, garden balsam, Asiatic pennywort, kaffir, bitter cucumber leaf, mangosteen peel, hairy basil, sensitive plant leaf, thorn apple leaf, aloe peel, Hedyoti, neem leaf, and Siam weed.

For 1 pathogen inhibition, firstly for AH alone, there were extracts of 9 herbs i.e. fresh basil, star anise, big marigold flower, popping pod leaf, lotus, red and white morning glory, Ceylon spinach, and guava leaf. For inhibiting VH alone, there were extracts of 16 herbs i.e. passion fruit, black fingerroot, Indian marsh fleabane leaf, golden shower leaf, life plant, fresh Asiatic pennywort, plao tong taek leaf, pigweed leaf, poppy stem, chameleon plant leaf, macao tea leaf, purple fleabane leaf, green kyllinga leaf, hanuman prasankai leaf, betelnut plam, and spirulina. For inhibiting VP alone, there were

extracts of 7 herbs i.e. Chinese Chives, asthma weed leaf, bitter cucumber fruit, noni, hanuman prasankai fresh leaf, mulberry leaf, and sweet basil.

For AH, the 3 highest inhibitions were 50% ethanol extracted rose coloured leadwort, 95% ethanol extracted fresh and dried tropical almond with clear zone of 17.52, 15.78 and 14.18 mm, respectively. For VH, the 3 highest inhibitions were 50 and 95% ethanol extracted rose coloured leadwort, and 50% ethanol extracted garlic with clear zone of 24.12, 22.30 and 19.80 mm, respectively. For VP, were 50% ethanol extracted rose coloured leadwort, 95 and 50% ethanol extracted dried tropical almond leaf with clear zone of 21.10, 19.35 and 18.45 mm, respectfully.

For efficiency test, it was resulted that the highest values of AH were rose coloured leadwort extracted with 50% (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) and 95% ethanol (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l), and cinnamon extracted with 50% (MIC = 3 ml/l, MBC = 10 ml/l) and 95% ethanol (MIC = 2 ml/l, MBC = 5 ml/l). The highest values of VH were tropical almond extracted with 50% (MIC = 1 ml/l, MBC = 12 ml/l) and 95% ethanol (MIC = 1 ml/l, MBC = 9 ml/l), and chayote extracted with 50% (MIC = 2 ml/l, MBC = 10 ml/l) and 95% ethanol (MIC = 2 ml/l, MBC = 10 ml/l). The highest values of VP were rose coloured leadwort extracted with 50% (MIC = 1 ml/l, MBC = 2 ml/l) and 95% ethanol (MIC = 1 ml/l, MBC = 3 ml/l), and tropical almond extracted with 50% (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) and 95% ethanol (MIC = 2 ml/l, MBC = 3 ml/l).

For toxicity test, it was revealed that the highest toxic values belonged to purple fingerroot extracted with 50% (LC_{50} = 0.92 ml/l) and 95% ethanol (LC_{50} = 0.94 ml/l), garlic extracted with 95% ethanol (LC_{50} = 1.83 ml/l), and dill extracted with 50% (LC_{50} = 1.65 ml/l) and 95% ethanol (LC_{50} = 1.09 ml/l). Whereas the lowest toxic values were bitter cucumber fruit extracted with 50% ethanol (LC_{50} = 32.63 ml/l) and tropical almond extracted with distilled water (LC_{50} = 33.46 ml/l).

Five local herbs were considered to apply to treat motile aeromonas disease (MAS) in prawn. It was achieved that herb extracts affected similar values to oxytetracycline. From our studies, the bathing program for MAS treatment were short bath in each of 3-5 ml/l garlic extracted with 50% ethaonol, 5 ml/l betel extracted with 95%

ethanol, 5 ml/l green tea extracted with 95% ethanol, and long bath of 4-9 ml/l pomegranate extracted with 50% ethanol and 5-10 ml/l tropical almond extracted with 50% ethanol. While feed additive program were 100 g feed containing each extract of 5 - 10 ml garlic, 5 – 10 ml betel, 5 - 10 ml green tea, 4 - 9 ml pomegranate, and 10 ml tropical almond for 7 days. Therefore, it was able to conclude that these 5 herbs extracts were available well equal to antibiotics to treat bacterial disease in prawn culture.

In summary, it was illustrated that there were many local Thai herbs have antibacterial pathogens in prawn and well enough effective to apply substitute antibiotics by bathing or feed additive. These extracts should be continued to further research for usefulness of residue-free and high quality prawn production. Furthermore, they are available to apply in shrimp and other aquacultures as well. Our result will be support for aquaculture farm standard such as GAP CoC and organic systems that helpful to decrease residues in fishery product and environment conservation. In the other hand, it will be support for value added fishery product by using safe materials in our country, decreasing chemical import, and increasing export of niche fishery products.

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

^{o}C	=	degree Celsius
%	=	percent
OD	=	optical density
g	=	gram
mm	=	millimeter
cm	=	centimeter
ml	=	milliliter
l	=	liter

คำนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นกุ้งน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญ การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้สูงถึงปีละไม่น้อยกว่า 154,000 ตัน ตั้งแต่ปี 2545 (ศูนย์สารสนเทศกรมประมง, 2547) เนื่องจากกุ้งก้ามกรามได้รับความนิยมบริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ แต่ไม่เพียงพอความต้องการของผู้บริโภค

เมื่ออุปสงค์มีสูงทำให้การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามพัฒนาเป็นระบบเลี้ยงหนาแน่น โดยเลี้ยงในอัตรา 20,000–30,000 ตัวต่อไร่ ทำให้สภาพสิ่งแวดล้อมน้ำในบ่อเสื่อมโทรมได้ง่าย คุณสมบัติของน้ำที่เปลี่ยนแปลง เกิดของเสียในบ่อสูง กุ้งเครียดและอ่อนแอ ทำให้เกิดปัญหาด้านโรคตามมา ภาวะการเกิดโรคเป็นปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงกุ้ง ทำให้สูญเสียและผลผลิตต่ำ ทั้งนี้แนวโน้นการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในเขตภาคเหนือจะสูงขึ้น เนื่องจากความต้องการบริโภคสูงประกอบกับกุ้งในแหล่งน้ำธรรมชาติมีจำนวนลดลงมาก ผลผลิตส่วนใหญ่จึงมาจากการเลี้ยง จึงอาจส่งผลให้มีสารปฏิชีวนะตกค้างในบ่อและแหล่งน้ำใกล้เคียงกับบริเวณเพาะเลี้ยง ซึ่งแน่นอนจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมต่อไปในระยะยาว

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ซึ่งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในกุ้งก้ามกรามมี 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบมากในกุ้งโตในบ่อดิน ก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำ โรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง (shell disease) โรคแก้มดำ และโรคแบคทีเรียในเหงือกซึ่งเกิดร่วมกับ filamentous bacteria (สิทธิ, 2526; ยนต์, 2529; กมลพร, 2540; ลิลา, 2535) เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรคเปลือกกร่อน โรคขี้ขาว โรคตับอักเสบ และเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดโรคแบคทีเรียเรืองแสง เชื้อกลุ่ม *Vibrio* พบมากลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก ทำให้ลูกกุ้งตายหมด (กมลพร, 2540) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เข้าไปสร้างสารพิษ exotoxins ทำให้เกิดอาการเปลือกกร่อน จุดดำบนเปลือกบริเวณหัว ลำตัว และระยางค์ของกุ้ง หากเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากจะทำให้กุ้งตายได้

ในอดีตจนถึงปัจจุบัน การป้องกันและรักษาโรคในกุ้งทำโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆเพื่อป้องกันและรักษาโรค ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมเฟนิคอล ออกซิเตตร้า ซัยคลิน ซัลฟานิลาไมด์ และไนโตรฟูแรน โดยการผสมในอาหารและใส่ในน้ำแช่ (ยนต์, 2529; ประจวบ, 2530) และมีการใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานและมีการเพิ่มปริมาณยา เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดื้อยาและการใช้ยาปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผล ส่งผลให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกราม และพบในปริมาณมากเกินความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค (พร

เลิศ และขลอ, 2534; ประพนธ์, 2535; อุษณีย์ และคณะ, 2538) นอกจากนี้ยังมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงไม่ถูกต้องในระบบอินทรีย์ มาตรฐาน GAP และ CoC

อมรรัตน์ และโสภณ รายงานว่า ออกซีเตตร้าซัยคลินละลายในน้ำจืดได้ดีกว่าน้ำเค็ม และ กรรณิการ์ (2534) พบว่า ออกซีเตตร้าซัยคลินในน้ำจืดจะคงตัวอยู่ได้ถึง 9 วัน ที่อุณหภูมิปกติของเมืองไทย อุษณีย์ และคณะ (2538) รายงานการตกค้างของออกซีเตตร้าซัยคลินในดินของบ่อเลี้ยงกุ้งมีสูง พุทธ และยงยุทธ (2538) รายงานว่า น้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มียาปฏิชีวนะตกค้างมีผลต่อแบคทีเรียในแหล่งน้ำธรรมชาติ

เป็นที่ทราบกันดีว่า ในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา การใช้ยาปฏิชีวนะสารเคมีในการเลี้ยงกุ้งและตกค้างในผลิตภัณฑ์ ส่งผลกระทบทำให้ตลาดต่างประเทศต่อต้านผลิตภัณฑ์กุ้งและสัตว์น้ำจากประเทศไทย และเกิดปัญหากีดกันทางการค้าสูงขึ้น เริ่มจากในวันที่ 23 กุมภาพันธ์ ปี 2544 สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ กรุงเวียนนา ได้ประกาศห้ามจำหน่ายกุ้งจากประเทศไทยและประเทศเขตร้อน เนื่องจากตรวจพบว่ามียาคลอแรมเฟนิคอลปนเปื้อนอยู่ (ลิลา, 2545) ในปี 2544 ประเทศออสเตรเลียตรวจพบยาคลอแรมเฟนิคอลในเนื้อกุ้งส่งออกจากประเทศเขตร้อน และในปี 2545 ประเทศกลุ่มสหภาพยุโรปตรวจพบสารไนโตรฟูแรน ในผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำแช่แข็งจากประเทศไทย ทั้งนี้ได้มีการรณรงค์ให้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบปลอดสาร (organic product) เช่น ระบบ COC (Code of Conduct) หรือ GAP (Good Agricultural Product) อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญต่อเนื่อง เพราะยังไม่มีทางออกที่มีประสิทธิภาพสำหรับเกษตรกรในการรักษาโรคในสัตว์น้ำโดยไม่ใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี

ได้มีการคิดนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้รักษาโรคในกุ้งกันมากขึ้น เพื่อที่จะลดปัญหาเรื่องยาตกค้างที่จะส่งผลกระทบต่อการส่งออก ได้แก่ การใช้สารอาหารผสมในอาหารกุ้งเพื่อช่วยลดและป้องกันการเกิดโรคได้ Magarelli และคณะ (1979) Lightner และคณะ (1979) และ Machigashira และคณะ (1991) พบว่ากุ้งตระกูล *Penaeus* ต้องการวิตามินซีในปริมาณที่พอเหมาะ ทำให้กุ้งมีอัตรารอด อัตราแลกเนื้อและผลผลิตสูงขึ้น และยังสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคได้ อมรรัตน์ และมะลิ (2539) ทดลองได้ว่าการใช้วิตามินผสมอาหารแทนเตตร้าวัยคลิน ทำให้กุ้งโตดีกว่า มีอัตรารอดและอัตราแลกเนื้อสูงขึ้น 43% และมีนัยสำคัญทางสถิติ ลัดดาวัลย์ (2541) รายงานว่า การให้วิตามินซีเสริมในอาหารโดยไม่ผสมออกซีเตตร้าซัยคลิน เลี้ยงเป็นเวลา 112 วัน ช่วยให้กุ้งก้ามกรามแข็งแรง เจริญเติบโตดี และกุ้งไม่มีสารออกซีเตตร้าซัยคลินตกค้างในเนื้อกุ้งด้วย

สมุนไพรเป็นยาพื้นบ้านไทยที่ใช้รักษาโรคในคนกันมาแต่ครั้งโบราณ สำหรับคนกระทรวงสาธารณะสุขของไทยได้มีการรณรงค์มีการใช้สมุนไพรกันมากขึ้น สำหรับสัตว์น้ำก็ได้มีการ

นำสมุนไพรมาใช้เช่นกัน การใช้อาหารผสมสมุนไพรในการเลี้ยงสัตว์น้ำกำลังได้รับความสนใจสูง เนื่องจากสมุนไพรเป็นพืชที่สารออกฤทธิ์ในการรักษาโรคและเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ และสารเหล่านี้จากสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติสามารถย่อยสลายได้ เป็นสิ่งที่มีอยู่แล้วในประเทศ มีราคาถูก และมีความปลอดภัยสูง ดังนั้น การใช้สมุนไพรในการผสมอาหารเลี้ยงกุ้งก้ามกรามและรักษาโรคทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งต่อผู้บริโภคในการลดสารตกค้างในเนื้อกุ้ง และประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมในการลดสารตกค้างในแหล่งน้ำ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย 96 ชนิด โดยคัดเลือกสมุนไพรจากฐานข้อมูลที่ระบุว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ นำสมุนไพรเหล่านี้มาเตรียมสารสกัด ทำการทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด ได้แก่ *A. hydrophila* *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* จากนั้นเลือกสารสกัดบางชนิดที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 มาทดสอบความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกราม และทดลองใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการแช่และวิธีการกิน เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะ พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยหลายชนิดมีประสิทธิภาพดีในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ ซึ่งสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ควรมีการพัฒนาวิจัยเพื่อให้นำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้จริงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจหาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อโรคในกุ้งก้ามกราม
3. เพื่อศึกษาแนวทางในการใช้สมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม
4. เพื่อศึกษาแนวทางในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบยั่งยืนและรักษาสิ่งแวดล้อม ไม่มีสารตกค้าง
5. เพื่อเผยแพร่ข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับสมุนไพรในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งก้ามกราม

1.1 ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม (ยนต์, 2529)

ชื่อทั่วไป กุ้งก้ามกราม กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งก้ามเกลี้ยง กุ้งแห กุ้งใหญ่

ชื่อสามัญ giant freshwater prawn, giant river prawn

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Macrobrachuim rosenbergii* de Man

ชื่อวงศ์ Palaemonidae

1.2 ลักษณะทั่วไป (ศุภชัย, 2543)

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามมีลักษณะเปลือกหุ้มลำตัวสีน้ำเงินอมฟ้า ซึ่งสามารถแบ่งลำตัวออกเป็น 3 ส่วน คือ

ส่วนหัว ประกอบด้วยตาซึ่งอยู่บนก้านตา สามารถโยกไปมาได้ปลายสุดของหัวจะมีกรียื่นออกมา มีลักษณะแบนด้านข้าง ส่วนโคนนูนหนา และเรียวแหลมไปทางส่วนปลาย บริเวณกลางกรีจะโค้งงอ แอ่นลงด้านล่าง ปลายงอขึ้นขึ้น กรีทั้งสองด้านเป็นหนามหยักคล้ายกับฟันเลื่อย สันกรีล่างมีหยักประมาณ 10–14 หยัก สันกรีบนมีหยักประมาณ 12–15 หยัก หนวด 2 คู่

ส่วนลำตัว แบ่งออกเป็นปล้อง ๆ ทั้งหมด 6 ปล้อง ด้านท้องมีขาว่ายน้ำ 5 คู่ ใช้ประโยชน์ในการว่ายน้ำ หรือเคลื่อนที่ ขาเดิน 5 คู่

ส่วนหาง ประกอบด้วยแพนหางข้างละคู่ ตรงส่วนกลางมีลักษณะปลายแหลม

1.3 การแพร่กระจาย (สมพงษ์, 2546)

กุ้งก้ามกรามมีถิ่นกำเนิดอยู่ในภูมิอากาศเขตร้อน (tropical zone) แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งประกอบด้วยประเทศพม่า เวียดนาม เขมร อินโดนีเซีย ไทย และฟิลิปปินส์ ปกติกุ้งก้ามกรามสามารถพบได้ทั้งปี และส่วนมากจะอยู่ในแม่น้ำลำคลอง หนองบึง ทะเลสาบที่มีเขตติดต่อกับแม่น้ำ กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ของประเทศไทย

เมื่อถึงฤดูวางไข่ กุ้งตัวเมียจะเดินทางจากแหล่งน้ำจืดไปยังบริเวณปากแม่น้ำ หรือปากทะเลสาบ เพื่อวางไข่ ลูกกุ้งขณะที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีขนาดเล็ก ว่ายน้ำไม่แข็ง จะล่องลอยไปตามกระแสน้ำหรือเคลื่อนที่ไปตามคลื่นลม ในสภาพเดียวกับแพลงค์ตอนสัตว์อื่นๆ ส่วนหัวค่อนข้างโต ลำตัวเรียวเล็กไปทางหาง ขณะที่ลอยอยู่ในน้ำส่วนหัวจะอยู่ข้างล่างส่วนหางจะชี้ขึ้นข้างบน ชอบแสงสว่าง กินสัตว์ที่มีขนาดเล็กเป็นอาหาร ได้แก่ ไรน้ำ ไข่ปลา ไข่หอย หนอนทะเล และ แพลงค์ตอนขนาดเล็กทุกชนิด ลูกกุ้งจะใช้เวลาประมาณ 45-60 วัน กว่าจะเจริญเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่นขนาดตัว 1–2 เซนติเมตร มีอวัยวะครบถ้วนเหมือนพ่อแม่ ระยะนี้กุ้งจะหากินตามพื้นดิน และเดินทางกลับไปยังแหล่งน้ำที่บรรพบุรุษเคยอยู่อาศัย เพื่อเจริญเติบโตเป็นกุ้งใหญ่ต่อไป

1.4 **ระบบต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ** (ประจวบ, มปป.) ได้แก่

1.4.1 **ระบบห่อหุ้มร่างกาย (Integumentary system)**

กุ้งมีเปลือกเป็นส่วนที่ห่อหุ้มร่างกาย ชั้นเซลล์ที่ปกคลุมเนื้อเยื่อและอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Epidermis) ซึ่งอยู่ภายใต้เปลือกแบ่งเป็น 4 ชั้น คือ

1.4.1.1 ชั้นนอกสุด (Epicuticle) ประกอบด้วยสารประเภท ไขมัน โปรตีน และ หินปูนพวกแคลเซียมคาร์บอเนต

1.4.1.2 ชั้นที่สอง (Exocuticle) ประกอบด้วย สารไคติน โปรตีน แคลเซียมคาร์บอเนต เมลานิน และ คาโรตินอย ชั้นนี้มีลักษณะบางๆ เรียงซ้อนกันหลายชั้น

1.4.1.3 ชั้นที่สาม (Endocuticle) เป็นชั้นที่หนาที่สุด มีลักษณะชั้นคล้ายชั้นที่สอง แต่มีเมลานิน และ คาโรตินอยน้อยกว่า

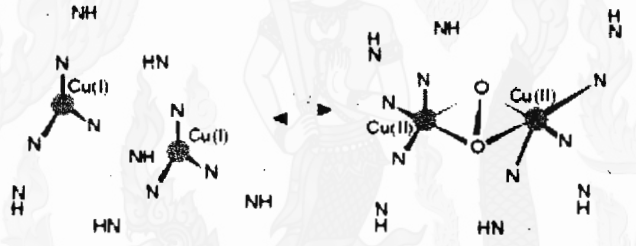
1.4.1.4 ชั้นในที่สุด (Membranous layer or uncalcified layer) มีโปรตีน และไคติน เป็นส่วนประกอบ

1.4.2 **ระบบหมุนเวียนของเลือด (Circulatory system)**

ระบบการไหลเวียนของเลือดกุ้งเป็นระบบเปิด (Open system) เมื่อหัวใจบีบตัวเลือดดีจะออกจากหัวใจไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยมีลิ้นหัวใจ (valve) ปิดกั้นไม่ให้เลือดไหลกลับ และ เลือดที่ขาดออกซิเจนจะไหลลงสู่แอ่งเลือด (Hamal sinus) ซึ่งมีกระจายอยู่ทั่วร่างกายจึง

รวมเข้าสู่แอ่งใหญ่ (Sternal sinus) และ ไหลเข้าเหงือกที่รับออกซิเจนใหม่เข้ามา เลือดที่มีออกซิเจนแล้ว (oxygenated blood) จะออกจากเหงือกผ่านเส้นเลือดดีไปเข้า แอ่งเลือดรอบหัวใจ แล้วเข้าสู่หัวใจทางรู ostium

ในน้ำเลือด (hemolymph) ของกุ้ง มีโปรตีนจำพวกฮีโมไซยานิน (Hemocyanin) เป็นไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยอะมิโน แอซิด 6 ชนิด ได้แก่ tryptophan, tyrosine, cystine, arginine, histidine และ lysine ซึ่งมีทองแดงเป็นส่วนประกอบปนอยู่ในน้ำเลือด ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซ พวกที่มีออกซิเจนจะเป็นสีฟ้า พวกที่ไม่มีออกซิเจนจะไม่มีสี และ มีไขมัน (lipid) เล็กน้อย



ภาพที่ 2 **โครงสร้างของฮีโมไซยานิน** (hemocyanin)

ที่มา: http://www.ml.duke.edu/projects/Magnus/images/

1.4.2.1 เม็ดเลือด (Blood cell) เม็ดเลือดของกุ้งทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยวิธีกลืนกิน (phagocytosis) ล้อมจับ (encapsulation) ทำให้จับตัวเป็นก้อน (coaggulation) เม็ดเลือดของกุ้งแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1) hyalinocyte หรือ agranulocyte เป็นเม็ดเลือดขนาดเล็กที่สุด และพบมากที่สุด ไม่มีกรานูล (granule) ในไซโตพลาสซึม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และไซโตพลาสซึมน้อย

2) intermediate granulocyte หรือ semi-granulocyte เป็นเม็ดเลือดที่มีกรานูลขนาดเล็ก และไม่เท่ากัน มีนิวเคลียสกลม หรือรูปไข่อยู่กลางเซลล์นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่า agranulocyte มีรูปร่างหลายแบบ

3) granulocyte หรือ eosinogranulocyte เป็นเม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ มีรูปร่างหลายแบบ นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายเม็ดถั่วอยู่ตรงกลาง มีกรานูลขนาดใหญ่และ

สม่ำเสมอ นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่า agranulocyte และ semi-granulocyte

1.4.2.2 อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) พบอยู่ในที่ต่างๆ กัน คือ รอบๆ lateral artery ซึ่งอยู่ระหว่าง epigastric hematopoietic tissues ด้านหลังสมอง และ ใน maxil-laped คู่ที่1 และ 2

1.4.2.3 Oka organ หรือ Lymphoid organ เป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน มี 1 คู่ มีลักษณะเป็นท่อจำนวนมากรวมกันเป็นกลุ่มรอบเส้นเลือด sub-gastric artery ที่แตกแขนงมาจาก anterior aorta ทั้งสองเส้นบริเวณหน้าหัวใจเล็กน้อย บริเวณนี้จะมีแอ่งเลือดเล็กๆ แทรกอยู่ทั่วไป

1.4.3 **ระบบหายใจ (Respiratory system)** กุ้งวัยอ่อนสามารถหายใจ หรือแลกเปลี่ยนก๊าซได้ทางผิวนอกที่ปกคลุมตัว กุ้งโตหายใจทางเหงือก จะมีการแลกเปลี่ยนก๊าซ และควบคุม osmoregulation ของน้ำรอบๆ ตัวกับของเหลวภายในตัวด้วย

1.4.4 **ระบบย่อยอาหาร (Digestive system)** แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1.4.4.1 ส่วนต้น (foregut) ประกอบด้วยปาก หลอดอาหาร และกระเพาะอาหาร ซึ่งอยู่ต่อมาจากหลอดอาหารไปจนถึงกึ่งกลางของตับและตับอ่อน มีลักษณะคล้ายตัวU หรือตัว J

1.4.4.2 ส่วนกลาง (midgut) ประกอบด้วย ลำไส้ ทำหน้าที่ย่อยอาหาร anterior midgut caeca อยู่ต่อจากกระเพาะอาหารส่วนท้าย ทำหน้าที่เป็นบริเวณพักอาหาร เพื่อให้เอ็นไซม์ย่อยจนสมบูรณ์ก่อนผ่านไปยังลำไส้ และ posteriror midgut caeca อยู่ทางตอนท้ายของตัวกุ้งระหว่างปล้องที่ 5 และ 6 เป็นส่วนที่ขดงอขึ้นไปด้านบน

1.4.4.3 ส่วนท้าย (hindgut) เป็นส่วนที่มาจาก posterior midgut caeca ไปจนถึง anus

1.5 **การป้องกันตัวของกุ้ง** (กิจการและคณะ, 2543ก)

ระบบภูมิคุ้มกันโรค คือ กลไกของสัตว์ในการป้องกันตัวเองต่อต้านและทำลายเชื้อจุลชีพที่ทำให้สัตว์เกิดการป่วยและตาย

1.5.1 **ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง** ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่

1.5.1.1 ระบบป้องกันการเข้าสู่ร่างกายของเชื้อจุลชีพ ที่ก่อโรคในกุ้ง ได้ 3 ทาง ได้แก่ เปลือก เหงือก และ ระบบทางเดินอาหาร

1.5.1.2 ระบบทำลายเชื้อจุลชีพที่เข้าสู่ร่างกาย กลไกการทำลายเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายของกุ้ง คือ เม็ดเลือดกุ้งทำหน้าที่กำจัดทำลายสิ่งแปลกปลอม ที่เข้าไปทำอันตรายต่อกุ้ง และน้ำเลือดของกุ้งจะมีสีน้ำเงินที่มีสีของฮีโมไซยานิน ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนขนส่งออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงเซลล์ พบบริเวณของกรีและฐานของกรีและโคนขาเดินในส่วนอก ได้แก่

prophenoloxidase activating system เป็นขบวนการค้นหาสิ่งแปลกปลอม ซึ่งระบบนี้ประกอบด้วย enzyme protein จำนวนมาก และส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งเกี่ยวกับการเปลี่ยน inactive prophenoloxidase ไปเป็น active prophenoloxidase จะเป็นส่วนสำคัญในการเกิด encapsulation และ melanization

melanization เป็นขบวนการที่เกิดหลังจากเกิด encapsulation และ nodule formation ซึ่งเกิดในพวก arthropods พบในบริเวณที่มีการอักเสบของ penaeid shrimp ที่เป็นโรค ขบวนการนี้ถูกกระตุ้นโดย prophenoloxidase system (proPO)

coagulation และ phagocytosis เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในตัวกุ้งพวก hyalocytes และ semi-granulocytes เป็นพวกแรกที่เข้าไปในบริเวณที่มีการบาดเจ็บ โดย haemocyte จะทำให้เลือดแข็งตัว เกิด coagulation, plasma fibrinogen กำจัดเชื้อโรค และช่วยสมานแผล ซึ่งทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเคลื่อนที่ไปบริเวณอื่นๆ ได้

1.6 อาการทั่วไปของกุ้งเป็นโรค (คณิต, 2543ก)

อาการเริ่มแรกของโรคกุ้งอาจจะสังเกตได้จากการตรวจดู จากบ่อกุ้งโดยตรง หรือจากการสุ่มตัวอย่าง ได้แก่

1.6.1 การสังเกตที่ขอบบ่อ กุ้งที่มีความเครียด เป็นโรค มักจะลอยขึ้นมาอยู่ตามผิวน้ำ หรือคลานอยู่ตามขอบบ่อ โดยปกติกุ้งจะหนีบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำมาที่มีออกซิเจนสูง หรือบริเวณที่สกปรกมาก ควรตรวจดูกุ้งในยอให้อาหาร และสำรวจบ่อเวลากลางคืนและเช้ามืดด้วย

1.6.2 การสังเกตในระหว่างการสุ่มตัวอย่าง การสุ่มโดยละเอียด โดยการตรวจอาหารในยอให้อาหาร หากอาหารเหลือแสดงว่ากุ้งเครียด ตรวจลำไส้กุ้งว่ามีอาหารหรือว่างเปล่า

1.6.3 การสังเกตลักษณะภายนอก ได้แก่

1.6.3.1 สีของกุ้ง กุ้งที่มีอาการเครียดจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ส่วนกุ้งแข็งแรงจะมีสีเขียวน้ำตาล หรือกุ้งที่มีบาดแผลจะเปลี่ยนเป็นสีดำหรือน้ำตาลอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการสร้างเม็ดสีในกระบวนการเมลานิน

1.6.3.2 เปลือกสกปรก เมื่อกุ้งอ่อนแอ พบว่าเปลือกของกุ้งสกปรกมีสิ่งมีชีวิตเกาะทั่วตัว เมื่อเกาะกันมากขึ้นทำให้กุ้งมีสีคล้ายโคลนตลอดลำตัว และลอกคราบไม่ออก

1.6.3.3 การเปลี่ยนแปลงที่เหงือก กุ้งที่ไม่แข็งแรงจะทำความสะอาดเหงือกได้น้อยลง ทำให้สิ่งสกปรกหรือติดอยู่ที่เหงือก สิ่งสกปรกเหล่านี้ ทำให้เหงือกเป็นสีน้ำตาล หากเหงือกกุ้งเป็นแผล บริเวณที่เป็นแผลจะเป็นสีดำ

1.6.3.4 การเปลี่ยนแปลงในทางเดินอาหาร สังเกตหากกระเพาะกุ้งว่างหรืออาหารน้อย แสดงว่ากุ้งไม่กินอาหารหรือกินเพียงเล็กน้อย อาการเช่นนี้เกิดขึ้นเมื่อให้อาหารไม่เพียงพอ หรือสภาวะสิ่งแวดล้อมไม่ดีทำให้กุ้งไม่กินอาหาร

1.6.3.5 การเปลี่ยนแปลงที่กล้ามเนื้อ หลังจากการลอกคราบ หรือหลังจากที่กุ้งอดอาหารเป็นเวลานาน พบว่าเนื้อกุ้งไม่เต็มเปลือก มักพบในกุ้งที่มีอาการเรื้อรังทำให้เบื่ออาหาร

2. โรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม

พรเลิศและชลอ (2529) กล่าวว่าโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับสัตว์น้ำและแสดงอาการผิดปกติให้เห็นนั้นมีสาเหตุมาจากปัจจัย 3 ประการ คือ สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อปลา มีเชื้อโรคที่รุนแรงที่จะทำให้เกิดโรค และปลาจะต้องอ่อนแอ จากการศึกษาพบว่าโรคระบาดปลานั้นจะเกิดหลังจากที่ฝนตกน้ำหลาก พอน้ำลดปลาจะค่อยๆ แสดงอาการมีแผลเกิดขึ้น จากการตรวจสอบพบว่ามีปรสิตภายนอกและเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และเชื้อไวรัสในกล้ามเนื้อและอวัยวะภายในปลาที่ป่วย

สิทธิ (2534) กล่าวว่าการเกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำจะต้องประกอบไปด้วยปัจจัยต่างๆ ร่วมกัน คือ สัตว์น้ำอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ มีความต้านทานต่อเชื้อโรคน้อย เชื้อโรคต้องมีความรุนแรงและสภาวะแวดล้อมต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญ และเข้าทำลายของเชื้อโรค

โรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม มักไม่เป็นโรคที่ก่อให้เกิดการตายอย่างฉับพลัน ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุโน้มนำก่อน ได้แก่ คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม สภาพแวดล้อมไม่ดี เช่น ฝนตกหนักติดต่อกันหลายวัน อากาศเย็น กุ้งไม่กินอาหาร หรือกินน้อยลง ลอกคราบแล้วหมกเลน

อ่อนแอลง จึงเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ลักษณะของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียที่สังเกตได้ ไม่กินอาหาร กระเพาะและลำไส้ว่าง ตัวเป็นแผลดำ หนวดกุด หางกุด ตับสีซีดจาง ถ้าป่วยเรื้อรังตับมีขนาดลีบเล็กลง อาจมีก้อนแข็งๆ อยู่ในตับ (ปภาศิริ, 2537; วิษณุ, 2542; กุ้งก้ามกราม, 2548) และมีผลให้ติดเชื้อไวรัสและเชื้อราได้ง่าย ทำให้ได้ผลผลิตกุ้งก้ามกรามคุณภาพต่ำ โตช้า เนื้อไม่แน่น ก่อให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ทำให้เกษตรกรต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันโรคแบคทีเรีย

2.1 โรคจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

ที่มา: Shanna et al. (2002)

A. hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขนาดประมาณ 1–4 ไมโครเมตร มีลักษณะเซลล์เป็นแท่งตรง เรียงตัวเดี่ยวๆ เป็นคู่หรือสายโซ่ ซึ่งต่อกันเป็นสายยาวถึง 8 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แส้ (flagellum) อยู่ที่บริเวณปลายของเซลล์ ไม่สร้างเม็สี (pigment) ไม่มีแคปซูล ลักษณะโคโลนี กลม ผิวเรียบ ตรงกลางนูนโค้ง สีขาวนวล เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร แบคทีเรียชนิดนี้เป็น facultative anaerobe จึงเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจน และ ไม่มีออกซิเจน เป็น Chemo-organotroph จึงเจริญได้ดีในที่ที่มีสารอินทรีย์ เมื่อหมักคาร์โบไฮเดรตได้ หรือได้ทั้งกรดและแก๊ส สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สามารถรีดิวซ์เกลือไนเตรท เจริญที่อุณหภูมิช่วงกว้าง ต่ำสุด 0-5 องศาเซลเซียส สูงสุด 38-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม 25-30 ^{o}C และช่วงความเป็นกรด

ด่าง (pH) 5.5-9.0 (นันทริกา, 2539) แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยเฉพาะแหล่งน้ำเสียที่มีอินทรีย์สารมาก เช่น น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และแหล่งชุมชน (สุภาพร, 2542)

A. hydrophila สามารถเข้าไปทางปาก ผิวหนัง เหงือกของสัตว์น้ำได้ ซึ่งจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในลำไส้และบริเวณที่เข้าไป แล้วแพร่กระจายตามกระแสเลือดทั่วร่างกาย จากนั้นจึงปล่อยสารพิษ haemolysins, cytotoxins และ enterotoxis ทำให้มีอาการตกเลือดบริเวณผิวหนังและอวัยวะภายในทั่วร่างกาย ทำให้เกิดโรค Motile aeromonas disease มากพบในปลาน้ำจืด เมื่อเกิดการระบาดจะทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมาก ถ้าสภาพแวดล้อมไม่ดี ปลาอ่อนแอ การระบาดจะรุนแรงขึ้น ทำให้อัตราปลาตายสูง ปลาจะว่ายน้ำเชื่องช้าลง ว่ายขึ้นมาออกันตรงผิวน้ำ การทรงตัวไม่ดี ไม่ยอมกินอาหาร บางครั้งจะระบาดไปยังสัตว์อื่นๆ ทำให้มีชื่อเรียกหลายชนิด เช่น โรคปากแดง (red mouth disease) โรค bacterial septicemia โรค red sore disease โรคขาแดงในกบ (ชะลอ, 2528; Inglis et al., 1993) และก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำ โรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง โรคแก้ม (กุ้งก้ามกราม, 2548; วิษณุ, 2542)

โรค shell disease หรือโรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง เกิดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* และบางครั้งจะถูกแทรกซ้อนด้วยโรคเชื้อราภายหลัง เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะเกาะกินและทำลายเปลือกกุ้ง ทำให้บริเวณที่มีเชื้อเป็นจุดสีดำ รอยดำหรือสีน้ำตาลบนเปลือกบริเวณหัว ลำตัวและรยางค์ของกุ้ง (สุปราณี, 2545) ทำให้กุ้งที่เลี้ยงมีคุณภาพต่ำและเสียราคา อาการอีกอย่างที่มักพบในกุ้งที่เป็นโรคจุดดำบนเปลือกคือ กุ้งจะแสดงความก้าวร้าว และชอบกัดตัวอื่นที่เล็ก หรืออ่อนแอกว่า จึงยิ่งทำให้มีปัญหามากขึ้น (ศุภชัย, 2543)

A. hydrophila เป็นชนิดที่ก่อโรคในคนได้ด้วย มีลักษณะโคโลนีคล้ายของแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ ที่อยู่ในลำไส้ เมื่อนำตัวอย่างของอุจจาระมาทดสอบ พบว่ามีเชื้อ *A. hydrophila* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Aeromonas* ซึ่งมีลักษณะความแตกต่างที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบจากลำไส้ ต่างจากแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบในลำไส้ ตรงที่มีปฏิกิริยาออกซิเดส เป็นบวกและมีโพลาร์แฟลกเจลลา (นงลักษณ์, 2537)

2.2 โรคจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

ภาพที่ 4 ลักษณะเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
ที่มา: Makino et al. (2003)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะท่อนตรงหรือโค้ง ขนาด 0.5x1.5-3 µm ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูล ย้อมติดสีที่ปลายทั้งสองข้าง (bipolar-staining) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลัม (flagellum) 1 เส้น ที่อยู่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์ สามารถย่อยแป้ง (hydrolyzed starch) เป็น positive กับ cytochrome oxidase และ phenoloxidase สามารถใช้กลูโคสแบบ fermentation มีการเมตาโบลิสซึม แบบใช้ออกซิเจน สร้างสารพิษ exotoxins มีเอ็นไซม์ฮีโมไลซิน (hemolysin) และไคตินเนส (chitinase) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ระหว่าง 35-37^{o}C ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ที่ 10-44^{o}C ช่วง pH ในการเติบโตอยู่ระหว่าง 6-9 ต้องการเกลือในการเติบโตประมาณ 2-8 % และ สามารถเติบโตได้ที่มีเกลือ 7 % (ยอดยิ่ง, 2540)

V. parahaemolyticus พบได้ทั่วไปโดยเชื้อจะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ตามชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งฝั่งทะเลไทย แต่ในช่วงฤดูที่มีอากาศอบอุ่นจะพบเชื้อนี้ได้อยู่ทั่วไปในน้ำทะเล ในปลา กุ้ง หอย และปู นอกจากนี้ยังพบได้ตามแหล่งน้ำจืดทั่วไป และบริเวณปากอ่าวแม่น้ำ ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นเชื้อก่อโรคและไม่เป็นเชื้อก่อโรค

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรคเปลือกกร่อน โรคขี้ขาว โรคตับอักเสบ ในกุ้ง (กุ้งก้ามกราม, 2548; วิษณุ, 2542)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

Characters	Response	Characters	Response
motility	+	TCBS growth	-
Growth at 5 °C	+	Growth in KCN	+
37 °C	+	Oxides	+
Growth in 0 %NaCl	+	Catalase	+
5 %NaCl	-	H_2S production	+
7 %NaCl	-	Simmon's citrate	+
Sensitive of 0/129(10 µg)	R	Colony morphology	
Iodole	+	Flat and raised	+
Methyl red	d	Convex	-
Voges-Proskauer	d	Entire edge	-
Citrate as C source	d	Irregular edge	-
Gluconate oxidation	d	Transparent	-
Arginine dihydrolase	+	Translucent	+
Lysine decarboxylase	-	Opaque	-
Ornithine decarboxylase	-	Size of colony	
Urease	-	<2 m.m.	-
β-galactosidase	+	2-5 m.m.	+
Hydrolysis of gelatin	+	<5 m.m.	-
casein	+	Hemolysis	
starch	+	Complete	+
Gas from glucose	d	Partia	-
Acid from arabinose	+	Gram negative	+
maltose	+	Cell morphology	
sucrose	+	Coccoid	-
trehalose	+	Short rod	+
glycerol	d	Long shot	+
mannitol	+	Pleomorphic	+
sorbitol	d	Fermentative	+
salicin	+		

R = resistant : S = sensitive : + = 90% or more strains positive : - 90% or more negative : d = 11 – 89% strains positive

ที่มา: ปภาศิริ (2537)

ในคน *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหาร และ ลำไส้อักเสบ เชื้อชนิดนี้มีระยะฟักตัว 4-96 ชั่วโมง จะเจริญเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุก 12-15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C และสร้างสารพิษ entrerotoxin ขึ้นในลำไส้ ผู้ป่วยจะแสดงอากาหลังจากรับเชื้อประมาณ 15 ชั่วโมง ทำให้เกิดอาการท้องเสีย เป็นตะคริวในช่องท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดหัว มีไข้ และหนาวสั่น อาการป่วยค่อนข้างเบาหรืออยู่เพียงระดับกลางๆ แต่มีบางรายที่จะต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล

2.3 โรคจากเชื้อ *Vibrio harveyi*

ภาพที่ 5 ลักษณะเชื้อ *Vibrio harveyi*

ที่มา: Bioluminescence (2004)

V. harveyi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ โค้ง เคลื่อนที่ได้ด้วย polar flagella ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน เติบโตได้ในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลือง โดยเกิดจากเอ็นไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) ซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด พบทั่วไปในน้ำเค็ม (นนทวิทย์, 2537)

V. harveyi มีลักษณะทางชีวเคมีคล้าย *V. parahaemolyticus* เจริญได้น้ำที่มีความเค็ม 30-60 ppt และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วที่ความเค็ม 10-40 ppt ค่าพีเอชน้ำที่เชื้อนี้เจริญเติบโตดี คือ 7-9 และ ที่อุณหภูมิน้ำ 25-35°C

V. harveyi เป็นสาเหตุของโรคกุ้งเรืองแสง หรือโรคเพชรพลอย ในลูกกุ้งวัยอ่อน ระยะ nauplius ของกุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งก้ามกราม จะมีความไวต่อเชื้อโรคมากที่สุด รองลงมาคือ ระยะ mysis ในระยะ post larva จะมีความทนทานดีกว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถทำให้กุ้งตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ พบได้ตั้งแต่ลูกกุ้งในบ่อ 2 สัปดาห์ จนถึงกุ้งใหญ่ขึ้นกับการจัดการบ่อ และสภาพของพื้นบ่อ พบมากในกุ้งอายุ 30-60 วัน

แบคทีเรียชนิดนี้เข้าไปเกาะตามตัวกุ้ง สามารถเจาะผ่านเหงือกกุ้งเข้าไปอยู่ภายในเหงือก และน้ำเลือดกุ้งได้ เมื่ออยู่ในเหงือกทำให้กุ้งมีเหงือกสีขา จะพบว่ากุ้งที่มีอาการป่วยจะขึ้นมาเกยตามขอบบ่อ หรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ และเห็นการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบ โดยน้ำส่วนของตับและตับอ่อน หรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จะได้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเป็นชนิดสีเขียว เมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วยส่วนตับและตับอ่อนนั้น ถูกทำลายอย่างรุนแรงทำให้การย่อยอาหาร ไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมอยู่ในตับจะน้อยลง พบว่าลำไส้เกิดเซลล์ตาย และมีอาการอักเสบอย่างชัดเจน นอกจากนี้เซลล์ของวิบริโอชนิดนี้จะถูกทำลายโดยไวรัส (bacteriophage) ทำให้เซลล์แตก และกุ้งตายยกบ่อ เนื่องจากสารพิษ endotoxin ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ละลายปนไปกับน้ำเลือด (ยอดยิ่ง, 2540)

ชลอ (2528) ระบุว่า โรคเรืองแสงเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย วิบริโอ ฮาวีไอ (*Vibrio harveyi*) ซึ่งมีความรุนแรงของโรคสัมพันธ์กับความเค็มของน้ำ ฤดูกาล อีกทั้งปัจจัยที่โน้มน้าวนำให้เป็นโรคเรืองแสงทวีความรุนแรงคือ ปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ

ดารุณีและคณะ (2530) กล่าวว่า แบคทีเรียเรืองแสงสามารถเจริญอย่างมากในบ่อเพาะฟักในขณะที่เกิดการตายของลูกกุ้งระยะต่างๆ ประมาณ 70-100% จากการจำแนกชนิดตามลักษณะทาง morphology และการทดสอบทาง pathogenicity ใช้อาหารเลี้ยงสำหรับเชื้อ *V. harveyi* พบว่าลูกกุ้งแชบ๊วยระยะ nauplii มีความไวต่อ *V. harveyi* มากที่สุด ขณะที่ mysis และ post-larva มีความไวน้อยลงตามลำดับ *V. harveyi* มีความไวต่อยาคลอแรมฟีนิคอล แต่มีความต้านทานต่อยาสเตรปโตมัยซิน

3. วิธีการรักษาโรคสัตว์น้ำ (ชลอ, 2528)

การรักษาสามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีทั้งข้อดีและข้อเสีย การเลือกวิธีที่จะทำการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของโรคและสถานการณ์ในแต่ละเวลาและความเหมาะสม วิธีการรักษา มีดังนี้

3.1 **การจุ่ม** วิธีนี้จะจุ่มสัตว์ลงไปในสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงในระยะเวลาสั้น ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อกุ้งได้ เหมาะสำหรับสัตว์น้ำปริมาณน้อย

3.2 **การแช่สั้น** วิธีนี้นิยมใช้ในบ่อที่มีขนาดเล็ก สามารถถ่ายน้ำได้สะดวก โดยการใส่ยาหรือสารเคมีลงไปในน้ำที่มีสัตว์น้ำป่วย ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเปลี่ยนน้ำทันที หรือค่อยๆ ปล่อยน้ำสะอาดเข้ามาในบ่อ เพื่อล้างสารเคมี หรือยา การแช่สั้นจะต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก ซึ่งสารเคมีอาจจะทำอันตรายต่อสัตว์น้ำที่ทำการรักษาได้

3.3 **การแช่ในระยะยาว** วิธีนี้นิยมใช้มากในบ่อขนาดใหญ่ โดยใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นต่ำใส่ลงไปจนกระทั่งสลายตัวไปเอง วิธีนี้เป็นวิธีที่ปลอดภัยที่สุด

3.4 **การผสมในอาหาร** วิธีนี้นิยมใช้รักษาโรคติดแบคทีเรีย และหนอนพยาธิภายในบางชนิด จะต้องผสมยาลงอาหารให้ปลาป่วยกินเป็นระยะเวลานานติดต่อกัน การรักษาจะไม่ได้ผล ถ้าปลาป่วยไม่ยอมกินอาหาร หรือกินอาหารไม่ติดต่อกันพอที่รับยาในระดับที่สามารถฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้

3.5 **การฉีด** วิธีที่นี้เหมาะสมสำหรับสัตว์น้ำใหญ่ และมีราคาสูง นิยมฉีดเข้าท้องหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งยาจะแพร่ไปทั่วร่างกายได้อย่างรวดเร็ว แต่วิธีนี้ผู้ฉีดที่ไม่มีความชำนาญอาจทำให้อวัยวะภายในเป็นอันตรายได้

4. ยาปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial drug) หมายถึง สารต่อต้านการดำรงชีวิต มีผลต่อการเจริญเติบโต การแบ่งตัว หรือการมีชีวิตอยู่ของจุลชีพรวมถึงยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic antimicrobial) ซึ่งออกฤทธิ์โดยตรงต่อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรค ดังนั้นการใช้ยาต้านจุลชีพจึงมีความจำเป็น ในการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เพราะการติดเชื้อและการแพร่กระจายจะอยู่ในลักษณะที่เป็น systemic infection (ปภาศิริ, 2537)

ยาต้านจุลชีพ รวมถึงยาปฏิชีวนะ และยาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมีฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโต หรือการแบ่งตัว หรือการมีชีวิตอยู่ของจุลินทรีย์

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หมายถึง สารประกอบเคมีที่แยกได้จากจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น โดยจะเข้าไปยับยั้งหยุดการเจริญเติบโต หรือมีฤทธิ์ทำลายเชื้อนั้นๆ (ชะลอ, 2528)

4.1 การออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (ปภาศิริ, 2537)

4.1.1 ยาที่สามารถฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ (bactericidal activity) โดยจะทำลายส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ ซึ่งไม่สามารถหาสิ่งอื่นมาทดแทนได้ ได้แก่ DNA ผนังเซลล์ และเป็นการทำลายอย่างถาวร ซึ่งเป็นการทำงานซับซ้อนกับขบวนการต้านทานโรคของร่างกาย

4.1.2 ยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (bacteriostatic activity) หลัง จากนั้นขบวนการต้านทานโรคของร่างกาย เช่น macrophage, antibody จะกำจัดจุลินทรีย์พวกนี้ออกจากร่างกาย

4.2 อันตรายจากการใช้สารต้านจุลชีพที่ไม่ถูกต้อง มีดังนี้

4.2.1 ร่างกายเคยชินต่อการใช้สารต้านจุลชีพทำให้การรักษาโรคในเวลาต่อมาไม่ได้ผล

4.2.2 เชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น ซาลโมแนลลา จะดื้อยาและยากในการรักษา ถ้าเกิดการติดเชื้อในคน

4.2.3 เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในคน เช่น ยากลุ่มไนโตรฟูแรน

4.2.4 เป็นสาเหตุให้เกิดโรคโลหิตจางในคน เช่น ยาคลอแรมฟีนิคอล

4.2.5 ทำลายสิ่งแวดล้อม

4.3 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ปิยะบุตร, 2545; ลิลา, 2545)

มีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ไนโตรฟูแรน คลอแรมฟินิคอล ออกโซลินิค แอซิด ฟลูมิควิน นอร์ฟล็อกซาซินเอ็นโรฟล็อกซาซิน พีฟล็อกซาซิน ไซโปรฟล็อกซาซิน ซัลฟานิลาไมด์ และเตตร้าซัยคลิน เป็นต้น

ในการทดลองนี้ เลือกใช้ยาออกซีเตตร้าซัยคลิน เนื่องจากเป็นยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างกว้างขวาง และได้รับอนุญาตให้ใช้อย่างถูกต้องทางกฎหมาย ขึ้นทะเบียนให้ใช้ในการผลิตสัตว์น้ำและสัตว์บกเพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยสิ่งสำคัญที่สุดการใช้จะต้องไม่มีสารตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์เกินค่ามาตรฐานที่กำหนด มีความปลอดภัย และสามารถบริโภคได้ เรียกว่า ค่า MRL (maximum residue limit) ซึ่งประเทศญี่ปุ่น กำหนดค่า MRL ที่ 0.05 ppm และสหภาพยุโรป ที่ 0.01 ppm (ลิลา, 2545)

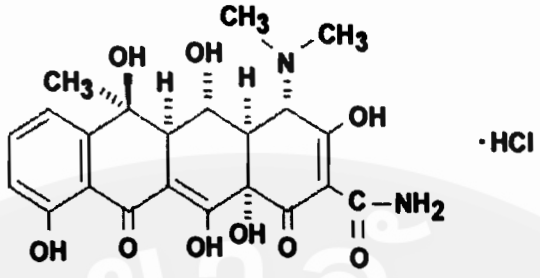
ออกซีเตตร้าซัยคลิน (Oxytetracycline)

มีชื่อทางการค้าว่า เทอร์รามัยซิน (terramycin) ผลิตจากเชื้อรา ชื่อ *Streptomyces rimosus* ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1948 โดย Duggar และคณะวิจัย ยาชนิดนี้เมื่ออยู่ในสภาพบริสุทธิ์จะเป็นสีขาว หากอยู่ในสารละลายที่มี pH เท่ากับ 7 ออกฤทธิ์ได้ดีที่ 5.5-6 เป็นผลึกสีเหลือง มีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรีย คือ ระงับการสังเคราะห์โปรตีน หยุดการใช้กรดไรโบนิวคลีอิคสำรอง ซึ่งทำให้กรดนี้หายไปหลังจากทำให้เกิดปฏิกิริยาแตกตัวของโมเลกุลใหญ่ (depolymerization) เป็นนิวคลีโอไทด์เชิงเดี่ยว นอกจากนี้ยังไประงับการหายใจของเซลล์ (cell respiration) (ชัยชาญ, 2523)

ออกซีเตตร้าซัยคลินอยู่ในกลุ่มยาเตตร้าซัยคลิน ออกฤทธิ์สั้น (ระยะครึ่งชีวิต = 6-9 ชั่วโมง) ทำให้ต้องใช้บ่อย เสียค่าใช้จ่ายมาก และเสียเวลา มีพิษต่อระบบส่วนกลาง (central nervous system-CNS) มีพิษต่อตับและตับอ่อน หากใช้เป็นเวลานานทำให้เกิดอาการแพ้แสงด้วย

ปัญหาการดื้อยา การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาออกซีเตตร้าซัยคลิน เกิดจากความสามารถในการขับยาจากเซลล์ (active efflux) ซึ่งเป็นกลไกในการอาศัยพลังงาน PMF (proton-motive force) หรือ ATP แบคทีเรียพวกนี้มีโปรตีนที่สำคัญ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) คือ inner membrane protein เป็นโปรตีนที่สำคัญในกลไกการขับยาออกนอกเซลล์

นอกจากนี้ การดื้อยาของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้ ยังถูกควบคุมโดยยีน (genes) หลายกลุ่ม เรียกว่า gene tet เช่น กลุ่มโปรตีน class A-E มี gene Tet A-Tet E, class M และ class O มี gene Tet M, class K-L มี gene Tet K-Tet L เป็นต้น (ยอดยิ่ง, 2540)



ภาพที่ 6 **โครงสร้างของออกซีเตตร้าซัยคลิน** (oxytetracycline)

ที่มา: Upper Midwest Environmental Sciences Center (2006)

กลไกการออกฤทธิ์ของยาออกซีเตตร้าซัยคลิน (oxytetracycline) **สามารถออกฤทธิ์กว้างครอบคลุม เชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ เชื้อ** anaerobic bacteria, mycopplasma, rickettsiae, chlamydiae, spiro-chetes **และ** protozoa **บางชนิด การออกฤทธิ์ของยา โดยจับกับ** 30S subunit **ของไรโบโซม และยับยั้งเอนไซม์ที่จะต่อ** aminoacyl t-RNA **กับ** ribosome acceptor site **จึงหยุดการสังเคราะห์โปรตีนได้ ฤทธิ์ของยาจะเสื่อมง่ายได้ ถ้า** pH **ต่ำ จะเกิด** epimerization **เกิดการสลายตัวเร็ว ถ้าอุณหภูมิสูง** isomerization **จะเกิดการสลายตัวได้เร็วที่สุด (สุวณีและมาลัย, 2536)**

4.4 ปัญหาสารปฏิชีวนะ

ความเป็นมาของปัญหาสารตกค้างในสินค้ากุ้งที่นับว่าเป็น ปัญหาใหญ่ระดับชาตินั้น เกิดขึ้น เมื่อต้นที 2544 สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงเวียนนา ได้มีหนังสือด่วนลงวันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2544 แจ้งว่า ซูเปอร์มาร์เกตใหญ่ของออสเตรียได้ประกาศเลิกวางจำหน่ายกุ้งจากประเทศในเขตร้อนรวมทั้งกุ้งจากประเทศไทยด้วย ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มเอนจีโอ ซึ่งเป็นสมาชิกของกรีนพีซ ได้ตรวจพบยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลในกุ้งที่วางจำหน่ายในซูเปอร์มาเกตของประเทศออสเตรีย และยังระบุว่ากุ้งที่ตรวจพบยาคลอแรมเฟนิคอลนั้นเป็นกุ้งที่ผลิตจากประเทศในเขตร้อน ผู้แทนจำหน่ายอาหารทะเลรายใหญ่ที่สุดของออสเตรียซึ่งเป็นผู้นำกุ้งดังกล่าว จึงประกาศเลิกจำหน่ายกุ้งที่ส่งมาจากประเทศเขตร้อนทั้งหมดซึ่งกระทบถึงกุ้งไทยด้วย (ลิลา, 2545)

5. พืชสมุนไพร

5.1 ความหมายสมุนไพร

สมพร (2526) กล่าวว่า สมุนไพร ตามพระราชบัญญัติ พ.ศ. 2510 หมายความว่า ยาที่ได้มาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุจากธรรมชาติ ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายใน สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ และบำรุงร่างกายได้

สมพร (2542) กล่าวว่า ยาสมุนไพร (crude drugs) คือ ยาธรรมชาติทั้งแห้งและสดที่ไม่ได้แปรรูปที่ได้จาก พืช สัตว์ แร่ธาตุ เช่น รากชะเอม เปลือกต้นควินิน แก่นฝาง ใบมะขามแขก ดอกเก็กฮวย เมล็ดพริกไทย ไขผึ้ง น้ำผึ้ง และมหาหิงคุ์ เป็นต้น พืชสมุนไพรหมายถึง (medical plant) หมายถึง พืชธรรมชาติทั้งสด และแห้งในสภาพที่ยังมิได้แปรรูปโดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่อยู่ใต้ดิน และเหนือดินเช่น รากชะเอม เปลือกต้นควินิน แก่นฝาง ใบมะขามแขก ดอกเก็กฮวย ผลมะตูม และเมล็ดพริกไทย

สุพจน์ (2543) กล่าวว่า สมุนไพร หมายความว่า ผลิตผลทางธรรมชาติได้จาก พืช สัตว์ และ แร่ธาตุ ที่ใช้เป็นยา หรือ ผสมกับสารอื่นตามตำรับยา เพื่อบำบัดโรค บำรุงร่างกาย หรือ ใช้เป็นยาพิษ เช่น กระเทียม น้ำผึ้ง กำมะถัน โล่ติ้น ยางดำ เป็นต้น

นิลศิริและพะยอม (2534) กล่าวว่า คำว่า "สมุนไพร" ตามความหมายของพระราชบัญญัติยา หมายถึงยาที่ได้จากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ ซึ่งยังมิได้ผสมหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังคงเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ มนุษย์ในสมัยโบราณได้เสาะแสวงหาพืชเพื่อนำมาใช้เป็นอาหาร เชื้อเพลิง เครื่องนุ่งห่ม ที่พักอาศัยและใช้เป็นยาป้องกันบำบัดรักษาโรค พืชจึงเป็นเครื่องสนองความต้องการในการดำรงชีวิตเพื่อความอยู่รอด

วันดี (2539) กล่าวว่า คำว่า สมุนไพร ตาม พ.ร.บ. ยา หมายถึง "ยาที่ได้จากพืช สัตว์หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสม ปรุง หรือแปรสภาพ" เช่นพืชก็ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งยังมิได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใดๆ แต่ในทางการค้าสมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปแบบต่างๆ เช่น ถูกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลง บดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่ง อย่างไรก็ตามในความรู้สึกของคนทั่วๆ ไป เมื่อกล่าวถึงสมุนไพร มักจะนึกถึงเฉพาะต้นไม้ที่นำมาใช้เป็นยาเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสัตว์และแร่มีการนำมาใช้น้อย และใช้เฉพาะในโรคบางชนิดเท่านั้น

สมุนไพรนอกจากจะใช้เป็นยาแล้ว ยังใช้ประโยชน์เป็นอาหารใช้เตรียมเป็นเครื่องดื่ม ใช้เป็นอาหารเสริม เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ใช้แต่งกลิ่น แต่งสีอาหารและยา ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าแมลงอีกด้วย ในทางตรงกันข้าม มีสมุนไพรจำนวนไม่น้อยที่มีพิษ ถ้าใช้ไม่ถูก

วิธีหรือใช้เกินขนาดจะมีพิษถึงตายได้ ดังนั้นการใช้สมุนไพรจึงควรใช้ด้วยความระมัดระวังและใช้อย่างถูกต้อง

5.2 **การเก็บยาสมุนไพรให้ได้สรรพคุณที่ดี** มีดังนี้ (นันทวัน, 2542)

5.2.1 **พืชที่ให้น้ำมันหอมระเหย** ควรเก็บในขณะดอกกำลังบาน

5.2.3 **เปลือก** ควรเก็บก่อนพืชเริ่มผลิใบใหม่

5.2.4 **ใบ** ควรเก็บก่อนพืชออกดอกในเวลากลางวันและมีอากาศแห้ง

5.2.5 **ดอก** ควรเก็บเมื่อดอกเจริญเต็มที่คือดอกตูมหรือแรกแย้ม

5.2.6 **ผล** ควรเก็บผลที่โตเต็มที่แต่ยังไม่สุก

5.2.7 **เมล็ด** ควรเก็บเมื่อผลสุกงอมเต็มที่ จะมีสารสำคัญมาก

การเก็บรักษาพืชสมุนไพรเอาไว้เป็นระยะเวลานาน มักจะเกิดการขึ้นของรา หรือมีหนอน เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสี กลิ่น ทำให้ยาสมุนไพรเสื่อมคุณภาพลงได้ และไม่ออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้ ด้วยเหตุนี้ จะต้องมีการเก็บรักษาที่ดีเพื่อประกันคุณภาพ และฤทธิ์การรักษาของยาสมุนไพร

5.3 **รูปแบบของยาสมุนไพร** ได้แก่

5.3.1 **ใช้ในรูปสด** สมุนไพรบางชนิดที่นิยมใช้ในรูปสด จึงจะให้ผลดี เช่น รุ้นจากใบว่านหางจระเข้สด ใช้ทาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ใบผักบุ้งทะเลสด นำมาตำใช้ทาแผลที่ถูกพิษแมงกะพรุน หรือ กระเทียมสด นำมาฝานเป็นชิ้นบางๆ ใช้ทาบริเวณผิวหนังที่เป็นเชื้อรา เป็นต้น ในกรณี การใช้สมุนไพรสด ควรระวังในเรื่องของความสะอาด เพราะถ้าสกปรก อาจเกิดการติดเชื้อจึงทำให้แผลเป็นหนองได้

5.3.2 **ตำคั้นเอาน้ำกิน** ใช้สมุนไพรสดๆ ตำให้ละเอียดจนเหลว ถ้าไม่มีน้ำให้เติมน้ำลงไปเล็กน้อย คั้นเอาน้ำยาที่ได้กิน เช่น กะทือ กระชาย ให้นำไปเผาไฟให้สุกเสียก่อน จึงค่อยตำ

5.3.3 **ยาชง** ส่วนมากนิยมใช้ใบไม้ เช่น หญ้าหนวดแมว ชุมเห็ดเทศ กระเจี๊ยบ เป็นต้น ทำโดยใช้สมุนไพร 1 ส่วน ผสมกับน้ำเดือด 10 ส่วน ปิดฝาทิ้งไว้ 5-10 นาที ยาชงเป็นรูปแบบยาที่มีกลิ่นหอม ชวนดื่ม และเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ตัวยาหนึ่งชุดนิยมใช้เพียงครั้งเดียว

5.3.4 **ยาต้ม** เป็นวิธีที่นิยมใช้ และ สะดวกมากที่สุด สามารถใช้ได้ทั้งสดหรือ

แห้ง ซึ่งสารสำคัญสามารถละลายได้ในน้ำ โดยการนำตัวยามาทำความสะอาด สับให้เป็นท่อนขนาดพอเหมาะ และให้ง่ายต่อการทำละลายของน้ำกับตัวยานำใส่ลงในหม้อ

5.3.5 **ยาดอง** ใช้ได้ผลดีกับตัวยาที่สารสำคัญละลายน้ำได้น้อย น้ำยาที่ได้จะออกฤทธิ์เร็ว และแรงกว่าการใช้วิธีต้ม นิยมใช้กับตัวยาแห้ง ห้ามใช้กับผู้ที่มีความดัน โลหิตสูง โรคหัวใจ และหญิงมีครรภ์

5.3.6 **ยาเม็ด** ยาไทยส่วนมากมักจะมีรสไม่ค่อยชวนรับประทาน สำหรับตัวยาบางตัว สามารถนำมาทำเป็นยาเม็ด นิยมทำเป็นแบบลูกกลอน (เม็ดกลม) และเม็ดแบน (โดยใช้แบบพิมพ์อัดเม็ด) ในปัจจุบันเพิ่มการบรรจุแคปซูลเข้าไปอีกวิธีหนึ่ง โดยการนำตัวยาที่ผ่านการอบให้แห้งและฆ่าเชื้อ แล้วมาบดให้ละเอียด ใช้น้ำผึ้ง หรือน้ำกระสายยาอื่นๆ มาผสมเพื่อปั้นเม็ด เช่น น้ำดอกไม้เทศ เหล้า เป็นต้น

5.4 ข้อดีของสมุนไพร

การนำสมุนไพรที่มีอยู่ตามธรรมชาติมาใช้ ทำให้ไม่ต้องกลัวปัญหาขาดแคลนยา เนื่องจาก ยาแผนปัจจุบันหลายตัวทำมาจากวัตถุเคมีที่ได้จากผลิตผลน้ำมัน ซึ่งนับวันน้ำมันกำลังขาดแคลนมากขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการเตรียมรับสถานการณ์โลก จึงควรที่จะศึกษาข้อมูลสมุนไพรและนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ให้มากขึ้น อีกทั้งสมุนไพรยังมีราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบันมาก เพราะสมุนไพรเป็นทรัพยากรที่มีอยู่แล้ว ดังนั้นควรมีการส่งเสริมการเพาะปลูกสมุนไพรให้เป็นเศรษฐกิจเพื่อในประเทศและเป็นสินค้าส่งออก โดยต้องคำนึงถึงคุณภาพของผลผลิต และควรส่งออกในรูปของสารสกัดจะทำให้ได้ราคาดีกว่าการส่งออกในรูปวัตถุดิบ สมุนไพรยังเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่อยู่ตามชนบทที่ไม่สามารถมารับบริการจากสถานบริการการแพทย์แผนปัจจุบันได้ ควรมีการแนะนำให้ใช้สมุนไพรที่เชื่อถือได้ในการรักษาโรคเบื้องต้น

5.5 สารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพร แบ่งได้ 7 กลุ่ม ดังนี้ (พรรนิภา, 2542; รัตนา, 2547)

5.5.1 **คาร์โบไฮเดรต** (carbohydrates) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบ ด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน คาร์โบไฮเดรตเป็นกลุ่มสารที่พบมากทั้งในพืชและสัตว์ ส่วนสารที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง น้ำตาล กัม (gum) วุ้น (agar) น้ำผึ้ง และ เพคติน (pectin) เป็นต้น

5.5.2 **ไขมัน (lipids)** เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) และเมื่อทำปฏิกิริยากับด่างจะกลายเป็นสบู่ น้ำมันในพืชหลายชนิดเป็นยาสมุนไพร เช่น น้ำมันละหุ่ง น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น

5.5.3 **เรซินและบาลซัม (resins and bal sums)** เรซินเป็นสารอินทรีย์ หรือสารผสมประเภทโพลีเมอร์ มีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่จะเปราะ แตกง่าย บางชนิดจะนิ่ม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในตัวทำลาย อินทรีย์ เมื่อเผาไฟจะหลอมเหลวได้สารที่ใส ข้น และเหนียว เช่น ชันสน เป็นต้น ส่วนบาลซัม เป็นสาร resinous mixture ประกอบด้วย กรดซินนามิก (cinnamic acid) หรือเอสเตอร์ของกรดสองชนิดนี้ เช่น กำยาน เป็นต้น

5.5.4 **อัลคาลอยด์ (alkaloids)** เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจน (organic nitrogen compound) มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อน และแตกต่างกันมากมาย ในปัจจุบันพบว่าอัลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) มีฤทธิ์เป็นด่าง ประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะ และลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น พืชสมุนไพรที่มีอัลคาลอยด์ คือ แพงพวยฝรั่ง ลำโพง หมากลำโพง ชิงโคนา ดองดึง ระย่อม ยาสูบ กลอย ฝิ่น และแสลงใจ เป็นต้น

5.5.5 **กลัยโคไซด์ (glycosides)** เป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่เกิดจาก agycone หรือ genin จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glucose part) ละลายน้ำได้ดี โครงสร้างของ agycone มีความแตกต่างกันหลายแบบ สรรพคุณทางเภสัชวิทยาของกลัยโคไซด์มีหลายชนิด ใช้เป็นยาที่มีประโยชน์ และสารพิษที่มีโทษต่อร่างกาย จำแนกตามโครงสร้างของ agyconeได้ ดังนี้

1) คาร์ดิเอ็ก กลัยโคไซด์ (cardiac glycosides) มีฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจ และระบบการไหลเวียนของโลหิต เช่น ใบยี่โถ เป็นต้น

2) แอนทราควิโนน กลัยโคไซด์ (antrawquinone glycosides) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ยาฆ่าเชื้อ และสีย้อมผ้า เช่น ใบมะขามแขก ใบชี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ใบว่านหางจระเข้ เป็นต้น

3) ซาโปนิน กลัยโคไวด์ (saponin glycosides) มีคุณสมบัติเกิดฟอง เมื่อเขย่ากับน้ำ เช่น ลูกประคำดีควาย เป็นต้น

4) ไซยาโนเจนนีติก กลัยโคไซด์ (cyanogenatic glycosides) มีส่วนของ agycone เช่น cyanogenetic Nitrate สารกลุ่มนี้เมื่อถูกย่อยจะได้สารจำพวกไซยาไนด์ เช่น รากมันสำปะหลัง ผักสะตอ ผักหนาม ผักเสี้ยนผี และกระเบาน้ำ เป็นต้น

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

5) ไอโซไทโอไซยาเนท กลัยโคไซด์ (isothiocyanate glycosides) มีส่วนของ agkycone เป็นสารจำพวก isothiocyanate

6) ฟลาโวนอล กลัยโคไซด์ (flavonol glycosides) เป็นสารสีพบในส่วนต่างๆ ของพืช มีสีออกไปทางสีแดง เหลือง ม่วง น้ำเงิน เช่น ดอกอัญชัน เป็นต้น

7) แอลกอฮอลิค กลัยโคไซด์ (alcoholic glycosides) มี alycone ที่เป็นแอลกอฮอล์ เช่น ฟีนอลิค กลัยโคไซด์ (phenolic glycosides) และ แอลดีไฮด์ กลัยโคไซด์ (aldehyde glycosides) เป็นต้น

5.5.6 **แทนนิน** (tannins) เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด ที่มีโมเลกุลใหญ่ และโครงสร้างซับซ้อน มีสถานะเป็นกรดอ่อนรสฝาด มีฤทธิ์ฝาดสมาน แก้อาการท้องเสีย ช่วยรักษาแผล ไฟไหม้ และใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง พบใน เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง ใบ/เปลือกสีเสียด และใบชา เป็นต้น นอกจากสารดังกล่าว ในพืชสมุนไพรยังมีสารประกอบอีกหลายชนิด เช่น ไขมัน สเตียรอยด์ (steroid) เป็นต้น สารเหล่านี้บางชนิด มีสรรพคุณทางยาเช่นกัน

5.5.7 **น้ำมันหอมระเหย** (volatile oil หรือ essential oil) น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่พบมากในพืชเขตร้อน ลักษณะเป็นน้ำมัน มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้ โดยวิธีการกลั่นด้วย ไอน้ำ (stream distillation) หรือการบีบ (expression) ประโยชน์ คือ เป็นตัวแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และสมุนไพรมีประโยชน์ด้าน ขับลม ฆ่าเชื้อโรค พืชสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย คือ กระเทียม ขิง ไพล มะกรูด ตะไคร้ กานพลู และ อบเชย เป็นต้น

สมพร (2526) ได้ให้ความหมายของสารสกัด ว่าหมายถึงสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพรโดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยทั่วไปสารสกัดเป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร มีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า องค์ประกอบสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า สารเจือย โดยชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะแปรเปลี่ยนตามคุณภาพของสมุนไพรที่ใช้ และสภาวะที่ใช้ในการสกัด

ส่วนสุพจน์ (2543) นิยามไว้ว่าสารสกัดสมุนไพร หมายถึง ขั้นตอนการแปรรูปส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ ราก ใบ เปลือก ดอก ผล ลำต้น และ ยาง โดยผ่านกระบวนการการสกัด

5.6 การเลือกตัวทำละลาย (รัตนา, 2547)

การเลือกตัวทำละลาย ในการเตรียมสารสกัดขึ้นกับความสามารถ การละลายขององค์ประกอบสำคัญที่ต้องการ และองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ การเตรียมสารสกัดอาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยว หรือเป็นส่วนผสมของตัวทำละลายต่างๆ โดยทั่วไปควรมีคุณสมบัติ ดังนี้ มีความสามารถในการละลายองค์ประกอบสำคัญมากที่สุด ไม่ละลาย หรือละลายองค์ประกอบอื่นได้น้อย หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย มีความคงตัวดี ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพร ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป และต้องไม่ติดไฟง่าย ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพรมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด และการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ต้องคำนึงถึงความมีขั้วทางเคมีของตัวทำละลายที่ใช้สกัด กับชนิดของสาระสำคัญ ในพืชสมุนไพรที่ต้องการสกัดออกมา ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันทั่วไป โดยเรียงลำดับจากสารที่มีขั้วน้อยไปยังสารที่มีขั้วมากตัวทำละลายที่นิยมใช้ทางเภสัชกรรม ได้แก่ hexane, cyclohexane, acetone, ethanol, methanol และน้ำ เป็นต้น

5.6.1 **น้ำ** มีคุณสมบัติเป็นของเหลว ที่มีความสามารถในการรวมตัวกันได้สูง ทำให้มีจุดเดือดที่สูงด้วย น้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีของเกลืออนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์หลายชนิดสามารถรวมตัวกับแอลกอฮอล์หรือกลีเซอรีนได้ ข้อเสียของการใช้น้ำ ไม่ได้ละลายเฉพาะตัวยาสำคัญเท่านั้น แต่สามารถละลายสารอื่นในสมุนไพรออกมาด้วย หากใช้น้ำเพียงอย่างเดียวในการสกัดจะทำให้เชื้อแบคทีเรีย รา เจริญขึ้นได้ และเกิดความไม่คงตัวของยา

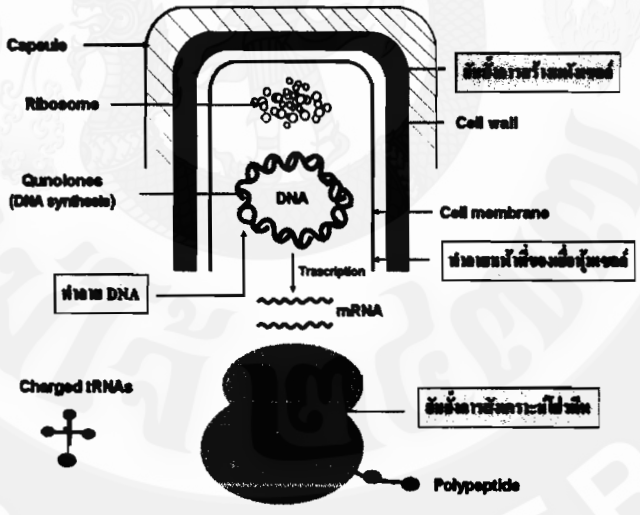
5.6.2 **แอลกอฮอล์** เป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าน้ำ คือ ยาที่เตรียมจะไม่เกิดการสลายตัว เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จึงเก็บไว้ได้นานกว่าและแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20–25 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ ในยาที่เตรียมด้วยแอลกอฮอล์สามารถละลาย พวกเรซิน น้ำมันหอมระเหย อัลคาลอยด์ และกลัยโคไซด์ ซึ่งเป็นสาระสำคัญในพืชชนิดต่างๆ ได้

5.6.3 **น้ำผสมแอลกอฮอล์** เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้อย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพร ได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่มีราคาถูกกว่า และสามารถป้องกันการบูดเสียของสารสกัดได้ นอกจากนี้ช่วยป้องกันการแยกตัวขององค์ประกอบในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้

5.6.4 **hexane และ** cyclohexane เป็นน้ำยาสกัดที่เหมาะสำหรับสกัดสารที่ไม่มีขั้ว และกำจัดไขมันจากสมุนไพร ข้อดี คือ ราคาถูกคลอโรฟอร์ม เป็นน้ำยาสกัดที่ดี แต่มี selectivity น้อย เกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สกัดสารที่เป็นด่างแก่อาจจะสลายให้กรดเกลือ

5.6.5 **อีเทอร์** มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี selectivity ดีกว่า ข้อเสีย คือ ระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิด oxidized ได้ง่าย และดูดน้ำได้มาก

สารสกัดสมุนไพรมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่างกัน เนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมีกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียต่างกัน เช่น สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค การสร้างผนังเซลล์ หรือรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มพลาสม่า เป็นต้น (ยอดยิ่ง, 2540)



ภาพที่ 7 กลไกการทำลายหรือยับยั้งการทำงานเซลล์แบคทีเรียโดยสารสกัดสมุนไพร
ที่มา: ดัดแปลงจาก สุวณีและมาลัย (2536) และยอดยิ่ง (2540)

6. สมุนไพรในสัตว์น้ำ

เนื่องจากสมุนไพรในธรรมชาติ มีความหลากหลายของชนิด และแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน ทำให้มีสรรพคุณรักษาโรค และสารออกฤทธิ์ต่างกันด้วย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาให้ดีถึงฤทธิ์สมุนไพรในแต่ละชนิด และต้องคำนึงถึงเรื่องความเป็นพิษของสมุนไพรในแต่ละชนิด เพื่อให้ประสิทธิภาพการใช้พืชสมุนไพรได้ผลดี ยับยั้งเชื้อโรคในกุ้งได้อย่างปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ และผู้บริโภค

6.1 หลักการใช้สมุนไพรกับสัตว์น้ำ มีดังนี้

6.1.1 ใช้ตรงเป้าหมายและวัตถุประสงค์

6.1.2 การตั้งสูตรสมุนไพรที่ชัดเจนต้องมีข้อมูลวิชาการรับรอง

6.1.3 วัตถุดิบสมุนไพรต้องมีคุณภาพ

6.1.4 ใช้อย่างถูกต้อง

6.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไมตรีและคณะ (2536) รายงานว่า จากสรรพคุณยาไทยแผนโบราณที่ใช้ใบพญายอในการรักษาโรคเริม จึงได้สกัดใบพญายอด้วยเอทานอลและนำไปศึกษาคุณสมบัติการทำลายเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลือง (YBV) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบพญายอมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส (YBV) และสารนี้มีผลต่อกุ้งกุลาดำน้อยมาก และมีผลกระตุ้นให้กระบวนการกำจัดสิ่งแวดล้อม phagocytosis ในกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นด้วย

วินิตย์ (2539) รายงานว่า การใช้สมุนไพรรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในปลาดุกบิ๊กอุยโดยวิธีการแช่แบ่งการปฏิบัติการออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกการทดสอบสารสกัดสมุนไพรกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยทำการเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเลี้ยง แล้วนำน้ำสกัดสมุนไพรมาหยอดในปริมาณ 10 20 40 50 60 ul พบว่าสารสกัดจาก กระเทียม กานพลู กระเจี๊ยบ มังคุด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Aeromonas hydrophila* เกิดเป็น clear zone ขนาดต่างๆกัน ขั้นตอนที่ 2 การใช้สมุนไพรรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในปลาดุกบิ๊กอุยโดยวิธีการแช่การปฏิบัติการโดยฉีดเชื้อ *A. hydrophila* 10^7 cell/ml เข้าในกล้ามเนื้อปลา 0.1 ml นำมาเลี้ยงในตู้กระจกตู้ละ 10 ตัว จนปลาแสดงอาการ แล้วทำการรักษาด้วยสารสกัดสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ กระเทียมและกานพลู โดยใช้สารสกัดในปริมาณ 0.25%, 0.5%, 1% และ 3 % ของน้ำ ทำการรักษา

10 วัน ผลปรากฏว่า ปลาที่รักษาด้วยกานพลู 0.25% มีอัตรารอด 60 %, 0.5% มีอัตรารอด 70%, 1 % มีอัตรารอด 30%, 3% มีอัตรารอด 10 % ปลาที่รักษาด้วยกระเทียม 0.25% มีอัตรารอด 50 %

สถาพรและคณะ (2539ก) รายงานว่า การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง ต่อเชื้อวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค จำนวน 23 สายพันธุ์ คือ *Vibrio harveyi* 9 สายพันธุ์, *V. minicus* 1 สายพันธุ์, *V. alginolyticus* 1 สายพันธุ์, *V. parahaemolyticus* 2 สายพันธุ์, *V. vulificus* 1 สายพันธุ์, *V. fluvaris* 1 สายพันธุ์, *V. chorelae* 1 สายพันธุ์ และ *V. splendidus* 7 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย 21 สายพันธุ์ จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อ *V. splendidus* 1 สายพันธุ์ และ *V. minicus* 1 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ แต่พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ทุกสายพันธุ์

สถาพรและคณะ (2539ข) การทดสอบฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 9 ชนิด คือ กะเพรา กะเม็ง ขุมเห็ดเทศ ขิงข้าชาลี บอระเพ็ด มะยม มะขามป้อม ฟ้าทะลายโจร และสารภีทะเล โดยผสมสารสกัดสมุนไพรในอัตรา 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับไวรัส YBV ที่เจือจาง 1:10,000 เท่า โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ ขนาด 15-20 g แล้วเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด คือ กะเพรา ขุมเห็ดเทศ บอระเพ็ด มะยม และสารภีทะเล ที่ฉีดเข้าไปในกุ้งกุลาดำสามารถยับยั้งไวรัส YHV ได้ โดยกุ้งมีอัตรารอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนขิงข้าชาลีให้ผลในการยับยั้งเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนกุ้งที่ทดสอบ และปริมาณต่ำสุดของสารสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่สามารถยับยั้งไวรัส YHV คือ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้ มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 ระดับต่ำที่สุด หากใช้ความเข้มข้นในปริมาณนี้ ทำให้ลูกกุ้งตาย 50 % ภายใน 24 ชั่วโมง ต้องใช้สารสกัดในปริมาณสูง 1,987-3,548 ppm

สถาพรและคณะ (2539ค) รายงานว่า ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร 16 ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล Vibrio 10 สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ คือ กระเพราแดง กระเพราขาว ขุมเห็ดเทศ ขิงข้าชาลี กะเม็ง บอระเพ็ด ฝรั่ง พญายอ ฟ้าทลายโจร มะระขี้นก ก้างปลาเครือ ธรณีสาร มะยม ลูกใต้ใบ 3 ชนิด การทดสอบทำโดยการเจือจางสารสกัดลงบนอาหารลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Tragen (1983) และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ผลการทดสอบพบว่ามีสมุนไพร 11 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แตกต่างกัน ตามความเข้มที่ไม่เท่ากันสมุนไพรที่น่าสนใจมีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง และ มะระขี้นก เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อได้แม้จะใช้สารสกัดในระดับ

ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.625 มก/มล และ 1.25 มก/มล ตามลำดับ ข้อแตกต่างของประสิทธิภาพสมุนไพรทั้งสองคือ ใบฝรั่ง สามารถยับยั้งเชื้อได้ด้วยความเข้มข้นต่ำกว่ามะระขี้นก (0.625 mg/ml) ในขณะที่มะระขี้นกยับยั้งเชื้อได้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันดังนั้นจึงการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อต่อไป

เต็มดวง (2540) รายงานว่า การทดสอบสารสกัดฟ้าทลายโจร 3 % ต่อการฆ่าเชื้อ *Vibrio* spp. ซึ่งแยกได้จากกุ้งป่วย จำนวน 30 สายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อ *Vibrio* spp. ตายมีค่าประมาณ 16 ppm ส่วนค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกกุ้ง PL20 ตายครึ่งหนึ่ง ภายในเวลา 96 ชั่วโมง โดยวิธีแช่มีค่าประมาณ 688 ppm ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดดังกล่าวมรความเป็นพิษต่อกุ้งต่ำมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดนี้มาใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำ ส่วนการนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ควรจะมีการศึกษาความเป็นพิษที่กุ้งได้รับโดยการกินสารสกัดนี้ก่อน

สถาพรและคณะ (2540ข) ได้ศึกษาฤทธิ์การทำลายเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 8 ชนิด คือ พญายอ ฝรั่ง ก้างปลาเครือ มะยมธรณีสาร ลูกใต้ใบ 2 ชนิด ได้แก่ *Phyllanthus amarus, P. debelis* และหญ้าใต้ใบ โดยผสมสารสกัดสมุนไพรในอัตรา 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับไวรัส SEMBV ที่เจือจาง 1:1,000 เท่า จากนั้นนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำแล้วเลี้ยงต่อไป เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสมุนไพรทุกชนิดให้ผลในการยับยั้งเชื้อไวรัส SEMBV และหญ้าใต้ใบ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส SEMBV ได้ดีที่สุด มีอัตรารอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งที่ฉีดด้วยสมุนไพรชนิดอื่น มีอัตราการรอดตาย 58–85 เปอร์เซ็นต์

สถาพร (2540ก) รายงานว่า สมุนไพรกับการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องประสบปัญหาหลายด้าน โดยเฉพาะปัญหาการเกิดโรค ทำให้มีการนำยา และสารเคมีหลายชนิดเข้ามาใช้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งยาและสารเคมีบางชนิดอาจมีผลตกค้างมาสู่คนผู้บริโภคกุ้ง นอกจากนี้ยังมีผลต่อสิ่งแวดล้อมอีกมากโดยที่เรานึกไม่ถึง การใช้สมุนไพรนับเป็นทางออกที่ดี เนื่องจากเป็นพืชธรรมชาติที่ใช้เป็นยารักษาโรคในคนมาแต่โบราณ จึงมีความปลอดภัยสูง ในการนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อแก้ปัญหาโรคในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ยังสามารถลดการขาดดุลการค้าของประเทศได้ เพราะสมุนไพรเป็นพืชที่มีอยู่แล้วในประเทศ ไม่จำเป็นต้องเสียเงินเพื่อสั่งซื้อยาและสารเคมีจากต่างชาติ ด้วยเหตุนี้หลายประเทศในทวีปเอเชียจึงอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสมุนไพรที่มีคุณค่ามหาศาล จึงได้มีการทดลองและพัฒนาการใช้สมุนไพรสัตว์น้ำ สำหรับประเทศไทย สมุนไพรที่เราทำการศึกษาเพื่อนำมาใช้ในกุ้งกุลาดำ สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส เช่น พญายอ ลูกใต้ใบ หญ้าใต้ใบ ก้างปลาเครือ มะยม ธรณีสาร ฝรั่ง กะเพรา บอระเพ็ด

2. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น ใบฝรั่ง มะระขี้นก

สมุนไพรเป็นทรัพยากรในประเทศ ซึ่งคนไทยนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อรักษาโรคต่างๆ มาแต่โบราณกาล แม้แต่ปัจจุบันยังได้รับความนิยมใช้กันอยู่ โดยเฉพาะชนบทที่ห่างไกล ซึ่งการบริการด้านสาธารณะสุขยังเข้าไปไม่ทั่วถึง หรือยังไม่เป็นที่เพียงพอ สมุนไพรบางชนิดได้มีการทดสอบสรรพคุณและความปลอดภัยแล้วว่า มีคุณค่าในการรักษาโรคจริง

อนันตภัทร (2541) จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำสกัดหยาบสมุนไพรสองชนิด คือ กระเทียม และ กานพลู ต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก ทดสอบการยับยั้งพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสมุนไพรทั้งสองที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ A. *hydrophila* โดยMIC ของน้ำสกัดหยาบกระเทียมที่ 2.4 % และของน้ำสกัดหยาบกานพลู 3.125 % ขั้นตอนที่ 2 ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำสกัดสมุนไพรกับลูกปลาดุกบิ๊กอุยที่ความเข้มข้น MICx100, MICx10, MIC และ MIC/10 พบว่าน้ำสกัดหยาบกระเทียมที่ MICx100, MICx10 มีความเป็นพิษสูงคือลูกปลาตายหมดภายใน 30 นาที และที่ MIC และ MIC/10 ลูกปลามีอัตรารอดที่ 52.22 % และ 80 % ตามลำดับ และน้ำสกัดหยาบกานพลูมีความเป็นสูงทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นที่ MIC/10 คือลูกปลามีอัตรารอดเฉลี่ย 57.78% เมื่อทำการแช่เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 3 ทำการทดลองรักษาปลาดุกบิ๊กอุยที่ติดเชื้อ A. *hydrophila* โดยวิธีแช่ด้วยสกัดหยาบของสมุนไพรตามระดับความเข้มข้นที่ MICx2, MIC, MIC/2 และ MIC/4 พบว่าน้ำสกัดหยาบกานพลูในทุกระดับความเข้มข้น มีความเป็นพิษสูงคือทำให้ปลาตายหมดภายใน 30 นาที ส่วนน้ำสกัดหยาบกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นที่ MIC/2 และ MIC/4 มีความเป็นพิษทำให้ปลาตายภายใน 3 และ 4 วันตามลำดับ

นิภาพร (2541) รายงานว่า จากการศึกษาระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำสกัดหยาบสมุนไพร 2 ชนิด คือ มังคุด และกระเจี๊ยบ ที่สามารถยับยั้งและรักษาการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยโดยเลี้ยงในห้องทดลอง พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำสุดของสมุนไพรทั้งสองที่สามารถยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* โดยให้ผล clear zone ขนาด 8 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำสกัดหยาบมังคุดที่ 2.50 % และน้ำสกัดหยาบกระเจี๊ยบ ที่ 3.13 % ขั้นตอนที่ 2 ทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำสกัดสมุนไพรกับลูกปลาดุกบิ๊กอุย ที่ระดับความเข้มข้น MICx100, MICx10, MIC และMIC/10 พบว่าน้ำสกัดหยาบมังคุดที่ MICx100 มีความเป็นพิษสูง

ลูกปลาทยอยตายหมดภายใน 10 นาที MICx10 ปลาตายหมดในชั่วโมงที่ 2 และ MIC ลูกปลาทยอยตายหมดภายในชั่วโมงที่ 12 และ MIC/10 ลูกปลามีอัตราการรอดตาย 87.78 % สำหรับน้ำสกัดหยาบกระเจี๊ยบมีความเป็นพิษสูงที่ MICx100 ลูกปลาตายหมดภายใน 1 นาที ส่วน MICx10 ลูกปลาตายหมดภายในชั่วโมงที่ 2 ส่วน MIC และ MIC/10 มีอัตรารอด 6.67 และ 86.67 % ตามลำดับ เมื่อทำการแช่เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 3 ทำการทดลองรักษาปลาดุกบิ๊กอุยที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีการแช่ด้วยน้ำสกัดหยาบสมุนไพรตามระดับความเข้มข้น MICx2, MIC, MIC/2 พบว่าน้ำสกัดหยาบมังคุดในทุกระดับความเข้มข้น มีความเป็นพิษสูง คือ ทำให้ปลาตายหมดภายใน 1 วัน ส่วนน้ำสกัดหยาบกระเจี๊ยบ ที่ระดับความเข้มข้น MICx2, MIC มีความเป็นพิษสูงเช่นเดียวกับมังคุด และที่ระดับความเข้มข้น MIC/2 มีความเป็นพิษที่ทำให้ปลาตายหมดภายใน 5 วัน

สถาพรและคณะ (2541) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของใบฝรั่ง และยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 5 ซ้ำ ดังนี้ ชุดควบคุมใช้น้ำเกลือ 2.6 % สารสกัดจากใบฝรั่งระดับความเข้มข้น 10 และ 1 mg/ml และออกซีเตตราซัยคลินเข้มข้น 10 mg/ml โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้งตัวละ 0.2 ml และฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* ความเข้มข้น $1.4x10^{10}$ cfu/ml เข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.2 ml หลังจากนั้น 30 นาที ทำการเจาะเลือดกุ้งที่บริเวณโคนขาคู่ที่ 3 แล้ว นำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียในเลือดกุ้งโดยวิธีการกระจายเชื้อ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียเรืองแสงในน้ำเลือดกุ้งจะลดลงอย่างรวดเร็ว และประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสงของกุ้งกุลาดำที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งจะดีกว่าในกลุ่มที่ได้รับออกซีเตตร้าซัยคลิน สัดส่วนการลดลงของแบคทีเรียเมื่อเทียบกับชุดควบคุมของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 10 และ 1 mg/ml มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 68.05 และ 62.99 % ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาออกซีเตตร้าซัยคลิน มีค่าเพียง 51.4 %

ชลิดาและคณะ (2542) รายงานว่า ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวยต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ พบว่าการให้กุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 14.60 g ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ที่ระดับความเข้มข้น 2,500 และ 5,000 mg/l วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งโดยให้ค่า phenoloxidase activity ในน้ำเลือดเพิ่มมากกว่าในกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ที่ระดับ 1,000 และ 0 mg/l อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.01$) และไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำ โดยพิจารณาจากสัดส่วนการรอดตายของกุ้งกุลาดำหลังได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบจากใบมะม่วงเขียวเสวย ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p> 0.05$)

กิติพันธ์ (2543) รายงานว่า การแช่รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในกบนาโดยใช้สารสกัดพิลังกาสา ฝรั่ง ขงโค สะเดา และโหระพาด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วนของสมุนไพร/น้ำกลั่นดังนี้ 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:40 พบว่าน้ำสกัดพิลังกาสา ขงโค และสะเดาไม่สามารถใช้รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสได้ อาจเนื่องจาความเป็นพิษของสมุนไพรสูง ลักษณะภายนอกของกบนาที่ตายคือ มีการขับเมือกมามาก และลำตัวเปื่อยชัดเจน น้ำสกัดฝรั่งและที่ความเข้มข้น 1:20 และ 1:40 สามารถรักษากบนาให้หายจากอาการติดเชื้อได้ แต่อัตราการรอดต่ำ 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 1:5 และ 1:10 ไม่สามารถรักษาได้ ในขณะที่น้ำสกัดโหระพา ที่ความเข้มข้น1:20 สามารถรักษากบนาให้หายจากอาการติดเชื้อได้ แต่ที่ความเข้มข้น 1:5 และ 1:10 ไม่สามารถรักษาได้เนื่องจากมีความเป็นพิษสูงต่อกบนา และที่ความเข้มข้น 1:40 ไม่สามารถรักษาได้เช่นกัน เนื่องจากมีความเข้มข้นน้อยเกินไป

คณิต (2543) รายานว่า การใช้สารสกัดน้ำสมุนไพรรักษาโรคติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลาดุกจากจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มังคุด กระเทียม ขิง ขมิ้น ตะไคร้ ใบหูกวาง ยอ ยาสูบ มะลิ ดอกบัว พบว่า สารสกัดจากใบหูกวาง มังคุด ดอกบัว กระเทียม และมะลิ สมมารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ โดยสารสกัดจากใบหูกวางมี clear zone เฉลี่ยเท่ากับ 23, 25 และ 30 mm ที่ปริมาณสารสกัด 20, 30 และ 40 µl ตามลำดับ โดยมีลักษณะของ clear zone เป็นวงกลมสีน้ำตาลอมเขียว ส่วนบริเวณรอบๆ วงกลมมีสีขาวขุ่น สารสกัดจากมังคุดมี clear zone เฉลี่ยเท่ากับ 18, 20, และ 21 mm ที่ปริมาณสารสกัด 20, 30 และ 40 µl ตามลำดับ ลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นเป็นวงกลมสีน้ำตาลอมแดง ส่วนบริเวณรอบๆ เป็นสีขาวอมเหลืองขุ่น สารสกัดจากดอกบัวมี clear zone เฉลี่ย 3.3, 4.3 และ 6 mm ที่ปริมาณสารสกัด 20, 30 และ 40 µl ตามลำดับ ลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นเป็นวงกลมเล็กๆ มีสีขาวใสๆ บริเวณรอบๆ จะเป็นสีขาวขุ่น สารสกัดจากกระเทียม มี clear zone เฉลี่ยเท่ากับ +1.3 และ +2 มิลลิเมตร ที่ปริมาณสารสกัด 30 และ 40 µl ตามลำดับ ลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นเป็นวงเล็กๆ สีเหลือง อ่อนใส รอบๆ จะเป็นสีขาวขุ่น สารสกัดจากมะลิมี clear zone เฉลี่ยเท่ากับ +1 และ 1.6 มิลลิเมตรที่ปริมาณสารสกัด 30 และ 40 µl ตามลำดับ ลักษณะของ clear zone ที่เกิดขึ้นเป็นวงกลมเล็กๆ สีเหลือง อ่อนใส รอบๆ จะเป็นสีขาวขุ่น และผลจากการนำสารสกัดของสารสมถนไพร 2 ชนิด ได้แก่ ใบหูกวางและมังคุด ไปทดสอบกับปลาดุกบิ๊กอุยที่มีการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยการฉีดเป็นเวลา 7 วันพบว่า การใช้สารสกัดจากใบหูกวาง 500 g ต่อน้ำ 5 l ปลาดุกบิ๊กอุย มีอัตราการรอด 40 % ส่วนการใช้สารสกัดจากมังคุด 500 g ต่อน้ำ 5 l ปลาดุกบิ๊กอุย มีอัตรารอด 20 % ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการรักษาด้วยสารสกัดจากสารสมุนไพร ปลาดุกบิ๊กอุยตายหมด

ลิลาและคณะ (2543) รายงานว่า ทดลองใช้สารสกัดพญายอป้องกันโรคหัวเหลือง ซึ่งเกิดจากเชื้อ YHV (Yellow Head Baculovirus) และโรคจุดขาวซึ่งเกิดจากเชื้อ SEMBV (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus) ในกุ้งกุลาดำ พบว่าพญายอมีประสิทธิภาพทำลายเชื้อ YHV ได้เฉลี่ย 100, 78.3, 78.3, 66.7, 63.3 และ 50 % และทำลายเชื้อ SEMBV ได้เฉลี่ย 80, 75, 63.7, 60.0, 53.3 และ 50 % ตามลำดับ จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7 หลังจากเติมเชื้อลงในสารละลายพญายอเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำทะเลความเค็มตั้งแต่ 10–30 ppt อัตราที่เหมาะสมในการใช้พญายอผสมอาหารให้กุ้งกินที่ 0.1 g ต่อ อาหาร 1 kg ซึ่งมีประสิทธิภาพในการคุ้มกัน SEMV ได้สูงสุดที่ 33.36 % และ YHV ที่ 36.36 % หลังจากกุ้งได้รับพญายอที่ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 14 และ 28 วัน ตามลำดับ เมื่อทดลองใช้พญายอในอัตราที่สูงกว่า 10 เท่าของปริมาณที่กำหนดข้างต้น ไม่พบว่ามีเกิดผลข้างเคียงต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันและสุขภาพกุ้ง ในแง่ของชนิดและปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ เลือด และตับ/ตับอ่อน ตลอดจนพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในทางเดินอาหารของกุ้ง ดังนั้น การวิจัยการใช้ประโยชน์ของพญายอเพื่อควบคุมการระบาดของโรคไวรัส โดยเริ่มใช้ป้องกันการติดเชื้อโรคในพ่อแม่พันธุ์ และในระยะลูกกุ้งวัยรุ่นก่อนปล่อยเลี้ยงในบ่อ ซึ่งทำให้สามารถลดอัตราการสูญเสียผลผลิตกุ้ง จากการติดเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภัสสร และคณะ (2543) รายงานว่า ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดลูกใต้ใบ *Phyllanthus amarus* Linn. ต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ โดยทำการทดลองให้กินและฉีดสารสกัดลูกใต้ใบเข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ของกุ้งกุลาดำ การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด ตามความเข้มข้น คือ 0, 0.1 และ 1 mg/ml หลังจากฉีด 1 และ 6 ชั่วโมง ทำการดูดน้ำเลือดกุ้ง (hemolymph) เพื่อนำมาหาค่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธีของกัลยาณ์ (2538) เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance พบว่าค่าในการต้านแบคทีเรียของสารที่ผลิตในตัวกุ้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเปอร์เซ็นต์การต้านแบคทีเรียที่เกิดขึ้น ในทุกชุดการทดลองแสดงว่าสารสกัดลูกใต้ใบที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ไม่มีผลไปขัดขวางการทำงานของสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งมีอยู่ตามธรรมชาติในเลือดของกุ้งกุลาดำ

ศราวุธ (2543) รายงานว่า ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพิลังกาสา ฝรั่ง ขงโค สะเดา และโหระพาด้วนน้ำกลั่นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* อัตราส่วนที่ใช้สมุนไพร/น้ำกลั่น ดังนี้ 1:5, 1:10, 1:20 และ 1:40 พบว่าน้ำสกัดฝรั่ง มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด รองลงมา คือ พิลังกาสา ขงโค สะเดา และ โหระพา มีบริเวณ inhibition zone ขนาดเท่ากับ 20.85, 17.71,

16.28,14.57, 20.28, 18.28, 14.00, 14.57, 15.57, 13.28, 11.71, 10.7, 13.00, 10.85, 10.57, 9.57, 11.71, 10.85, 10.57 และ 10.57 mm ตามลำดับ

Gislene (2000) รายงานว่าการศึกษาสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา คือ กานพลู โหรพา ฝรั่ง ทับทิม ผกากรอง ลูกหว้า ส่วนสารเคมีที่ เช่น lenzoic acid, cinnamic acid, eugenol and ดarnesol สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพยับยั้งดีที่สุด คือ กานพลู และลูกหว้า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 64.2% และ 57.1% ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งได้ถึง 83.3% และพบว่า กานพลู ให้ผลยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* มีค่า MIC อยู่ที่ 50 mg/ml และ มีการศึกษาสมุนไพรชนิด A. *aroma* 163 สายพันธุ์ ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (M.E. Arias,2003)

กิติวรรณ (2545) รายงานว่า ทดลองใช้กระเทียมและใบหูกวางกำจัดเห็บระฆังในลูกปลานิลโดยวิธีการแช่ พบว่าหลังจากแช่สารละลายกระเทียมและใบหูกวาง ที่ความเข้มข้น 800 mg/ml เป็นเวลา 2 วัน สามารถกำจัดเห็บระฆังในลูกปลานิลได้หมด แต่เมื่อเวลาผ่านไปพบการระบาดของเห็บระฆังได้อีก

จารุณี (2545)กล่าวว่า โรคติดเชื้อในปลาดุก ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* การรักษาโรคที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่การใช้สารเคมีและยาต้านจุลชีพซึ่งมีข้อเสียคือ อาจก่อให้เกิดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมและสัตว์น้ำส่งผลให้เป็นอันตรายกับผู้บริโภค นอกจากนี้การใช้ยาผิดขนาดอาจก่อให้เปิดการดื้อยาได้ การป้องกันไม่ให้ปลาเป็นโรคน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับเกษตรกร การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น ส่วนย่อยดังนี้ ส่วนที่ 1 การทดสอบความสามารถของสารละลายสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในห้องปฏิบัติการเพื่อคัดเลือกสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดมา 1 ชนิด ผลการทดสอบพบว่ากระเทียมมีความสมมารถในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด โยมีความกว้างเฉลี่ยของบริเวณใสเท่ากับ 1.03±0.12 ซ.ม. การทดลองในส่วนที่ 2 เป็นการใช้ยาปฏิชีวนะและกระเทียมในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของปลาดุกโดยวิธีผสมอาหาร พบว่ากลุ่ม ปลาดุกที่ให้อาหารผสม ยาปฏิชีวนะ มีอัตรารอดเท่ากับ 80±1.56 รองลงมาคือ กลุ่มประหลาดุกที่ให้อาหารผสมกระเทียมมีอัตรารอดเท่ากับ 58.33±2.59 และกลุ่มควบคุมมีอัตรารอดเท่ากับ 51±2.90 เมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ากลุ่มประหลาดุกที่ให้อาหารผสมกระเทียมและปลาในกลุ่มควบคุมมีอัตรารอดไม่แตกต่างกัน (P>0.5) แสดงว่าระเทียมไม่สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับประหลาดุกได้มากนัก จึงควรมีการศึกษาในส่วนของปริมาณและระยะเวลาการใช้กระเทียมในการผสมอาหารต่อไป

อังคณา (2545) ได้นำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาสกัดด้วยกระบวนการทางเคมี นำส่วนสกัดที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาและป้องกันโรคหัวเหลืองในห้องทดลอง ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพรพญายอ สามารถนำมาสกัดเป็นสารสกัดที่ใช้ป้องกันเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลา ดำได้เป็นอย่างดี ปริมาณของสารสกัดที่ใช้ก็น้อยมาก ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายไวรัสได้มีค่าเพียง 1 ppm แต่สามารถออกฤทธิ์ได้ดี น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งมาวิเคราะห์คุณภาพก่อนทดลองและหลังการทดลองก็ไม่พบความแตกต่างกัน เมื่อทดสอบความปลอดภัยของสารสกัดพญายอต่อกุ้งกุลาดำก็มีความปลอดภัยสูง

อังคณา (2546ก) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัส YHV ที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำของสารสกัดจากสมุนไพรไทย 9 ชนิด คือ กะเพรา (*Ocimum sanctum*), กะเม็ง (*Eclipta alba*), ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*), ชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia*), บอระเพ็ด (*T.crispa*), มะยม (*Phyllanthus acidus*), มะขามป้อม (*P. emblica*), ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และสารภีทะเล (*Calophyllum inphyllum*) โดยผสมสารสกัดสมุนไพรในอัตรา 10 มก/มล กับไวรัส YBV ที่เจือจาง 1 : 10,000 เท่า โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำขนาด 15-20 กรัม แล้วเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด คือ กะเพรา, ชุมเห็ดเทศ, บอระเพ็ด, มะยมและสารภีทะเลที่ฉีดเข้าไปในกุ้งกุลาดำสามารถยับยั้งไวรัส YHV ได้ โดยกุ้งมีอัตรารอดตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิงช้าชาลีให้ผลในการยับยั้งเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนกุ้งที่ทดสอบ และปริมาณต่ำสุดของสารสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดที่สามารถยับยั้งไวรัส YHV คือ 1 มก/มล ในขณะที่สมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 น้อยที่สุด หากใช้ในปริมาณนี้ ความเข้มข้นที่ทำให้ลูกกุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง ต้องใช้สารสกัดในปริมาณสูงถึง 1,987-3,548 ส่วนในล้าน

อังคณา (2546ข) ได้ศึกษาการทดสอบฤทธิ์สมุนไพรโดยใช้วิธีแยกสายพันธุ์เชื้อวิบริโอจากตัวกุ้ง ที่เป็นโรคในเขตจังหวัดจันทบุรีและสงขลา สาเหตุที่เลือกทดสอบเชื้อชนิดนี้เพราะวิบริโอเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในตัวกุ้ง โดยใช้สมุนไพรทดสอบเชื้อ 10 สายพันธุ์ ใช้สารสกัดจากกระเพรา ชุมเห็ดเทศ กะเม็ง ฝรั่ง พญายอ ฟ้าทลายโจร มะระขี้นก พบว่าสารสกัดจากกระเพราไม่ออกฤทธิ์เลย ชุมเห็ดเทศได้ 10 % ขณะที่กระเม็ง ฝรั่ง พญายอ ฟ้าทลายโจร มะระขี้นกได้ 80 – 100% ทำการหาค่าMIC (ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย) พบว่ากะเม็งและมะระขี้นก มีค่า 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฝรั่ง มีค่า 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าฝรั่งให้ผลดีและใช้ปริมาณน้อย นอกจากนี้พบว่ากลุ่มก้างปลาเครือ ว่าน

ธรณีสาร มะยม ลูกใต้ใบ ขิงข้าขาลีและบอระเพ็ด ให้ผลดีด้วยการทดลองนี้ทำภายใต้ห้องปฏิบัติการ ใช้ทดสอบเชื้อวิบริโอโดยตรง

พรชัย (2546) รายงานว่า สารสกัด cavacrol และ thymol มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอและรักษาโรคขี้ขาวในกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีฤทธิ์การทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคทำให้เซลล์แตกและตายในที่สุด

วิกันตา (2546) กล่าวว่า สารสกัดยัคค่า (*Yucca schidlgera*) สามารถแก้ปัญหาลดแอมเนียในบ่อกุ้งได้ โดยนำสารสกัดยัคค่าที่ความเข้มข้น 5, 2, 5, 2 และ 2 ppm พร้อมเสริมสปอร์จุลินทรีย์บาซิลลัส ทดสอบการลดปริมาณแอมโมเนีย โดยนำน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง ทำการวัดค่าแอมโมเนียได้ 1.3 ppm พบว่าสามารถลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำได้ ภายใน 30-60 นาที

Abutbul et al. (2004) ใช้สารสกัดโรสแมรี่ด้วยสารละลายเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เมธานอล เอทธิล อะซีติก และเมธานอลผสมกับเอทธิล อะซีเต (1:1) ใช้อัตราส่วนสมุนไพร 1 กรัม/สารละลาย 10 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *Streptococcus iniae* ในปลานิล น้ำหนัก 7.5±1 กรัม โดยวิธี disc diffusion assay พบว่าสารสกัดโรสแมรี่ด้วยเอทธิล อะซีเต มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. iniae* สูงที่สุด รองลงมา คือ เมธานอลผสมกับเอทธิล อะซีเต (1:1) และเมธานอล มีขนาด inhibition zone เท่ากับ 37.50, 23.81 และ 17.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Arias et al. (2004) กล่าวว่า สารสกัดใบและดอกส้มป่อยด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ agar และ broth dilution method พบว่าสารสกัดใบของส้มป่อย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marscences*, *Morganella morgannii*, *Acinetobacter baumanni*, *Pseudomonas aeruginsa* และ *Stenotrophomnas maltophilia* มีค่า MIC เท่ากับ 246, 250, 175, 233, 250, 250, 125, 250 และ 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MBC เท่ากับ 425, 500, 175, 383, 250, 125, 250, 125และ 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดดอกของส้มป่อย พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 214, 235, 216, 233, 250, 250, 250, 250 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าMBC เท่ากับ 750, 1500, 241, 572, 1000, 500, 250, 289 และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Immanuel et al (2004) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพร และพืชหัวที่สกัดด้วยเบนธานอลที่มีผลต่อการเจริญเติบโตอัตรารอดตาย และต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ในกุ้งแชบ๊วย ระยะ juvenile โดยใช้สมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เมล็ดละหุ่ง ลูกใต้ใบ เลียคัส มันสำปะหลัง สาหร่ายทะเลกลุ่ม *Ulva* และสาหร่ายทะเลกลุ่ม *Sargassum* โดยใช้วิธี disc method จากนั้น ฉีดเชื้อ *V. Parahaemolyticus* เข้ากล้ามเนื้อ ปริมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีอัตรารอด 43.32–58.88 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเจริญเติบโต 1.46-2.15 เปอร์เซ็นต์ พบปริมาณเชื้อที่พบน้อยที่สุดในกล้ามเนื้อ $1.36–2.03x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม และในเนื้อเยื่อตับ $1.47–2.16x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิกรัม พบว่าสารสกัดเมล็ดละหุ่งให้ผลดีที่สุด

Sivaram et al. (2004) ได้ศึกษาสมุนไพร 10 ชนิด ที่สกัดด้วยเมธานอล ได้แก่ สะเดาไทย ใบลูกจันทร์ ใบฟ้าทะลายโจร ใบพริกไทย ใบเดียเมีย ใบมะเขือเทศ ใบบอระเพ็ด หัวมันฝรั่ง ลูกสมอพิเภก และลูกกระวาน โดยวิธี disc diffusion test ใช้คัดเลือกชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ในปลากะรังระยะ juvenile ซึ่งเกี่ยวข้องกับเรื่องระบบภูมิคุ้มกันและการเจริญเติบโต พบว่าสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ เม็ดพริกไทย หัวมันฝรั่ง และลูกกระวาน สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี สารสกัดที่สกัดด้วยเมธานอลจะถูกระเหยออกด้วย silica column ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 100, 200, 300, 400 และ 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักเฉลี่ยของปลาประมาณ 30.0±0.5 กรัม อายุ 12 สัปดาห์ ขนาด Inhibition zone ดังนี้ พริกไทย (29.4±0.5 มิลลิเมตร) ฝรั่ง (24.3±0.1 มิลลิเมตร) และกระวาน (21.4±0.9 มิลลิเมตร)

เพ็ญศรีและคณะ (2549) ทดลองนำใบฝรั่ง 3 แบบ คือ ใบฝรั่งสด ใบฝรั่งตากแห้ง และใบฝรั่งตากแห้งเก็บไว้นาน 1 เดือน โดยนำมาต้ม ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งป่วย 7 ชนิด คือ *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*,*V. alginolyticus*, *V. pelagiusll*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* และ *V. mimicus* โดยวิธี Agar dilution พบว่า ใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. damsela*, *V. alginolyticus* และ *V. pelagiusll* มีค่า MIC เท่ากับ 0.078 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ *V. vulnificus* และ *V. harveyi* มีค่า MIC เท่ากับ 0.156 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วน *V. parahaemolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 0.313 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเชื้อที่ให้ค่าสูงสุด คือ *V. mimicus* เท่ากับ 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดที่ได้จากใบฝรั่งตากแห้งที่เก็บไว้นาน 1 เดือน ให้ค่า MIC สูงกว่า ใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งเพิ่มขึ้นหนึ่งความเข้มข้นในแต่ละเชื้อ พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งที่นำไปต้ม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อวิบริโอที่ก่อโรคในกุ้งได้ภายใต้ห้องปฏิบัติการ ซึ่งความร้อนไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพของสารสกัดสูญเสียไป ดังนั้นใบฝรั่งสดและใบฝรั่งตากแห้งมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อเหมือนกัน ในขณะที่ใบฝรั่งตากแห้งที่เก็บไว้นานๆ ประสิทธิภาพจะเสื่อมลง

Germano et al. (2005) รายงานว่า สารสกัดรากโหระพาด้วยน้ำกลั่น ใช้อัตราส่วน 100 กรัม/ 1 ลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* และ *Haemophilus influenzae* มีค่า MIC เท่ากับ 15.60-31.25, 7.80-125.0, 15.60-62.50, 7.8-31.25 และ 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และทดสอบความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย พบว่าค่า LC_{50} 96 h มากกว่า 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย

ประสาทพรและคณะ (ม.ป.ป.) รายงานว่า การศึกษาพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ใบคูน กระเจี๊ยบแดง และผลกล้วยดิบด้วยสารละลายน้ำกลั่น และเมธานอล อัตราส่วนที่ใช้ 1:3 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ 2 ชนิด คือ *A. hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ที่แยกได้จากปลานิลเป็นโรค พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำและเมธานอล และสารสกัดใบคูนด้วยเมธานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* มีค่า MIC เท่ากับ 4.2, 4.7 และ 1.5 และค่า MBC เท่ากับ 8.4, 4.7 และ 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น สารสกัดใบคูนที่สกัดด้วยเมธานอลมีประสิทธิภาพสูงสุด ส่วนเชื้อ *S. agalactiae* มีค่า MIC เท่ากับ 5.35, 4.7 และ 5.8 และ ค่า MBC เท่ากับ 10.7, 4.7 และ 23.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น สารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเมธานอลมีประสิทธิภาพสูงสุด ส่วนสารสกัดผลกล้วยดิบที่สกัดด้วยน้ำกลั่น และเมธานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ต่ำที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 24.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 99.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไม่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ DMST 2798, *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ DMST 15285 และ *V. harveyi* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2. กุ้งทดลอง

ลูกกุ้งก้ามกรามระยะหลังคว่ำได้ จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลำพูน นำมาอนุบาล 21 วัน และเลี้ยงต่อจนได้น้ำหนัก 4-6 g และกุ้งก้ามกรามขนาด 20-30 g จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกราม คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

3. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรที่ต้องการทดสอบล้างให้สะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อให้ง่ายต่อการบด ใส่ถาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C จนแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียด ใช้อัตราส่วนสมุนไพร 5 กรัมต่อตัวทำละลาย 30 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีสกัด 3 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 นำพืชสมุนไพรอย่างหยาบใส่ในขวดแล้ว แช่ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมงจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 4 และกรองต่อด้วย filter membrane ขนาด 0.45 µm

วิธีที่ 2 ทำเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 แต่แช่ด้วยเอธานอล 50 %

วิธีที่ 3 ทำเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 แต่แช่ด้วยเอธานอล 95 %

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้ง (susceptibility test) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้วิธี agar disc diffusion

มีขั้นตอนดังนี้

4.1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยง *A. hydrophila* ในอาหาร NB (Nutrient broth) ส่วน *V. parahaemohyticus* และ *V. harveyi* เลี้ยงใน NB ที่เติม NaCl 1.5 % บ่มเชื้อที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เตรียมไว้นำไปเทียบความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5 ปริมาณ 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.2. นำเชื้อที่เทียบความขุ่นแล้วไป swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar)

4.3. หยดสารสกัดสมุนไพรลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ปริมาตร 25 µl/disc จากนั้นนำไปวางบนจานเพาะเชื้อ TSA ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4. บันทึกผล โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.5. เปรียบเทียบผลจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรทั้งหมด เพื่อคัดเลือกสารสกัดสมุนไพร นำไปทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการกำจัด (efficiency test) เชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้หาค่า MIC/MBC

การทดสอบหาค่า MIC (minimal inhibition concentration) ด้วยวิธี agar dilution และค่า MBC (minimal bactericidal concentration) ทำด้วยวิธี broth dilution และ total plate count มีขั้นตอนดังนี้

5.1. เลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.2. ใส่เชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว 30 µl ในอาหาร NB 1 หลอด ปริมาตร 3 mm หรือ NB ที่เติม NaCl 1.5 % และสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3. สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาเจือจางแบบ 10 fold dilution ด้วยน้ำกลั่น

5.4. ดูดเชื้อที่เจือจางแต่ละหลอด 100 µL เกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.5. ตรวจสอบผลนับจำนวนเชื้อในช่วง 30-300 cfu/plate และบันทึกผล

6. การทดสอบความเป็นพิษ (toxicity test) ของสารสกัดสมุนไพรต่อกุ้งก้ามกราม โดยหาค่า LC_{50} 96 h (Lethal concentration for 50 percent at 96 hours)

6.1. เตรียมกุ้งก้ามกรามระยะหลังคว่ำ 21 วัน ใส่โหลแก้วขนาด 10x10x30 cm^3 ใส่ลูกกุ้งโหลละ 20 ตัว พร้อมติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ ใส่น้ำปริมาตร 1 ลิตร

6.2. ใส่น้ำสกัดหยาบสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ค่า ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทดลอง ที่อุณหภูมิห้อง

6.3. สังเกตและบันทึกผลการรอดตาย การตาย และพฤติกรรมของกุ้ง ทุกชั่วโมงในระยะเวลา 6 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นทำการบันทึกทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

6.4. หาค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 % ที่ 96 ชั่วโมง ทำตามวิธีของ Meesungnoen et al. (2002) ด้วยโปรแกรม Origin 6.0 (MicrocalTM Software, Inc.)

7. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการแช่

7.1. สัตว์ทดลองใช้กุ้งก้ามกรามขนาด 4-6 g จำนวน 10 ตัว มาเลี้ยงในกระบะพลาสติกขนาด 28x32x16 เซนติเมตร ใส่น้ำกระบะละ 10 ลิตร มีการให้ออกซิเจนโดยใช้เครื่องให้อากาศ ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเกล็ด 3 %ของน้ำหนักตัว วันละ 3 เวลา ได้แก่ 08.00 น. 12.00 น. และ 17.00 น.

7.2. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* (AH) ใส่กระบะๆละ 10^8 เซลล์/ลิตร

7.3. สารสกัดสมุนไพร ใช้ความเข้มข้นสำหรับการแช่ ที่ค่า MIC, MBC และ LC_{50} ของแต่ละสารสกัด

7.4. ใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline (OXY AZ) เลขทะเบียนที่ 1D 180/46 ในอัตราส่วน 0.01 ppt ต่อน้ำ 1 ลิตรต่อวัน

7.5. แผนการทดลองแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำๆ ละ 30 ตัว ทำการรักษาเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม = กุ้งปกติ (ไม่ใส่ AH)

ชุดทดลองที่ 2 กลุ่มควบคุม = กุ้ง + AH

ชุดทดลองที่ 3.1 กุ้ง + AH + oxytetracycline 0.01 ppt

3.2 กุ้ง + AH + oxytetracycline 0.01 ppt หลังใส่เชื้อ 6 ชั่วโมง

ชุดทดลองที่ 4.1 กุ้ง + AH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 1

4.2 กุ้ง + AH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 1 หลังใส่เชื้อ 6 ชั่วโมง

ชุดทดลองที่ 5.1 กุ้ง + AH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 2

5.2 กุ้ง + AH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 2 หลังใส่เชื้อ 6 ชั่วโมง

ชุดทดลองที่ 6.1 กุ้ง + AH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 3

6.2 กุ้ง + AH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 3 หลังใส่เชื้อ 6 ชั่วโมง

7.6. บันทึกการรอดตาย และสังเกตอาการของกุ้ง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (total plate count)

8. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการกิน

8.1. สัตว์ทดลองใช้กุ้งก้ามกราม ขนาด 20-30 กรัม จำนวน 10 ตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 25x50x30 เซนติเมตร ใส่น้ำตู้ละ 20 ลิตร มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลา โดยใช้เครื่องให้อากาศและพักไว้ 1 วัน ก่อนนำมาใส่กระบะพลาสติก ใช้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดที่เคลือบด้วยสารสกัดสมุนไพร และตัวช่วยเคลือบสารเหนียว α-starch 2 % ให้อาหาร 3 % ของน้ำหนักตัว วันละ 3 เวลา ได้แก่ 08.00 น. 12.00 น. และ 17.00 น.

8.2. เตรียมเชื้อ *A. hydrophila* ใส่กระบะละ 10^8 ml/l

8.3. สารสกัดสมุนไพร ปริมาณที่ใช้เคลือบอาหาร ที่ค่า MIC, MBC และ LC_{50} ของแต่ละสารสกัด ด้วยปริมาตร (มิลลิลิตร)/อาหาร 100 g

8.4. ใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline (OXY AZ) เลขทะเบียนที่ 1D 180/46 ใช้อัตราส่วน 0.1 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 g ต่อวัน

8.5 แผนการทดลองแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดละ 2 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว ทำการรักษาเป็นเวลา 7 วันดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม = กุ้งปกติ (ไม่ฉีดเชื้อAH)

ชุดทดลองที่ 2 กลุ่มควบคุม = กุ้ง+ เชื้อAH

ชุดทดลองที่ 3 กุ้ง + เชื้อAH + oxytetracycline 0.1 กรัม

ชุดทดลองที่ 4 กุ้ง + เชื้อAH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 1

ชุดทดลองที่ 5 กุ้ง + เชื้อAH + สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 2

ชุดทดลองที่ 6 กุ้ง + เชื้อAH +สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 3

8.6. บันทึกการรอดตายและสังเกตอาการของกุ้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งมาตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด และจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (Total Plate count)

9. การศึกษาปริมาณเซลล์เม็ดเลือดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเลือดของกุ้งก้ามกราม

9.1. เจาะเลือดกุ้งใช้เข็มพลาสติกขนาด 1 ml นำมาเจือจางแบบ 10-fold dilution ด้วย EDTA 0.1 M ใช้อัตราส่วน เลือด 1: EDTA 9 นับจำนวนเม็ดเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดกุ้ง (cell/ml^3) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543) บันทึกผลการทดลอง

9.2. ดูดเลือดที่เจือจางแต่ละหลอด 100 µl เกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียใน ช่วง 30-300 cfu

9.3. บันทึกผล ชนิดเม็ดเลือด และเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งแบบสไลด์ถาวร

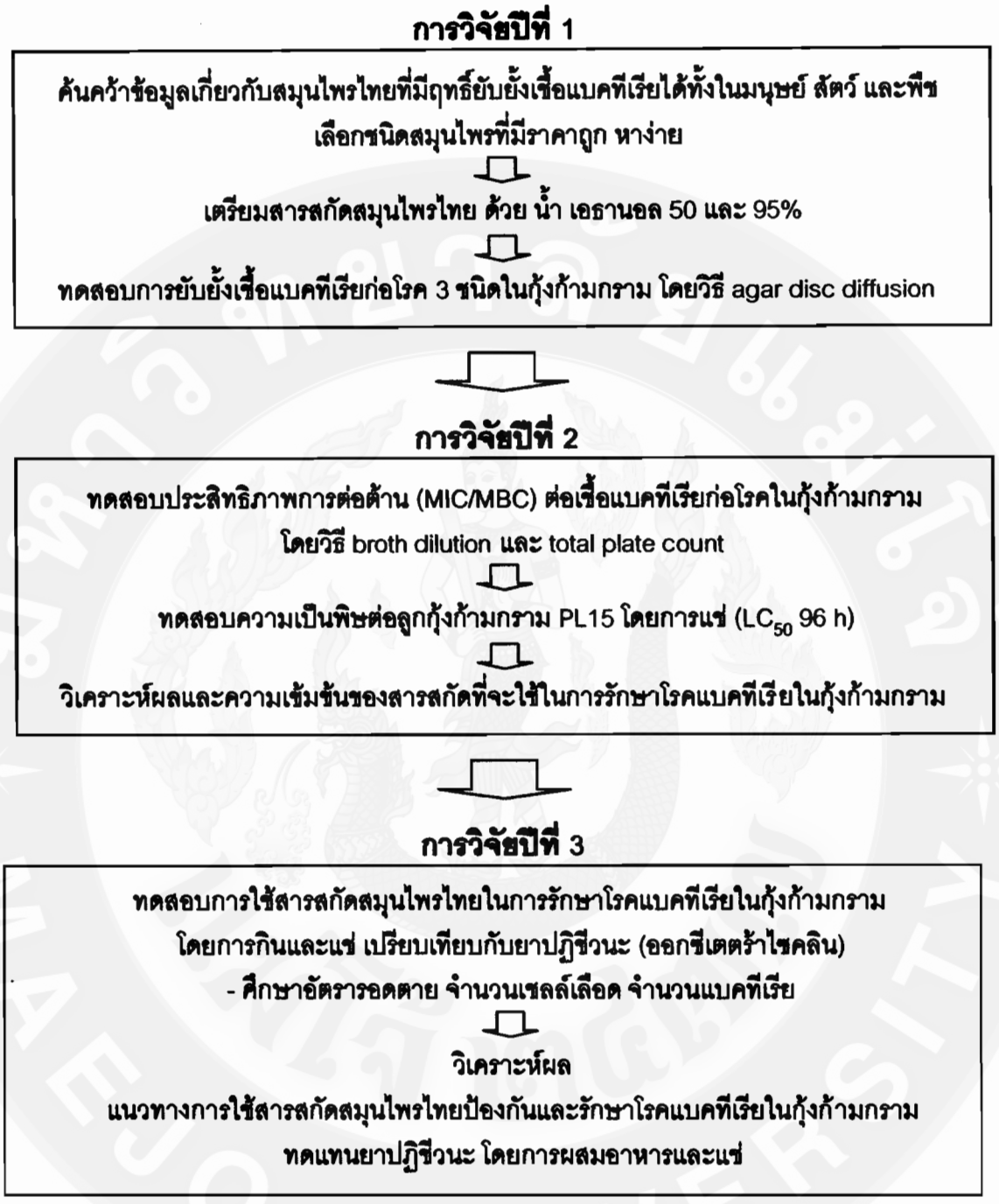
10. การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบขนาดของ inhibition zone ค่า MIC/MBC ค่าความเป็นพิษ (LC_{50} 96 h) ของสารสกัดสมุนไพรต่อลูกกุ้งก้ามกราม P15 และความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่เหมาะสมในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีการแช่และวิธีการกิน ด้วย one-way ANOVA

11. สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิชาชีวภาพทางการประมง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรน้ำ มหาวิท-ยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

การศึกษาครั้งนี้ใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 3 ปี กับ 6 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 และสิ้นสุดในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2550



ภาพที่ 8 แผนผังการทำงานวิจัยในระยะเวลา 3 ปี

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิจัยปีที่ 1

1.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดสมุนไพร

ในการวิจัยนี้ได้ใช้สมุนไพรทั้งหมด 96 ชนิด (ตารางที่ 2) โดยบางชนิดทั้งแบบสดและแห้ง ทำให้ได้สมุนไพร 112 ชนิดส่วน โดยใช้ส่วนต่างๆของสมุนไพรทั้งสดและแห้งที่หาง่ายหรือมีขายทั่วไป และใช้น้ำ เอธานอล 50 % และ 95 % เป็นตัวทำละลาย ดังนั้นได้สารสกัดสมุนไพรไทยทั้งสิ้น 336 ชนิด

ตารางที่ 2 รายชื่อสมุนไพรไทยที่นำมาทำการทดสอบ

ชื่อสามัญไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์
กระชายดำ	*Kaempferia parviflora* Wall.
กระชายม่วง	*Boesenbergia* sp.
กระเทียม	*Allium sativum* Linn.
กระเพรา	*Ocimum sanctum* Linn
กระวาน	*Amomum krervanh* Pierre.
กล้วย	*Masu Sapientum* Linn.
กะทกรก	*Passiflora foetida* Linn.
กะเม็ง	*Eclipta prostrate* Linn.
กานพลู	*Eugenia caryophyllus* Bullock & Harrison
กุยช่าย	*Allium tuberosum*
ขนุน	*Artocarpus heterophyllus* Lam.
ขลู่	*Pluchea indica*(Linn) Less
ข้าวโพด	*Sesbania grandiflora* Desv
ข้าวสาลี	*Triticum aestivum L.*
ขี้เหล็ก	*Cassia siamea* Britt.
คำฝอย	*Carthamus tinctorius L.*
คูน	*Cassia fidlula* Linn.
จันทน์เทศ	*Myristica fragrans* Houtt.
จันทน์แปดกลีบ	*Ilicium verum* Hook.f.
จาสาบเสือ	*Mikania micrantha*

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสามัญไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์
เจตมูลเพลิงแดง	*Plumbago indica* Linn
ชะพลู	*Piper sarmentosum* Roxb
ชะเอมเทศ	*Glycyrrhiza glabra L.*
ชาเขียวญี่ปุ่น	*Camellia sinensis* Trans
ชุมเห็ดเทศ	*Cassia alata* Linn
เชียงดา	*Gymnema inodorum* Decne.
ดาวเรือง	*Tagetes erecta* L.
ดีปลี	*Piper chaba* Hunter
ต้นตายใบเป็น	*Kakanchoe pinnata* Pers.
ต้อยติ่ง	*Hygrophila erecta* Hochr.
ตะไคร้	*Cymbopogon citratus* DC. Stapf
เตย	*Pandanus tectorius Blume*
เตยหอม	*Pandanus amaryllifolius Roxb.*
ถั่วฝักยาว	*Vigna sinensis* L.
ทับทิม	*Punica granatum* L. var granntum
เทียนข้าวเปลือก	*Foeniculum vulgare* Mill.
เทียนตาตั๊กแตน (เมล็ด)	*Anethum graveolens* Linn
เทียนบ้าน (ใบสด)	*Impaatiens balsamina* L.
น้อยหน่า (ใบ)	*Annona squamosa* L.
น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* L.
บอระเพ็ด	*Tinospora crispa* Miers ex Hook.f. & Thoms
บัวบก	*Centella asiatica* L. Urb
บัวหลวง	*Nelumbo nucifera* Gaertn.
เปราะหอม	*Kaempferia galanga* Linn.
เปล้าตองแตก	*Baliospermum montanum* Muell. Arg.
ผักกระสัง	*Feronia lucida* Teysm & Binn.
ผักเค็ด	*Cassia tora* L.
ผักชี	*Coriandrum sativa* Linn
ผักบุ้งแดง	*Impomoea aquatica* Forsk.
ผักบุ้งขาว	*Impomoea aquatica* Forsk.

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสามัญไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์
ผักเบี้ย	*Portulaca oleracea* L.
ผักปลัง	*Basella alba* L.
ผักเผ็ด	*Spilanthes paniculata* Wall. Ex DC.
ผักไผ่	*Polygonum odoratum* Lour.
ฝิ่น	*Jatropha multifida* Linn.
ฝรั่ง	*Psidium guajava* Linn.
ฝาง	*Caesalpinia sappan* L.
พริกแดง	*Capsicum annuum* L.var.grossum
พริกไทยดำ	*Piper nigrum L.*
พลู	*Piper betle* L.
พลูคาว	*Houttuynia cordata* Thunb.
ไพล	*Zingiber cassumunar* Roxb.
ฟ้าทะลายโจร	*Andrographis paniculata* Wall.
มะกรูด	*Citrus hystrix* DC.Kaffir
มะม่วงหิมพานต์	*Anarcardium occidentale* L.
มะยม	*Phyllanthus acidus* L. Skeels
มะระขี้นก	*Momordica charantia* Linn.
มะระหวาน (ใบ)	*Sechium edule* Sw
มะแข่น	*Zanthoxytetracyclineylum limonella*
มะแว้ง	*Solanum trilobatum* L.
มังคุด	*Garcinia mangstana* Linn.
แมงลัก	*Ocimum basilicum* L.
ไมยราบ	*Mimosa pudica* L.
ไมยราบยักษ์	*Mimosa pigra* L.
ยอ	*Morinda citrifolia* Linn
ยี่หร่า	*Carum carri* Linn
รางจืด	*Thunbergia laurifolia* Linn.
ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus niruri* L.
ลำโพงขาว	*Datura metet* L. var metel
ว่านหางจระเข้	*Aloe vera* L. Burm. f

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสามัญไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์
หงอนไก่	*Celoxia argenter* Linn.
หญ้ากรดน้ำ	*Scoparia dulcis* L.
หญ้าพันงูขาว	*Achyranthes aspera* L.
หญ้าลิ้นงู	*Hedyotis corymbosa* Lamk.
หญ้าสามวัน	Vernonia *cinerea* Less
หญ้าหัวโม่ง	*Kyllinga brevifolia* Rottb.
หนุมานนั่งแท่น	*Jatropha podagrica* Hook. f.
หนุมานประสานกาย	*Schefflera leucantha* Viguier
หม่อน	*Morus alba* L.
หมาก	*Areca catechu* L.
หูกวาง	*Terminalia catappa* L
เหงือกปลาหมอ	*Acanthus ebracteatus* Vahl.
โหระพา	*Ocimum basilicum* Linn.
สะเดา	*Azadirachta indica* A. Juss
สะระแหน่ (ใบ)	*Mentha condifolia Opiz.*
สาหร่ายไปรูลิน่า	*Spirulina pratensis* Trans
สาบเสือ	*Eupatorium odoratum* Linn.
อบเชย	*Cinnamomum verum* J. Presl

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. parahaemolyticus* (VP) โดยวิธี agar disc diffusion พบว่า สารสกัดของสมุนไพรไทย 29 ชนิด ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสาม ได้แก่ กระวาน(ผล) กระสัง(ทั้งต้น) กล้วย(ผล) ขนุน(แก่น) ข้าวโพด(ซัง) ข้าวสาลี(เปลือก) คำฝอย(ดอก) จันทน์เทศ(ผล) ชะเอมเทศ(ทั้งต้น) ดีปลี(ผล) ต้อยติ่ง(ต้น) ตะไคร้(ทั้งต้น) เตย(ใบ) เตยหอม(ใบ) เทียนข้าวเปลือก(เมล็ด) บอระเพ็ด(กิ่ง) เปราะหอม(ต้น) ผักเค็ด(ทั้งต้น) ผักชี(ต้น) ผักชีลาว (ทั้งต้น) พริกไทยดำ(เมล็ด) ไพล(เหง้า) ฟ้าทะลายโจร(ใบสด) ไมยราบยักษ์(ใบ) มะม่วงหิมพานต์ (เปลือกผล) มะยม(ใบ) หงอนไก่ (ใบ) หนุมานนั่งแท่น(ยางสด) และหญ้าพันงู(ทั้งต้น)

จากการสังเกตและวัดขนาดของ inhibition zone โดยต้องเห็นขนาดวงใสที่เกินขอบของกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.00 mm พบว่า มีสารสกัดของสมุนไพร 23 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้ง 3 ชนิดได้ดี ได้แก่ กระเทียม(หัวสด) กระเพรา(ใบ) กานพลู(ดอก) จาสาบเสือ(ใบสดและแห้ง) เจตมูลเพลิงแดง(แก่น) ขะพลู(ใบ) ชาเขียวญี่ปุ่น(ใบ) ชุมเห็ดเทศ(ใบ) ทับทิม(เปลือกผล) เทียนตาตั๊กแตน(เมล็ด) น้อยหน่า(ใบ) ผักเผ็ด(ใบแห้งและสด) ฝาง(แก่น) พริกแดง(ดอก) พลู(ใบ) ฟ้าทะลายโจร(ใบ) มะระหวาน(ใบ) หูกวาง(ใบแห้งและสด) สะระแหน่(ใบ) และ อบเชย(เปลือก) ดังตารางที่ 3 และสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงมาก (ขนาดวงใสเกิน 15 mm) ได้แก่ กระเทียมสด เจตมูลเพลิงแดง และ ใบหูกวาง ซึ่งสกัดด้วยเอธานอล

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ สารสกัดของสมุนไพร 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VH ได้แก่ ผักไผ่(ใบ) รางจืด(ทั้งต้น) ว่านหางจระเข้(วุ้น) มะยม(ผลสด) และเหงือกปลาหมอ(ใบ) (ตารางที่ 4) สารสกัดของสมุนไพร 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VP ได้แก่ มะแข่น(ทั้งต้น) มะแว้ก และลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) (ตารางที่ 5) และสารสกัดของสมุนไพร 16 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VP และ VH ได้แก่ กะเม็ง(ทั้งต้น) กระชายม่วง(เหง้า) ขี้เหล็ก(ใบ) ถั่วฝักยาว(ฝัก) เทียนบ้าน(ใบสด) บัวบก(ทั้งต้น) มะกรูด(ใบ) มะระขี้นก(ใบ) มังคุด(เปลือกผล) แมงลัก(ทั้งต้น) ไมยราบ(ใบ) ลำโพงขาว(ใบ) ว่านหางจระเข้(เปลือก) หญ้าลิ้นงู(ทั้งต้น) สะเดา(ใบ) และสาบเสือ(ใบ) (ตารางที่ 6) จะสังเกตได้ว่า สารสกัดสมุนไพรทั้งหมดในกลุ่มที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิด มีฤทธิ์ไม่สูง (ขนาดวงใส < 10 mm)

สำหรับสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเชื้อเดียว คือ สารสกัดของสมุนไพร 9 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH ได้แก่ กระเพรา(ใบสด) จันทน์แปดกีบ(ดอก) ดาวเรือง(ดอก) ต้อยติ่ง(ใบ) บัวหลวง(เกสรตัวผู้+กลีบดอก) ผักบุ้งแดง(ใบสด) ผักบุ้งขาว(ใบสด) ผักปลัง (ใบ) และฝรั่ง(ใบ) ดังในตารางที่ 7

สารสกัดของสมุนไพร 7 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VP ได้แก่ กุยช่าย(ใบ) น้ำนมราชสีห์(ใบ) มะระขี้นก(ผล) ยอ(ใบ) หนุมานประสานกาย(ใบสด) หม่อน(ใบ) และโหระพา(ใบ) ดังในตารางที่ 8

สารสกัดของสมุนไพร 16 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH ได้แก่ กะทกรก(ผล) กระชายดำ(เหง้า) ขลู่(ใบ) คูน(ใบ) ต้นตายใบเป็น(ใบ) บัวบก(ทั้งต้นสด) เปล้าตองแตก(ใบ) ผักเบี้ย(ใบ) ฝิ่น(ต้น) พลูคาว(ใบ) หญ้ากรดน้ำ(ใบ) หญ้าสามวัน(ใบ) หญ้าหัวโม่ง(ใบ) หนุมานประสานกาย(ใบ) หมาก(ผล) และสาหร่ายไปรูลิน่า (เซลล์) ดังในตารางที่ 9

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas .hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) และ *V. harveyi* (VH)

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition Zone (mm)								
				AH			VH			VP		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
กระเทียม (หัวสด)	5.00	6.95	6.71	9.07	11.53	11.10	5.70	19.80	18.17	6.32	17.58	13.40
กระเพรา (ใบ)	-	6.02	6.01	-	9.50	7.00	-	8.70	5.00	-	5.00	6.07
กานพลู (ดอก)	4.05	4.48	4.62	5.00	8.66	13.58	5.00	9.03	8.05	5.00	18.37	9.65
จาสาบเสือ (ใบแห้ง)	-	5.52	5.63	-	7.20	6.80	-	7.18	7.75	-	6.85	8.075
จาสาบเสือ (ใบสด)	-	5.93	5.63	-	6.50	6.50	-	7.50	7.80	-	5.00	5.00
เจตมูลเพลิงแดง (แก่น)	4.51	4.83	4.72	5.00	17.52	16.13	5.00	24.15	22.3	5.00	21.10	16.47
ชะพลู (ใบ)	-	6.17	5.79	-	11.75	7.73	-	10.45	8.50	-	12.73	7.2
ชาเขียวญี่ปุ่น (ใบ)	6.40	6.03	5.73	5.00	11.75	7.73	5.00	10.45	8.50	-	12.73	7.20
ชุมเห็ดเทศ (ใบ)	-	6.01	6.09	-	5.00	8.36	-	10.42	11.10	-	13.00	12.82
ทับทิม (เปลือก)	4.80	4.63	5.18	10.81	10.15	12.05	5.00	13.00	14.28	11.87	10.45	14.82
เทียนตาตั๊กแตน (เมล็ด)	7.10	6.81	6.13	5.00	10.81	5.00	18.66	12.03	14.05	5.00	7.35	7.60
น้อยหน่า (ใบ)	-	5.24	5.12	-	5.00	9.40	-	6.40	6.50	-	5.00	9.71
ผักเผ็ด (ใบแห้ง)	-	5.79	6.09	-	7.95	6.80	-	7.10	6.30	-	8.28	11.05
ผักเผ็ด (ใบสด)	-	6.36	6.57	-	9.75	7.45	-	8.00	11.63	-	8.83	9.77
ฝาง (แก่น)	-	5.21	4.83	-	9.08	9.51	-	9.12	10.83	-	14.70	8.23

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition Zone (mm)								
				AH			VH			VP		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
พริกแดง (ดอก)	-	5.40	5.12	-	9.50	8.00	-	5.00	7.20	-	5.00	6.05
พลู (ใบ)	-	6.50	6.30	-	7.00	7.70	5.00	8.85	8.80	5.00	9.26	9.30
ฟ้าทะลายโจร (ทั้งต้น)	-	7.44	7.14	-	9.45	5.00	-	6.80	5.00	-	7.40	5.00
มะระหวาน (ใบ)	6.80	5.63	5.71	5.00	9.42	5.00	7.18	7.70	8.35	5.00	11.10	7.20
หูกวาง (ใบแห้ง)	5.80	4.88	4.92	8.03	13.93	15.78	12.92	18.30	18.42	10.25	18.45	19.35
หูกวาง (ใบสด)	-	4.81	4.83	-	13.16	14.18	-	15.10	16.05	-	15.30	15.76
สะระแหน่ (ใบ)	-	6.21	6.18	-	8.5*1	10.46	-	5.00	8.15	-	5.00	8.60
อบเชย (เปลือก)	4.69	4.76	4.82	5.00	9.92	5.00	5.00	6.25	6.41	12.1	5.00	5.00

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 1 ชนิด จาก *Aeromonas .hydrophila* (AH) และ *Vibrio harveyi* (VH)

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition Zone (mm)					
				AH			VH		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
ผักไผ่ (ใบแห้ง)	-	5.71	5.55	-	-	7.30	-	6.85	-
รางจืด (ทั้งต้น)	6.53	6.40	6.30	9.33	-	-	-	6.50	6.30
ว่านหางจระเข้ (วุ้น)		5.82	5.83		7.03	7.80		-	7.37
มะยม (ผลสด)		3.71	3.15		7.36	-		-	8.12
เหงือกปลาหมอ (ใบ)		5.70	5.60		6.05	-	-	6.93	8.03

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 1 ชนิด จาก *Aeromonas .hydrophila* (AH) และ *Vibrio parahaemolyticus* (VP)

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition Zone (mm)					
				AH			VP		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
มะแข่น (ทั้งต้น)	-	5.43	5.40	5.00	8.10	9.70	5.00	6.25	5.00
มะแว้ก	-	5.43	5.40	5.00	8.10	9.70	5.00	6.25	5.00
ลูกใต้ใบ (ทั้งต้น)	4.42	4.95	4.93	5.00	7.32	5.00	5.00	15.26	5.00

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค 1 ชนิด จาก *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. parahaemolyticus* (VP)

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition Zone (mm)					
				VH			VP		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
กะเม็ง (ทั้งต้น)	-	6.35	6.41	-	5.00	7.73	-	5.00	8.00
กระชายม่วง (เหง้า)	-	7.05	7.23	-	8.90	9.12	-	8.96	7.72
ขี้เหล็ก (ใบ)	-	4.03	4.04	-	5.00	11.70	-	5.00	10.13
เขียงดา (ทั้งต้น)	-	6.61	6.70	-	7.15	7.10	-	7.10	5.00
ถั่วฝักยาว (ฝัก)	-	5.50	5.68	-	6.27	6.50	-	6.25	6.85
เทียนบ้าน (ใบสด)	-	4.71	4.41	-	6.10	5.00	-	5.00	7.65
บัวบก (ทั้งต้น)	-	5.12	5.05	-	9.00	6.45	-	8.95	5.00
มะกรูด(ใบแห้ง)	-	4.68	5.23	-	5.00	7.10	-	6.60	7.40
มะระขี้นก (ใบ)	7.40	6.33	6.19	7.48	8.51	8.67	5.00	6.33	8.80
มังคุด (เปลือก)	4.02	4.68	4.24	5.00	8.40	6.96	5.00	8.83	6.80
แมงลัก (ทั้งต้น)	6.80	6.30	6.20	5.00	4.60	4.08	5.00	6.20	5.00
ไมยราบ (ใบ)	-	4.71	4.41	-	5.00	7.55	-	6.00	5.00
ลำโพงขาว (ใบ)	7.10	6.44	6.49	5.00	9.73	9.36	5.00	8.73	10.70
ว่านหางจระเข้ (เปลือกใบ)	-	7.49	6.53	-	9.30	6.00	-	8.00	6.93
สะเดา (ใบ)	-	5.42	5.48	-	8.06	8.33	-	8.43	8.88
สาบเสือ (ใบ)	-	5.60	5.64	-	11.30	8.95	-	8.56	7.68
หญ้าลิ้นงู (ทั้งต้น)	6.00	5.97	5.89	5.00	12.56	12.65	5.00	8.46	12.73

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค*Aeromonas hydrophila* ชนิดเดียว

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition zone (mm)		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
กระเพรา (ใบสด)	-	6.65	6.51	5.00	7.30	6.30
จันทน์แปดกีบ (ดอก)	3.44	4.26	4.28	5.00	9.75	5.00
ดาวเรือง (ดอก)	-	5.20	5.20	5.00	4.05	4.08
ต้อยติ่ง (ใบ)	-	7.00	6.85	5.00	5.00	9.88
บัวหลวง (เกสรตัวผู้+กลีบดอก)	-	5.30	5.06	5.00	5.00	8.90
ผักบุ้งแดง (ใบสด)	-	6.31	6.09	5.00	5.00	6.33
ผักบุ้งขาว (ใบสด)	-	6.54	6.50	5.00	5.00	6.23
ผักปลัง (ใบ)	6.90	5.90	5.70	5.00	4.65	5.00
ฝรั่ง (ใบ)	5.46	5.86	5.81	6.42	7.03	7.48

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* ชนิดเดียว

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition zone (mm)		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
กุยช่าย (ใบ)	5.40	6.10	6.60	4.92	5.00	5.00
น้ำนมราชสีห์ (ใบ)	6.00	5.40	5.30	5.58	5.00	5.00
มะระขี้นก (ผล)	-	6.70	-	5.00	5.00	9.07
ยอ (ใบ)	-	6.27	6.22	5.00	7.10	5.00
หนุมานประสานกาย (ใบสด)	-	5.87	5.83	5.00	6.80	5.00
หม่อน (ใบ)	-	6.72	6.93	5.00	9.70	10.23
โหรพา (ใบ)	-	4.71	4.41	5.00	6.93	5.00

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ antimicrobial activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* ชนิดเดียว

สมุนไพร	pH ของสารสกัดสมุนไพร			Inhibition zone (mm)		
	น้ำ	50%	95%	น้ำ	50%	95%
กะทกรก (ผล)	-	6.30	6.40	5.00	6.76	6.66
กระชายดำ (เหง้า)	-	6.00	5.90	5.00	5.92	5.92
ขลู่ (ใบ)	-	5.73	5.53	5.00	5.00	8.00
คูน (ใบ)	6.20	5.80	5.70	5.00	9.76	10.93
ต้นตายใบเป็น (ใบ)	-	6.80	6.00	5.00	6.62	6.78
บัวบก (ทั้งต้นสด)	-	5.51	5.64	5.00	7.50	9.45
เปล้าตองแตก (ใบ)	7.70	6.10	6.20	5.00	8.28	7.55
ผักเบี้ย (ใบ)	7.20	6.80	6.80	5.67	5.00	5.00
ผักปลัง (ใบ)	6.90	5.90	5.70	5.00	4.65	5.00
ฝรั่ง (ใบ)	5.46	5.86	5.81	6.42	7.03	7.48
ฝิ่น (ต้น)	7.30	5.80	6.70	5.00	8.75	8.55
พลูคาว (ใบ)	5.30	5.60	5.00	5.00	6.73	6.57
หญ้ากรดน้ำ (ใบ)	6.40	6.10	6.20	5.00	7.1	7.40
หญ้าสามวัน (ใบ)	7.40	6.60	6.50	5.00	8.30	7.02
หญ้าหัวโม่ง (ใบ)	-	6.40	6.20	5.00	7.06	7.16
หนุมานประสานกาย (ใบ)	-	5.52	5.57	5.00	13.60	14.00
หมาก (ผล)	6.00	5.20	5.30	5.53	5.00	5.00
สาหร่ายไปรูลิน่า (เซลล์)	-	6.43	6.01	5.00	8.70	5.00

ผลการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อแต่ละเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียว พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด 3 อันดับ สำหรับเชื้อ AH ได้แก่ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50 % (ขนาดวงใส = 17.52 mm) ใบหูกวางสกัดสด (ขนาดวงใส = 15.78 mm) และแห้งด้วยเอธานอล 95 % (ขนาดวงใส = 14.18 mm) สำหรับเชื้อ VH ได้แก่ เจตมูลเพลิงแดงสกัดเอธานอล 50 % (ขนาดวงใส = 24.12 mm) เจตมูลเพลิงแดงสกัดเอธานอล 95 % (ขนาดวงใส = 22.30 mm) และกระเทียมสดสกัดด้วยเอธานอล 50 % (ขนาดวงใส = 19.80 mm) และสำหรับเชื้อ VP ได้แก่ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50 % (ขนาดวงใส = 21.10 mm) ใบหูกวางแห้งสกัดเอธานอล 95 % (ขนาดวงใส = 19.35 mm) และใบหูกวางแห้งสกัดเอธานอล 50% (ขนาดวงใส = 18.45 mm)

ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของวงใสขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของ inoculum และสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของสมุนไพร ในงานวิจัยนี้ได้เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นเท่ากัน อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ NA และขนาดของ inoculum มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 ตัว/มิลลิลิตร เหมือนกันทุกตัวอย่าง ยกเว้นค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสมุนไพรที่ต่างกัน ซึ่งหากมีค่าความเป็นกรด เท่ากับ 4.0-6.5 จะเพิ่มขนาดของบริเวณยับยั้งได้ และค่าความเป็นด่าง มากกว่า 6.5 ขนาดของบริเวณยับยั้งจะลดลง (ปถมาพรและอัจฉราวรรณ, 2547)

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เอธานอล 50 % เป็นตัวทำละลาย เมื่อเปรียบเทียบผล Inhibition zone กับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า พบว่า สารสกัดสมุนไพรบางชนิดได้ผลสอดคล้องกัน ดังนี้

Kim (1997) รายงานว่า สารสกัดกระเทียมสด และใบชาออสเตรเลียแห้งด้วยเอธานอล 95 % มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylo-coccus aureus* ได้ดี

ส่วนคณิต (2543ข) กล่าวว่า การใช้สารสกัดกระเทียมและใบหูกวางด้วยน้ำกลั่นรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในปลาดุก พบว่า กระเทียมที่ปริมาณสารสกัด 30 และ 40 µl มีขนาดวงใสเฉลี่ยเท่ากับ 1.3 และ 2 mm ตามลำดับ ลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นเป็นวงเล็กๆ สีเหลืองอ่อนใส รอบๆ จะเป็นสีขาวขุ่น ส่วนสารสกัดจากใบหูกวางที่ปริมาณสารสกัด 20, 30 และ 40 µl มีขนาดวงใสเฉลี่ยเท่ากับ 23, 25 และ 30 mm ตามลำดับ มีลักษณะของวงใสเป็นวงกลมสีน้ำตาลอมเขียว ส่วนบริเวณรอบๆ วงกลมมีสีขาวขุ่น เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของใบหูกวางสกัดด้วยเอธานอล 50 % และ 95 % จากงานวิจัยนี้ พบว่าลักษณะของวงใสเป็นวงกลมกว้าง มี 2 วง คือ วงข้างในมีลักษณะใสกว่าวงข้างนอก ซึ่งมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย และเห็นชัดเจน มีขนาดวงใสเท่ากับ 13.93 และ 15.78 mm ตามลำดับ

ส่วนหยาดรุ้ง (2544) รายงานว่า ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเทียมสด พันธุ์ศรีสะเกษ และใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยใช้วิธี paper disc diffusion พบว่า สารสกัดกระเทียมสดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ได้ดีที่สุด บริเวณ Inhibition zone มีขนาดเท่ากับ 14.5 และ 9.0 mm ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าสารสกัดเอธานอล 50 % และ 95% ของกระเทียมสดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้สูง มีขนาดวงใสเท่ากับ 17.58±1.85 และ 13.4±3.19 mm ตามลำดับ ทั้งนี้สารสำคัญอาจจะละลายในสารสกัดเอธานอล 50 % ได้เหมาะสม และได้รายงานว่าสารสกัดสะระแหน่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว เช่นเดียวกับที่ Gislene et al. (2000) รายงานว่าสะระแหน่ด้วยเอธานอล 95% ในอัตราส่วน 1:1 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน แต่ Ponce et al. (2003) รายงานว่า สารสกัดสะระแหน่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสูงที่สุด บริเวณวงใสมีขนาด 22.2 มิลลิเมตร และในงานวิจัยนี้ พบว่าสะระแหน่สกัดด้วยเอธานอล 50 % มีฤทธิ์ในการยั้งยับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ มีขนาดวงใสเท่ากับ 8.60 mm ทั้งนี้สารสำคัญอาจมีความแตกต่างกันเนื่องจากแหล่งเพาะปลูกของตัวอย่างพืช

ส่วน Gislene และคณะ (2000) รายงานว่าสารสกัดทับทิม ซึ่งมีสารประกอบเคมี benzonic acid, cinnamic acid, eugenol และ farnesol ที่สกัดด้วยเอธานอล 95% ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ agar diffution method พบว่าสารสกัดทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* มีขนาดวงใสมากกว่า 7 mm แต่ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของทับทิมสกัดด้วยเอธานอล 50 และ 95 % ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *A hydrophila, V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดี มีขนาดวงใสเท่ากับ 10.15, 12.10, 10.45, 14.82, 12.03 และ 14.05 ตามลำดับ

จากการวิจัยนี้ ลักษณะของวงใสที่สังเกตได้มี 3 แบบ คือ

แบบที่ 1 ลักษณะวงใสเป็นวงกลมกว้าง ใส และขอบชัดเจน แสดงว่าสารสำคัญในกระเทียมมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดี ตัวอย่างเช่น สารสกัดกระเทียมด้วยเอธานอล 50 %

แบบที่ 2 ลักษณะวงใสเป็นวงกลมกว้าง 2 วง ชัดเจน วงข้างในมีลักษณะใสกว่าวงข้างนอก ซึ่งมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย สังเกตว่ามีแบคทีเรียเจริญได้เล็กน้อย แสดงว่า มีสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพร อย่างน้อย 2 กลุ่ม โดยสารกลุ่มแรกอยู่ที่วงใสข้างใน มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดี ส่วนสารกลุ่มที่สองอยู่ที่วงขุ่นข้างนอก มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้บางส่วน ทำให้มีแบคทีเรียสามารถเจริญได้เล็กน้อย ตัวอย่างเช่น สารสกัดใบหูกวางแห้งและสด สารสกัดเปลือกทับทิม และสารสกัดชาเขียวญี่ปุ่น ด้วยเอธานอล 50 %

แบบที่ 3 ลักษณะวงใสไม่เป็นวงกลม แผ่ขยายเป็นบริเวณกว้าง ขุ่น และเป็นสีขาว แสดงว่าสาระสำคัญในชะพลูมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้แต่ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ตัวอย่างเช่น สารสกัดใบเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50 และ 95 %

ภาพ 9 ลักษณะวงใสของสารสกัดสมุนไพรด้วยเอธานอล 50 % ยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila*

1: ใบหูกวาง 3: ชาเขียวญี่ปุ่น 5: ใบชะพลู
2: เปลือกทับทิม 4: กระเทียมสด C: เอธานอล 50 %

ภาพ 10 ลักษณะวงใสของสารสกัดสมุนไพรด้วยเอธานอล 50 % ยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*

1: ใบหูกวาง 3: ชาเขียวญี่ปุ่น 5: ใบชะพลู
2: เปลือกทับทิม 4: กระเทียมสด C: เอธานอล 50 %

ภาพ 11 ลักษณะวงใสของสารสกัดสมุนไพรด้วยเอธานอล 50 % ยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

1: ใบหูกวาง 3: ชาเขียวญี่ปุ่น 5: ใบชะพลู

2: เปลือกทับทิม 4: กระเทียมสด C: เอธานอล 50 %

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งทั้ง 3 ชนิด ของสารสกัดสมุนไพรไทย จะเห็นได้ว่า 1) มีสารสกัดสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเชื้อทั้งสามได้ 2) สารสกัดที่ได้ผลดีส่วนใหญ่ใช้สารละลาย 50% และ 3) สมุนไพรที่น่าสนใจ คือ กระเทียมสด เปลือกผลทับทิม ใบหูกวาง และใบชะพลู

ได้เลือกสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ดีและหาง่าย เพื่อนำไปทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ โดยการหาค่า MIC/MBC ในขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิด

ผลการวิจัยปีที่ 2

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้หาค่า MIC/MBC

ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดของสารสกัดสมุนไพรโดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี agar dilution และหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ด้วยวิธี broth dilution และ total plate count โดยกำหนดในค่า MIC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และค่า MBC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดสมุนไพรในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 99 %

ได้เลือกสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ดีและหาง่าย 34 ชนิด ได้แก่ กระชายม่วง(เหง้า) กระเทียม(หัวสด) กระเพรา(ใบ) กานพลู(ดอก) จาสาบเสือ(ใบแห้งและสด) เจตมูลเพลิงแดง จันทน์แปดกลีบ ชะพลู(ใบ) ชาเขียวญี่ปุ่น(ใบ) ชุมเห็ดเทศ(ใบ) ทับทิม(เปลือกผล) เทียนข้าวเปลือก(เมล็ด) ผักบุ้งแดง(ใบสด) ผักบุ้งขาว(ใบสด) ผักเผ็ด(ใบ) ผักไผ่(ใบ) ฝรั่ง(ใบ) ฝาง พลู(ใบ) ฟ้าทะลายโจร(ทั้งต้น) มะระขี้นก(ใบ) มะระขี้นก(ผล) มะระหวาน(ใบ) มังคุด(เปลือกผล) แมงลัก(ใบ) รางจืด(ทั้งต้น) ลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) ลำโพงขาว(ใบ) หญ้าลิ้นงู(ทั้งต้น) หูกวาง(ใบ) สะระแหน่(ใบ) สาหร่ายไปรูลิน่า(ทั้งเซลล์) สาบเสือ(ใบ) และอบเชย(เปลือกไม้)

สำหรับเชื้อ AH สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูง คือ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50 (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และ 95 % (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และอบเชยสกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 3 ml/l, MBC = 10 ml/l) และ 95 %(MIC = 2 ml/l, MBC = 5 ml/l) ส่วนสารสกัดที่มีประสิทธิภาพต่ำสุด คือ ใบฝรั่งสกัดด้วยน้ำ (MIC = 70 ml/l, MBC = 100 ml/l) และรางจืดสกัดด้วยน้ำ (MIC = 70 ml/l, MBC = 90 ml/l)

สำหรับเชื้อ VH สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูง คือ ใบหูกวางแห้งสกัดด้วยเอธานอล 50% (MIC = 1 ml/l, MBC = 12 ml/l) และ 95 % (MIC = 1 ml/l, MBC = 9 ml/l) และใบมะระหวานสกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 2 ml/l, MBC = 10 ml/l) และ 95 % (MIC = 2 ml/l, MBC = 10 ml/l) ส่วนสารสกัดที่มีประสิทธิภาพต่ำสุด คือ ใบมะระขี้นกสกัดด้วยน้ำ (MIC = 160 ml/l, MBC = 190 ml/l) และใบจาสาบเสือสกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 75 ml/l, MBC = 150 ml/l)

สำหรับเชื้อ VP สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูง คือ เจตมูลเพลิงแดงสกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 1 ml/l, MBC = 2 ml/l) และ 95 % (MIC = 1 ml/l, MBC = 3 ml/l) และใบหูกวางแห้ง

สกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และ 95 % (MIC = 2 ml/l, MBC = 3 ml/l) ส่วนสารสกัดที่มีประสิทธิภาพต่ำสุด คือ ใบลำโพงขาวสกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 110 ml/l, MBC = 130 ml/l) และ 95 % (MIC = 100 ml/l, MBC = 120 ml/l) และหญ้าลิ้นงูสกัดด้วยเอธานอล 50 % (MIC = 100 ml/l, MBC = 160 ml/l) และ 95 % (MIC = 100 ml/l, MBC = 140 ml/l)

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC/MBC กับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดสมุนไพรบางชนิดได้ค่าต่างกันเล็กน้อย

สถาพรและคณะ (2539ก) รายงานว่า จากการศึกษาฤทธิ์ในการของสารสกัดสมุนไพร 16 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* 10 สายพันธุ์ ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ โดยวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสารสกัดมะระขี้นกด้วยเอธานอลโดยใช้เครื่องซอฟต์เลท (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) สามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอได้ ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml และผลของ อังคณา (2546) ซึ่งพบว่าสารสกัดมะระขี้นกด้วยเอธานอลโดยใช้เครื่องซอฟต์เลท (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) สามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอ มีค่า MIC = 2.5 ml/l แต่จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดใบมะระขี้นกด้วยเอธานอล 50 และ 95 % มีค่า MIC = 40 - 70 ml/l และสารสกัดผลมะระขี้นก T2 มีค่า MIC เท่ากับ 9 ppt ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดที่ต่างกัน

สุจิตรา (2540) รายงานว่าสารสกัด tea polyphenol ที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.2) อัตราส่วน ผงชา 0.152 g/สารลาย 20 ml ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันโรควิบริโอในกุ้งกุลาดำการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* จำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. fluvialis, V. parahaemolyticus* และ *V. metschnikovii* มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 160 - 125 ppm แต่จากงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดชาเขียวญี่ปุ่นด้วยเอธานอล 50 และ 95 % มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 10 - 20 ml/l

ตารางที่ 10 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดสมุนไพร ต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. paraheamohyticus* (VP)

สมุนไพร	สารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (ml/l)					
		AH		VH		VP	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
กระชายม่วง (เหง้า)	เอธานอล 50%	-	-	3	20	10	25
	เอธานอล 95%	-	-	5	15	10	25
กระเทียม (หัวสด)	น้ำ	10	15			20	30
	เอธานอล 50%	5	10	15	20	7	10
	เอธานอล 95%	11	13	15	20	15	20
กระเพรา (ใบ)	เอธานอล 50%	40	55	-	-	-	-
	เอธานอล 95%	45	60	-	-	-	-
กานพลู (ดอก)	เอธานอล 50%	5	5	-	-	10	-
	เอธานอล 95%	5	5	-	-	10	-
จาสาบเสือ (ใบแห้ง)	เอธานอล 50%	40	60	35	50	35	50
	เอธานอล 95%	40	60	35	50	35	50
จาสาบเสือ (ใบสด)	เอธานอล 50%	6	9	75	150	45	45
	เอธานอล 95%	12	30	60	75	9	18
เจตมูลเพลิงแดง (แก่น)	เอธานอล 50%	2	4	-	-	1	2
	เอธานอล 95%	2	4	-	-	1	3
จันทน์แปดกลีบ (ดอก)	เอธานอล 50%	15	25	-	-	-	-
ชะพลู (ใบ)	เอธานอล 50%	30	60	30	50	10	20
	เอธานอล 95%	20	30	25	30	25	30
ชาเขียวญี่ปุ่น (ใบ)	น้ำ	15	20	-	-	-	-
	เอธานอล 50%	35	40	12	18	20	35
	เอธานอล 95%	10	25	10	15	15	30
ชุมเห็ดเทศ (ใบแห้ง)	เอธานอล 50%	35	35	35	45	30	45
	เอธานอล 95%	30	45	30	40	30	40
ทับทิม (เปลือก)	น้ำ	15	30	10	20	15	20
	เอธานอล 50%	9	15	5	15	3	20
	เอธานอล 95%	10	20	5	15	6	20
เทียนตาตั๊กแตน (เมล็ด)	เอธานอล 50%	10	30	5	10	35	40

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สมุนไพร	สารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (ml/l)					
		AH		VH		VP	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	เอธานอล 95%	-	-	5	10	35	50
ผักบุ้งแดง (ใบสด)	เอธานอล 95%	60	80	-	-	-	-
ผักบุ้งขาว (ใบสด)	เอธานอล 95%	60	80	-	-	-	-
ผักเผ็ด (ใบแห้ง)	เอธานอล 50%	15	25	20	30	20	30
	เอธานอล 95%	20	30	15	30	15	30
ผักไผ่ (ใบแห้ง)	เอธานอล 95%	25	35	-	-	-	-
ฝรั่ง (ใบแห้ง)	น้ำ	70	100	-	-	-	-
	เอธานอล 50%	5	15	-	-	-	-
	เอธานอล 95%	5	15	-	-	-	-
ฝาง (แก่น)	เอธานอล 50%	5	15	5	15	10	15
	เอธานอล 95%	4	10	5	10	-	-
พลู (ใบ)	เอธานอล 50%	15	20	-	-	15	20
	เอธานอล 95%	15	25	-	-	10	20
ฟ้าทะลายโจร (ใบ)	เอธานอล 95%	45	180	3	27	27	36
มะระขี้นก (ใบ)	น้ำ	-	-	160	190	-	-
	เอธานอล 50%	-	-	6	9	40	80
	เอธานอล 95%	-	-	3	6	70	90
มะระขี้นก (ผล)	เอธานอล 95%	-	-	-	-	90	100
มะระหวาน (ใบ)	เอธานอล 50%	10	45	2	10	20	70
	เอธานอล 95%	-	-	2	10	20	60
มังคุด (เปลือก)	เอธานอล 50%	-	-	-	-	5	18
แมงลัก (ใบ)	เอธานอล 95%	-	-	-	-	80	90
รางจืด (ทั้งต้น)	น้ำ	70	90	-	-	-	-
ลูกใต้ใบ (ทั้งต้น)	เอธานอล 50%	5	15	-	-	3	10
	เอธานอล 95%	-	-	-	-	-	-
ลำโพงขาว (ใบ)	เอธานอล 50%	-	-	30	40	110	130
	เอธานอล 95%	-	-	30	60	100	120
หญ้าลิ้นงู (ทั้งต้น)	เอธานอล 50%	-	-	30	50	100	160

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สมุนไพร	สารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (ml/l)					
		AH		VH		VP	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	เอธานอล 95%	-	-	20	30	100	140
หูกวาง (ใบแห้ง)	น้ำ	45	60	30	40	90	120
	เอธานอล 50%	10	40	1	12	2	4
	เอธานอล 95%	20	30	1	9	2	3
สะระแหน่ (ใบ)	เอธานอล 95%	45	75	15	30	27	27
สาบเสือ (ใบ)	เอธานอล 50%	-	-	15	30	15	30
	เอธานอล 95%	-	-	5	18	15	30
อบเชย	เอธานอล 50%	3	10	-	-	-	-
	เอธานอล 95%	2	5	-	-	-	-

อนันตภัทร (2541) รายงานว่าสารสกัดกระเทียมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* มีค่า MIC = 2.4 ppt และทดสอบค่าความเป็นพิษ พบว่า น้ำสกัดหยาบกระเทียมที่ความเข้มข้น MICx100, MICx10 มีความเป็นพิษสูง คือ ลูกปลาตายหมดภายใน 30 นาที และที่ความเข้มข้น MIC และMIC/10 ลูกปลามีอัตรารอดที่ 52.22 และ 80 % ตามลำดับ จากนั้นทำการทดลองรักษาปลาดุกบิ๊กอุยที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีแช่ด้วยสกัดหยาบของสมุนไพรสารสกัดกระเทียมด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น MICx2, MIC, MIC/2 และ MIC/4 พบว่าน้ำสกัดหยาบกระเทียม ที่ระดับความเข้มข้นที่ MIC/2 และ MIC/4 มีความเป็นพิษทำให้ปลาตายภายใน 3 และ 4 วัน ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล 50 และ 95 % ของ มีค่า MIC = 5 และ 10 ml/l คิดเป็น 60 และ 30 % ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการและแหล่งที่มาสกัดแตกต่าง จึงทำให้มีค่า MIC ต่างกัน

Gislene และคณะ (2000) รายงานว่าสารสกัดทับทิมด้วยเอธานอล 95 % ในอัตราส่วน 1:1 ทำการทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 70 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพ

ของสารสกัดทับทิมด้วยเอธานอล 50 % ต่อเชื้อ *A. hydrophila, V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* พบว่ามีค่า MIC ช่วง 3 - 15 ppt

Kloucek และคณะ (2005) รายงานว่าใบหูกวางสกัดด้วยเอธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ 9 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *S. pyogenes* ATCC 19615 และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า MIC เท่ากับ 2, 4, 8, 1, 0.25, 16, 16, 8 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี ส่วนในงานวิจัยนี้ สสารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล มีประสิทธิภาพต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ด้วยค่า MIC = 1 - 2 ml/l และต่อเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยค่า MIC = 10 - 20 ml/l และสารสกัดด้วยน้ำ มีประสิทธิภาพต่อเชื้อทั้งสาม ด้วยค่า MIC = 30 - 90 ml/l

Braga และคณะ (2005) รายงานว่าสารสกัดผลทับทิม โดยวิธี tube dilution สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และการสร้างสารพิษในลำไส้ได้ ที่ 5 ความเข้มข้น คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 และ 1.0 %(v/v) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.01% ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียช้าลง ส่วนความเข้มข้น 1% สามารถทำลายแบคทีเรียได้ แต่ความเข้มข้น 0.05% สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษได้ ส่วนในงานวิจัยนี้ สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล มีประสิทธิภาพต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ด้วยค่า MIC = 3 - 5 ml/l และต่อเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยค่า MIC = 9 - 10 ml/l และสารสกัดด้วยน้ำ มีประสิทธิภาพต่อเชื้อทั้งสาม ด้วยค่า MIC = 10 - 15 ml/l

อรรถชัย (2545) รายงานว่าสารสกัดใบบัวบกที่สกัดด้วยเอธานอล ใช้อัตราส่วนใบบัวบกแห้ง 1 กรัม/เอธานอล 95 % ปริมาณ 10 ml ที่มาของใบบัวบกมี 4 จังหวัด คือ นครปฐม เชียงใหม่ พะเยา และนครพนม พบว่าสารสกัดใบบัวบกทั้ง 4 แหล่งที่มา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ต่างกัน พบว่าสารสกัดใบบัวบกจาก จ. นครปฐม ให้ค่าต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ รองลงมา คือ จ. เชียงใหม่ และพะเยา และ จ.นครพนม ให้ค่าสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ มีค่าเท่ากับ 0.16625, 0.33250, 0.33250 และ 0.66250 mg/ml ตามลำดับ ทั้งนี้การเจริญของแบคทีเรียที่ต่างกันเนื่องมากจากความแตกต่างของพื้นที่ปลูกที่ต่างกัน สรุปได้ว่าใบบัวบกแต่ละที่มีสารสำคัญในพืชต่างกัน ส่วนในการทดลองนี้ได้ใช้ใบบัวบกบริเวณ จ. เชียงใหม่เท่านั้น และไม่มีการเปรียบเทียบกับพื้นที่อื่น

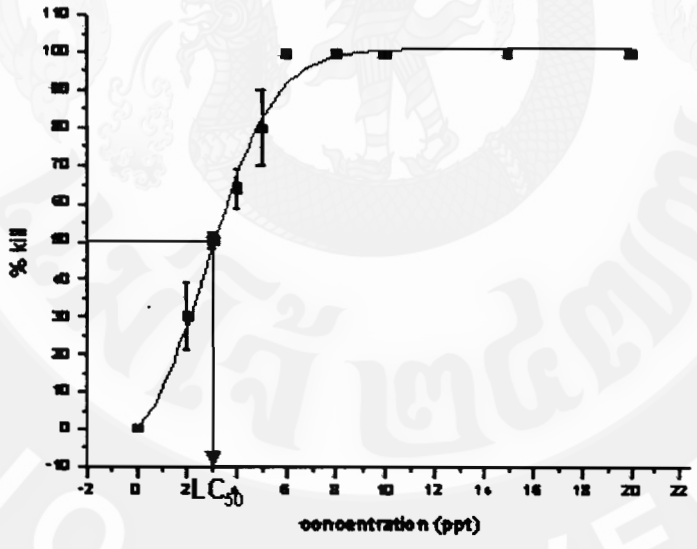
Ponce และคณะ (2003) รายงานว่าสารสกัดสะระแหน่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีค่า MIC = 0.1 - 0.15 ml/100 ml และ ค่า MBC = 0.04 - 0.05 ml/100 ml ส่วนในงานวิจัยนี้ สารสกัดสะระแหน่ด้วยเอธานอล 95 % มีประสิทธิภาพต่อเชื้อทั้งสามด้วยค่า MIC = 15 - 45 ml/l

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทย สรุปได้ว่า สารสกัดสมุนไพรไทยหลายชนิดมีประสิทธิภาพดีในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามในกุ้งก้ามกราม ซึ่งได้แก่ กระเทียม จาสาบเสือ ผักเผ็ด ฝาง ใบหูกวาง เปลือกผลทับทิม ใบชะพลู ชาเขียวญี่ปุ่น ชุมเห็ดเทศ และเทียนตาตั๊กแตน

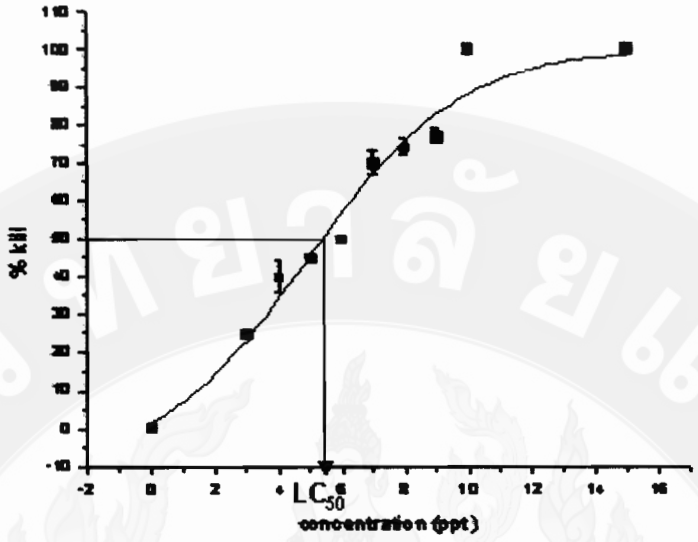
2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อกุ้งก้ามกรามโดยหาค่า LC_{50} 96 h

ได้นำสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์และประสิทธิภาพดีต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งสามชนิดในกุ้งก้ามกราม มาทดสอบความเป็นพิษต่อลูกกุ้งขนาด PL15 โดยการแช่ลูกกุ้งในน้ำใส่สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ และหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกกุ้งตาย 50% ในเวลา 96 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม Origin 6.0

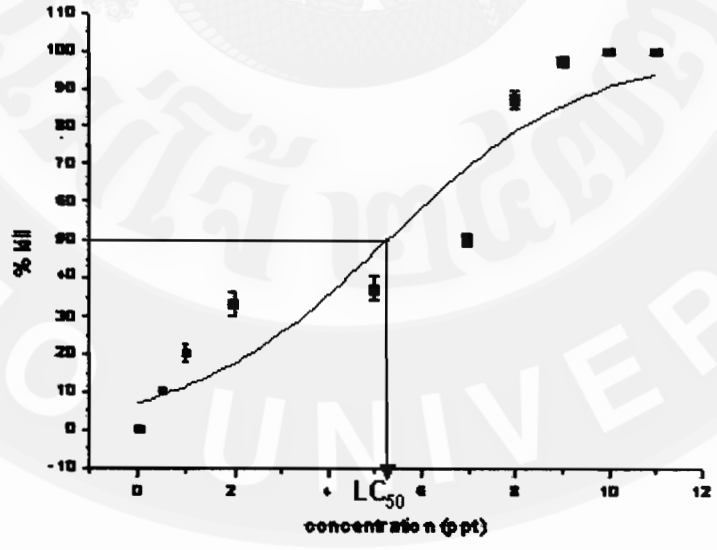
ตัวอย่างการหาค่า LC_{50} 96 h ของสารสกัดกระเทียม ชาเขียว ชะพลู เทียนตา-ตั๊กแตน ทับทิม หูกวาง และหญ้าลิ้นงู ดังในภาพที่ 12 – 18 ตามลำดับ และผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสมุนไพร 19 ชนิด ดังในตารางที่ 11



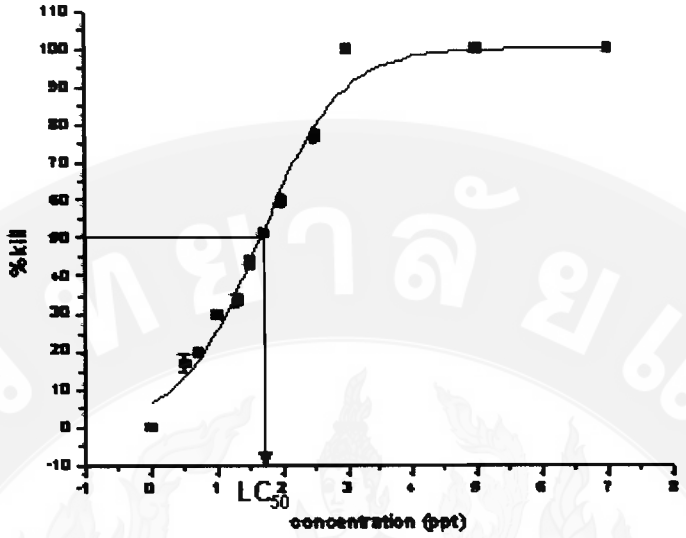
ภาพที่ 12 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดกระเทียมด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง



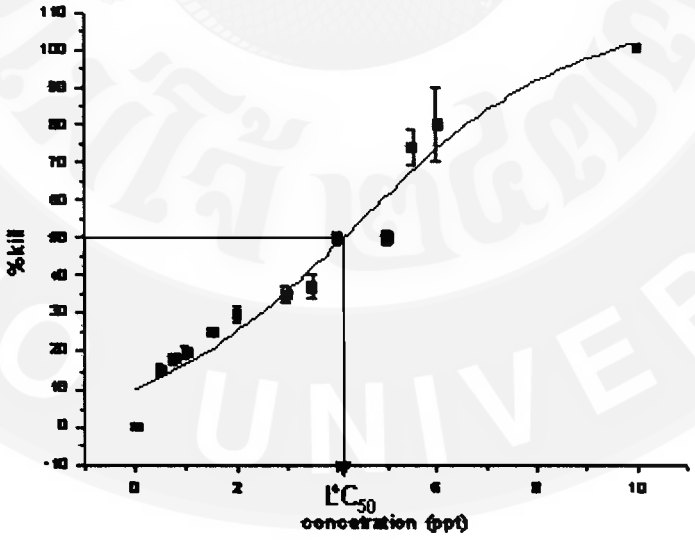
ภาพที่ 13 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดขาเขียวด้วยเอธานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง



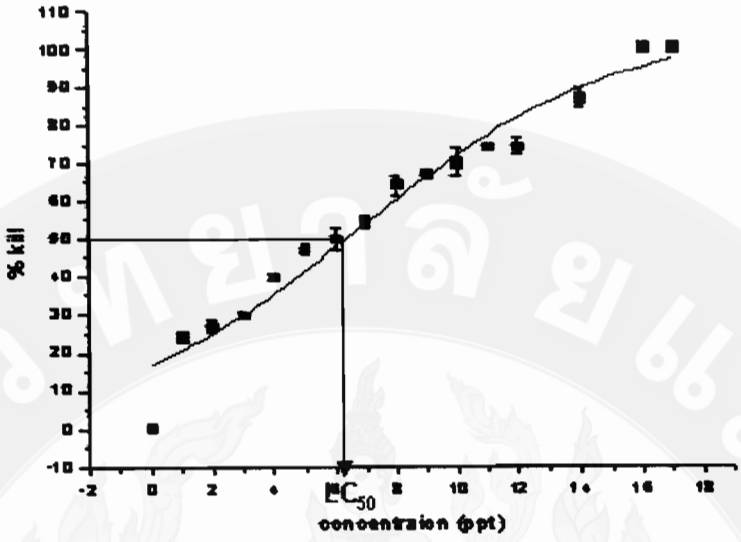
ภาพที่ 14 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดใบชะพลูด้วยเอธานอล 95% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง



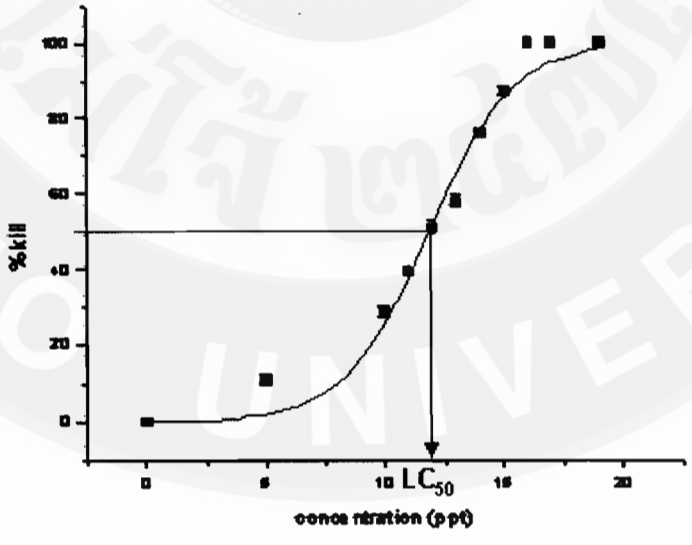
ภาพที่ 15 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดเทียนตาตั๊กแตนด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 18 สัดส่วนการตายของลูกกุ้งก้ามกราม เมื่อแช่ในสารสกัดหญ้าลิ้นงูด้วยเอธานอล 50% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 11 ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อลูกกุ้งก้ามกรามขนาด PL15

สมุนไพร	สารสกัด	pH	LC_{50} 96h (ml/l)
กระชายม่วง (เหง้า)	เอธานอล 50%	7.05	0.92
	เอธานอล 95%	7.23	0.94
กระเทียมสด (หัวสด)	น้ำ	7.40	7.14
	เอธานอล 50%	6.95	2.84
	เอธานอล 95%	6.71	1.83
ชะพลู (ใบ)	เอธานอล 50%	6.17	3.33
	เอธานอล 95%	5.79	5.26
ชาเขียวญี่ปุ่น (ใบ)	น้ำ	6.40	7.89
	เอธานอล 50%	6.03	3.02
	เอธานอล 95%	5.73	4.85
ทับทิม (เปลือกผล)	น้ำ	6.5	16.35
	เอธานอล 50%	4.63	4.35
	เอธานอล 95%	5.18	2.98
เทียนตาตั๊กแตน (เมล็ด)	เอธานอล 50%	6.81	1.65
	เอธานอล 95%	6.13	1.09
ผักบุ้งขาว (ใบ)	เอธานอล 95%	6.05	9.13
ผักบุ้งแดง (ใบ)	เอธานอล 95%	6.09	11.12
ผักไผ่ (ใบ)	เอธานอล 95%	5.55	9.42
ฝรั่ง (ใบ)	น้ำ	7.30	9.71
พลู (ใบ)	เอธานอล 50%	7.50	5.24
	เอธานอล 95%	6.80	4.95
มะระขี้นก (ใบ)	เอธานอล 50%	6.33	13.18
	เอธานอล 95%	6.19	13.26
มะระขี้นก (ผล)	เอธานอล 50%	7.00	32.63
	เอธานอล 95%	6.90	8.99
มะระหวาน (ใบ)	เอธานอล 50%	5.63	5.34
	เอธานอล 95%	5.71	5.65
แมงลัก	เอธานอล 95%	6.80	9.42
รางจืด	น้ำ	5.53	24.40
ลำโพงขาว (ใบ)	เอธานอล 50%	5.97	9.80
	เอธานอล 95%	5.89	9.54
หญ้าลิ้นงู (ทั้งต้น)	เอธานอล 50%	5.97	11.84
	เอธานอล 95%	5.89	11.65
หูกวาง (ใบ)	น้ำ	6.60	33.46
	เอธานอล 50%	4.88	6.73
	เอธานอล 95%	4.92	4.46

พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษสูง (มีค่า LC_{50} < 2 ml/l) ได้แก่ กระชายม่วง สกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 0.92 ml/l) สกัดด้วยเอธานอล 95% (LC_{50} = 0.94 ml/l) กระเทียมสกัดด้วยเอธานอล 95% (LC_{50} = 1.83 ml/l) และเทียนตาตั๊กแตนสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 1.65 ml/l) เอธานอล 95% (LC_{50} = 1.09 ml/l) ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษต่ำ (มีค่า LC_{50} > 30 ml/l) ได้แก่ ผลมะระขี้นกสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 32.63 ml/l) และใบหูกวางสกัดด้วยน้ำ (LC_{50} = 33.46 ml/l)

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่มีมาก่อน ดังนี้ กิติวรรณ (2545) รายงานว่า ทำการทดความเป็นพิษของสารสกัดกระเทียมและใบหูกวางต่อลูกปลานิล พบว่า กระเทียมมีความเป็นพิษรุนแรงกว่าใบหูกวาง เนื่องจากทำให้ปลาตาย 50% มีค่า LC_{50} 2 h เท่ากับ 2,259.44 และ LC_{50} 6 h เท่ากับ 46,665.94 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษกระเทียมและใบหูกวางเช่นกัน แต่ทำการทดสอบต่อลูกกุ้งก้ามกราม ซึ่งพบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล (LC_{50} 96 h = 1.83 – 2.84 ml/l) มีระดับความเป็นพิษสูงกว่าใบหูกวาง (LC_{50} 96 h = 4.46 – 6.73 ml/l) ตามลำดับ

Vidal และคณะ (2003) รายงานผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดผลทับทิมต่อลูกไก่ น้ำหนัก 18-22กรัม ว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 mg ไม่เป็นพิษต่อลูกไก่ 1 ตัว และได้ฉีดสารสกัดผลทับทิมเข้าช่องท้อง (LD_{50}) ปริมาณ 0.4 และ 1.2 mg/kg ของสารสกัด พบว่า ไม่เป็นพิษต่อลูกไก่ แต่จากงานวิจัย พบว่า สารสกัดเปลือกทับทิมด้วยเอธานอลมีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งค่อนข้างสูง (LC_{50} 96 h = 2.93 – 4.35 ml/l) แต่สารสกัดด้วยน้ำมีความเป็นพิษต่ำกว่ามาก (LC_{50} 96 h = 16.35 ml/l)

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรอื่นต่อกุ้ง ดังนี้ สถาพรและคณะ (2539ก) รายงานว่าสารสกัดมะยมด้วยเอธานอล ที่ความเข้มข้น 1,987-3,548 ppm มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งกุลาดำ PL15 ระดับต่ำ เต็มดวง (2540) รายงานว่า สารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วยเอธานอล มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* ที่ค่า MIC เท่ากับ 16 ppm และที่ความเข้มข้น 688 ppm มีความเป็นพิษต่อลูกกุ้งกุลาดำ PL20 ระดับต่ำ สำหรับ Battinelli et al. (2001) รายงานว่าค่าความเป็นพิษของสารสกัด *Epilobium spp.* ด้วยเอธานอลต่อนอเพลียสของอาร์ทีเมียหลังฟัก 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 325 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีพิษต่ออาร์ทีเมีย LC_{50} 96 h เท่ากับ 9.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่ Fai and S.O. Fagade (2005) รายงานว่า ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดยางสลัดไดแห้งที่สกัดด้วยน้ำต่อลูกปลานิล โดยหาค่า LC_{50} 96 h พบว่าที่ความเข้มข้น 0.08 กรัม/ลิตร ลูกปลามีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.125 กรัม/ลิตร มี

อัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 24 ชั่วโมง จากการคำนวณค่า Probit method พบว่าค่า LC_{50} 96 h เท่ากับ 0.022 กรัม/ลิตร ส่วน Singh and Ajay (2005) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อลูกปลาชะโด โดยใช้สมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ สลัดได สบู่แดง ยี่โถ และรำเพย ซึ่งใช้ส่วนที่เป็นยางนำมาทำไลโอฟีไลส์ ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้เป็นผง และสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม พบว่า ยี่โถมีความเป็นพิษระดับสูงต่อปลาชะโดมากที่สุด รองลงมา คือ สลัดได รำเพย และสบู่แดง มีค่า LC_{50} 24 h เท่ากับ 19.8, 21, 146 และ 1316 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการสังเกตลักษณะอาการและพฤติกรรมของลูกกุ้งก้ามกราม PL15 ที่ตอบสนองต่อสารสกัดสมุนไพร ซึ่งน่าจะมาจากความเป็นพิษของสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพร ทั้ง 19 ชนิด มีดังนี้

กระชายม่วงมีสาร 5, 7-ไดเมธอกซีฟลาโวน (5, 7-DMF) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดเลือดขาว และการสังเคราะห์โปรตีน (จำรัสและมนตรี, 2545) จากการทดสอบ พบว่ากุ้งทดลองได้รับสารสกัดกระชายม่วงที่ความเข้มข้นสูง มีอาการกระสับกระส่าย ตัวซีด ไม่กินอาหาร และตายในที่สุด

กระเทียมมีสารสำคัญ คือ เอ็นไซม์อัลลิเนส (Alliinase) สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์กำมะถันอัลลิซิน (allicin) ให้เป็นน้ำมันหอมระเหยอัลลิซิน ทำให้กระเทียมมีกลิ่นหอมฉุน เผ็ดร้อน (สุพจน์, 2543) จากการทดลอง พบว่า กุ้งทดลองที่ได้รับสารสกัดกระเทียมสดที่ความเข้มข้นสูง มีอาการลอยอยู่ผิวน้ำ เครียด กระสับกระส่าย กล้ามเนื้ออ่อนเพลียและเริ่มตาย มีสีขาวขุ่น เปลือกอ่อน และตายในที่สุด

ส่วน ขาเขียวญี่ปุ่น ทับทิม และหูกวาง มีสารประกอบส่วนใหญ่ เป็นแทนนิน ซึ่งสารชนิดนี้จะไปยับยั้งการเกิดเอ็นไซม์ที่ช่วยย่อยอาหาร เช่น โปรตีเนส (proteinases) ไลเปส (lipase) เป็นต้น (ศิรินยา, 2547) จากการทดสอบ พบว่า กุ้งทดลองที่ได้รับสารสกัดใบหูกวาง เปลือกทับทิม และขาเขียวญี่ปุ่นที่ความเข้มข้นสูง มีอาการกระสับกระส่าย ลอยอยู่ผิวน้ำ กระโดด ไม่กินอาหาร และ ตายในที่สุด

สำหรับชะพลูมีสารออกซาเลท (oxalate) ซึ่งสารชนิดนี้ทำให้การสะสมแคลเซียมในร่างกายลดลง (รุ่งระวี, 2536) จากการทดสอบ พบว่ากุ้งทดลองที่ได้รับสารสกัดใบชะพลูที่ความเข้มข้นสูง มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนเพลียและเริ่มตาย มีสีขาวขุ่น เปลือกอ่อน และตายในที่สุด

เทียนตาตั๊กแตนมีน้ำมันหอมระเหย 1.2-7.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นสารคาร์โวน (carvone) สารไดไฮโดรคาร์โวน (dihydrocarvone) และสารดี-ลิโมนิน (d-

limonene) นอกจากนี้ยังมีสารดิลลาโนไซด์ (dillanoside) สารประเภทกรดฟีโนลิค (phenolic acid) มีฤทธิ์เป็นยาสลบ (ขยันต์และวิเชียร, 2547) จากการทดสอบ พบว่ากุ้งทดลองได้รับสารสกัดเทียนตาตั๊กแตนที่ความเข้มข้นสูง มีอาการอ่อนเพลีย เริ่มนอนก้นโหลลักษณะคล้ายสลบ และตายในที่สุด

ลำโพงขาวมีสารสำคัญ คือ อัลคาลอยด์ 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ จำพวกโทรเปน (tropane) ได้แก่ hyoscine และ hyscyamine ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มีคุณสมบัติเป็นด่าง มีฤทธิ์ผ่อนคลายกล้ามเนื้อเรียบและกดประสาท ทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อผิดปกติ วิกลจริต ปวดศีรษะ ความรู้สึกสับสน (ถนอมศรี, 2538) จากการทดสอบ พบว่ากุ้งทดลองที่ได้รับสารสกัดใบลำโพงขาวที่ความเข้มข้นสูง มีอาการกระสับกระส่าย ว่ายน้ำวน กระโดด ลอยอยู่ผิวน้ำ และตายในที่สุด เนื่องจากขาดออกซิเจน

มะระขี้นกมีสาร Saponin มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เขย่ากับน้ำให้ฟองรูปรวงผึ้งซึ่งคงตัวอยู่ได้นาน (พรสวรรค์, 2543) จากการทดสอบ พบว่า กุ้งทดลองที่ได้รับสารสกัดใบและผลมะระขี้นกที่ความเข้มข้นสูง มีอาการกระสับกระส่าย ลอยอยู่ผิวน้ำ ไม่กินอาหาร ตัวซีด และตายในที่สุด

ส่วนมะระหวานมีวิตามินซี แคลเซียม และฟอสฟอรัสสูง (พรสวรรค์, 2543) จากการทดสอบ พบว่ากุ้งทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะระหวานที่ความเข้มข้นสูง มีอาการลอยอยู่ผิวน้ำ กระสับกระส่าย ไม่กินอาหาร และตายในที่สุด

หญ้าลิ้นงูมีสาร triterpenes, sterols, lactone, phenols, flavone และ fatty acid เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสาร phenols เป็นสารทำให้อาการผิวหนังบวมแดง พองเป็นตุ่มน้ำใส อาจลุกลามรุนแรงเป็นโรคผิวหนังเรื้อรัง (สำลีและคณะ, 2542) จากการทดสอบ พบว่ากุ้งทดลองได้รับสารสกัดหญ้าลิ้นงูที่ความเข้มข้นสูง ทำให้แสดงอาการกระสับกระส่าย ลอยอยู่ผิวน้ำ และตายในที่สุด

2.3 สารสกัดสมุนไพรและความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม

การนำสารสกัดสมุนไพรไปใช้ในการรักษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม ต้องนำค่า MIC MBC และความเป็นพิษต่อลูกกุ้ง มาประมวลเพื่อกำหนดความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการรักษา

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษานำร่องการใช้สารสกัดสมุนไพรไทยเพื่อรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกราม โดยได้เลือกสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดเปลือกทับทิม ใบหูกวาง กระเทียมสด ขาเขียว และใบชะพลู เนื่องจากสารสกัดเหล่านี้มีประสิทธิภาพ (MIC/MBC) ของการกำจัดเชื้อ *A. hydro-phila* สูง และมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำในระดับต่ำ นอกจากนี้ที่สำคัญ คือ จากการสืบค้นในฐานข้อมูลต่างๆ สมุนไพรไทยทั้ง 5 ชนิดยังไม่มีรายงานถึงสารตกค้างและสารอันตราย

ได้นำสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการแช่ และโดยวิธีผสมอาหารให้กิน

กำหนดความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในการแช่รักษา จากค่า MIC MBC และ LC_{50} โดยตามทฤษฎีความเข้มข้นที่จะได้ผลการรักษาที่ดี ค่าต่างควรจะเป็น MIC <MBC < LC_{50} อย่างไรก็ตาม ได้กำหนดค่าความเข้มข้นที่จะใช้ทดสอบให้ครอบคลุมค่าความเข้มข้นทั้งสาม ดังตัวอย่างเช่น

สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล 50%

	LC50 <	MIC <	MBC	
ความเข้มข้นที่ทดสอบได้	2.83	5	10	ml/l
ความเข้มข้นที่ทดลองใช้รักษา	3	5	10	ml/l

จะใช้ความเข้มข้นข้างต้นนี้ในการทดสอบใช้สารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนี้ เพื่อรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยการแช่และการกินในขั้นตอนต่อไป

ผลการวิจัยปีที่ 3

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการแช่

ทำการทดสอบโดยใส่เชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ในตู้ทดลองเป็นปริมาณ 10^8 cells/ml ใช้ลูกกุ้งสุขภาพแข็งแรง ขนาด 4 - 6 g กลุ่มทดลองประกอบด้วย

1) ชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อ

2) ชุดควบคุมใส่เชื้อและไม่ใส่ยาหรือสารสกัดสมุนไพร

3) ชุดควบคุมใส่เชื้อและแช่รักษาด้วยยาปฏิชีวนะ oxytetracycline 0.01 ppt

4) ชุดทดลองใส่เชื้อและแช่รักษาด้วยสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 1

5) ชุดทดลองใส่เชื้อและแช่รักษาด้วยสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 2 และ

6) ชุดทดลองใส่เชื้อและแช่รักษาด้วยสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 3

ชุดทดลองที่ 3-6 แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใส่เชื้อแบคทีเรีย แล้วใส่สารสกัดสมุนไพรตามทันที ส่วนกลุ่มที่ 2 ใส่เชื้อไป 6 ชั่วโมงจึงใส่สารสกัดสมุนไพรลงไป ทำการสังเกตและบันทึกอัตราการรอดตายทุก 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ทดสอบจำนวนเซลล์เลือดและจำนวนแบคทีเรียในกระแสเลือด

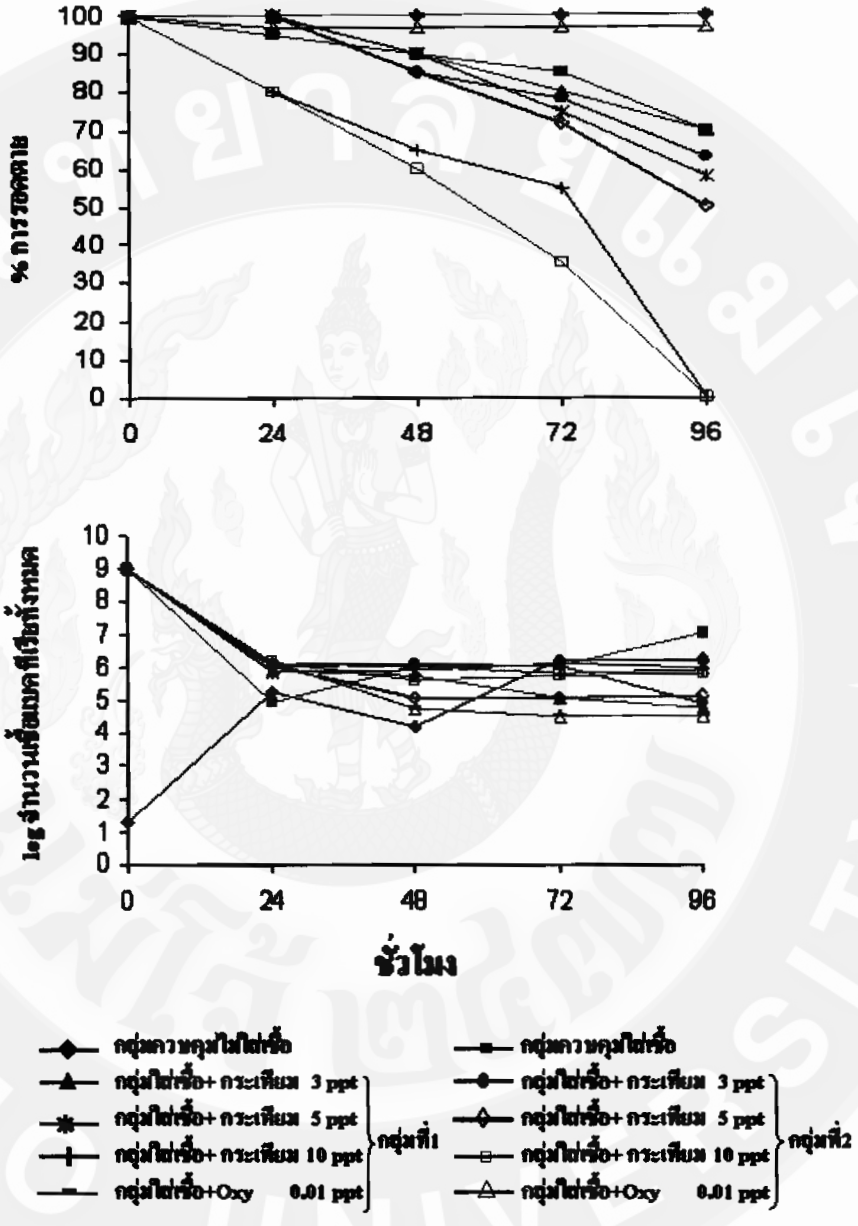
ผลการรักษาโดยวิธีแช่ สารสกัดสมุนไพร 5 ชนิด ด้วยเอธานอล 50% ได้แก่ กระเทียม(หัวสด) ชะพลู(ใบ) ชาเขียว(ใบ) ทับทิม(เปลือกผล) และหูกวาง(ใบ) ดังภาพที่ 19 – 23 ตามลำดับ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการแช่ พบว่า อัตราการตายและจำนวนแบคทีเรียในน้ำ ที่ 0 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลองทั้งหมด

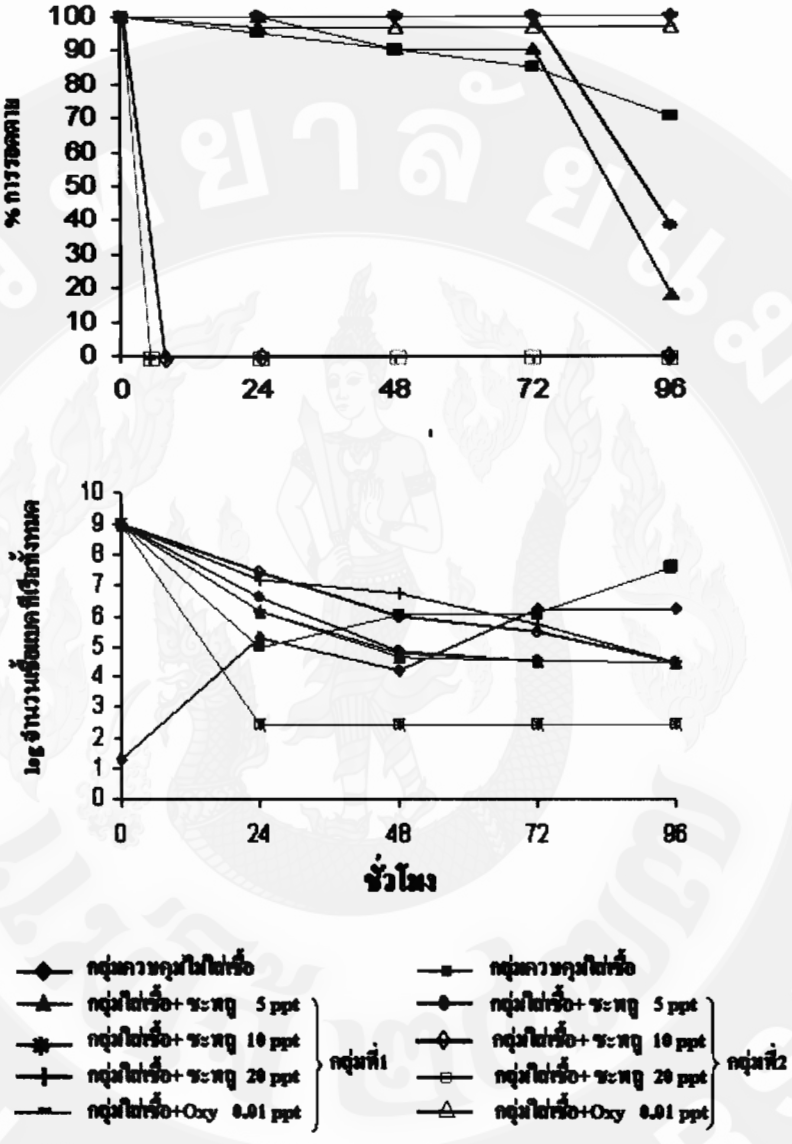
ในชั่วโมงที่ 24 สังเกตได้ชัดว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียในชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ มีความแตกต่างกันกับชุดทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีจำนวนเชื้อแอโรโมแนสเฉลี่ย 1.36×10^4 cfu/plate ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมใส่เชื้อและไม่ใส่สมุนไพร ชุดควบคุมใส่เชื้อและใส่ยา oxytetracycline กลุ่มที่ 1 และ 2 ชุดทดลองใส่เชื้อและสารสกัดใบหูกวาง ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 40 ml/l กลุ่มที่ 1 และ 2 ชุดทดลองใส่เชื้อและสารสกัดเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 4, 9 และ 15 ml/l กลุ่มที่ 1 และ 2 ชุดทดลองใส่เชื้อและสารสกัดกระเทียมสด ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 ml/l

ชุดทดลองใส่เชื้อและสารสกัดชาเขียวญี่ปุ่น ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 25 ml/l กลุ่มที่ 1 และ 2 และชุดทดลองใส่เชื้อและสารสกัดใบชะพลู ที่ความเข้มข้น 5, 20 และ 30 ml/l กลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งมีจำนวนเชื้อแอโรโมแนส เท่ากับ $1.4x10^2$, $1.56x10^4$, $9.17x10^5$, $9.42x10^5$, $6.32x10^5$, $4.25x10^5$, $3.72x10^4$, $3.6x10^4$, $5.05x10^5$, $5.92x10^5$, $3.47x10^5$, $4.15x10^5$, $3.6x10^5$, $3.1x10^5$, $8.9x10^5$, $1.12x10^6$, $7.35x10^5$, $1.14x10^6$, $1.28x10^6$, $1.44x10^6$, $8.9x10^5$, $1.11x10^6$, $7.35x10^5$, $1.14x10^6$, $1.27x10^6$, $1.43x10^6$, $1.55x10^6$, $3.95x10^6$, $2.81x10^7$, $2.49x10^7$, $1.55x10^7$ และ $2.97x10^7$ cfu/plate ตามลำดับ

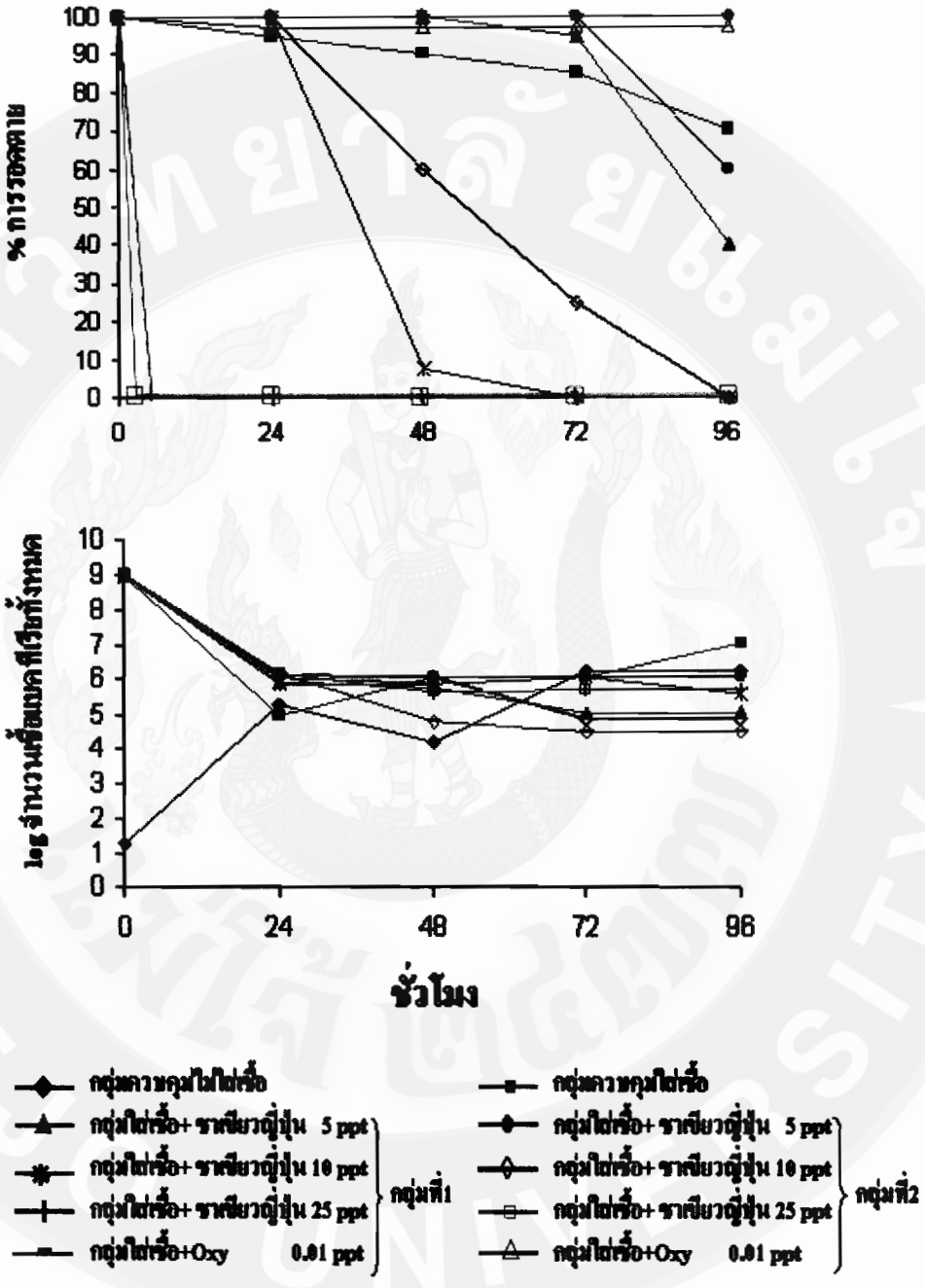
ในชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 พบว่า ชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อ ชุดควบคุมใส่เชื้อและไม่ใส่สมุนไพร ชุดควบคุมใส่เชื้อและใส่ oxytetracycline ชุดทดลองใส่เชื้อและสารสกัดสมุนไพร กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งกลุ่มควบคุมใส่เชื้อไม่ใส่สมุนไพร มีจำนวนเชื้อแอโรโมแนสในน้ำมากที่สุด ($1.87x10^7$ cfu/plate) ส่วนชุดทดลองที่รักษาด้วย oxytetracycline พบว่า สามารถควบคุมปริมาณเชื้อแอโรโมแนสในน้ำได้ดีกว่าชุดควบคุมใส่เชื้อไม่ใส่สมุนไพร ชุดทดลองใส่เชื้อใส่สารสกัดใบหูกวาง ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 40 ml/l สารสกัดเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 4, 9 และ 15 ml/l สารสกัดกระเทียมสด ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 10 ml/l สารสกัดชาเขียวญี่ปุ่น ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 25 ml/l และสารสกัดใบชะพลู ที่ความเข้มข้น 5, 20 และ 30 ml/l สามารถควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าชุดควบคุมใส่เชื้อและใส่ยา oxytetracycline



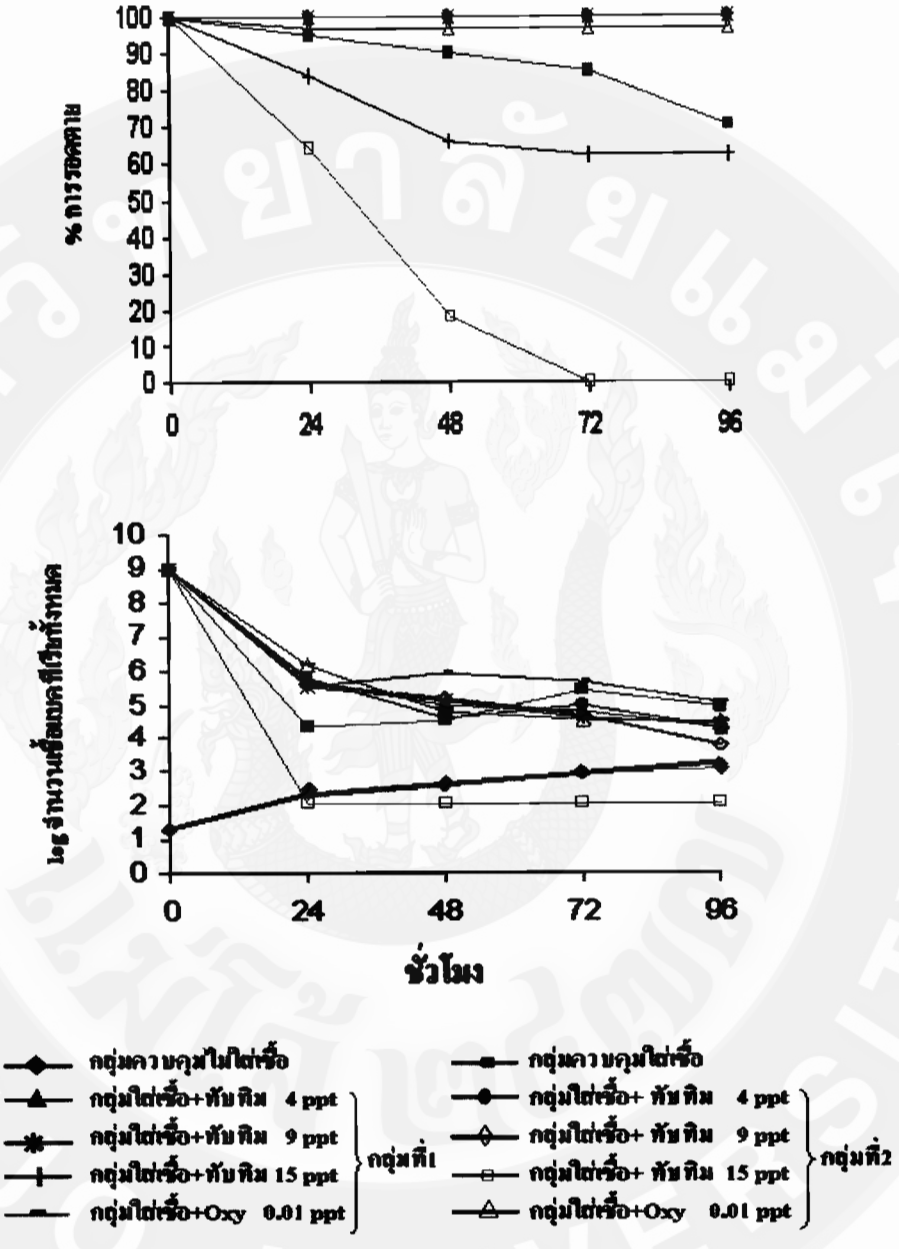
ภาพที่ 19 อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดกระเทียมด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่



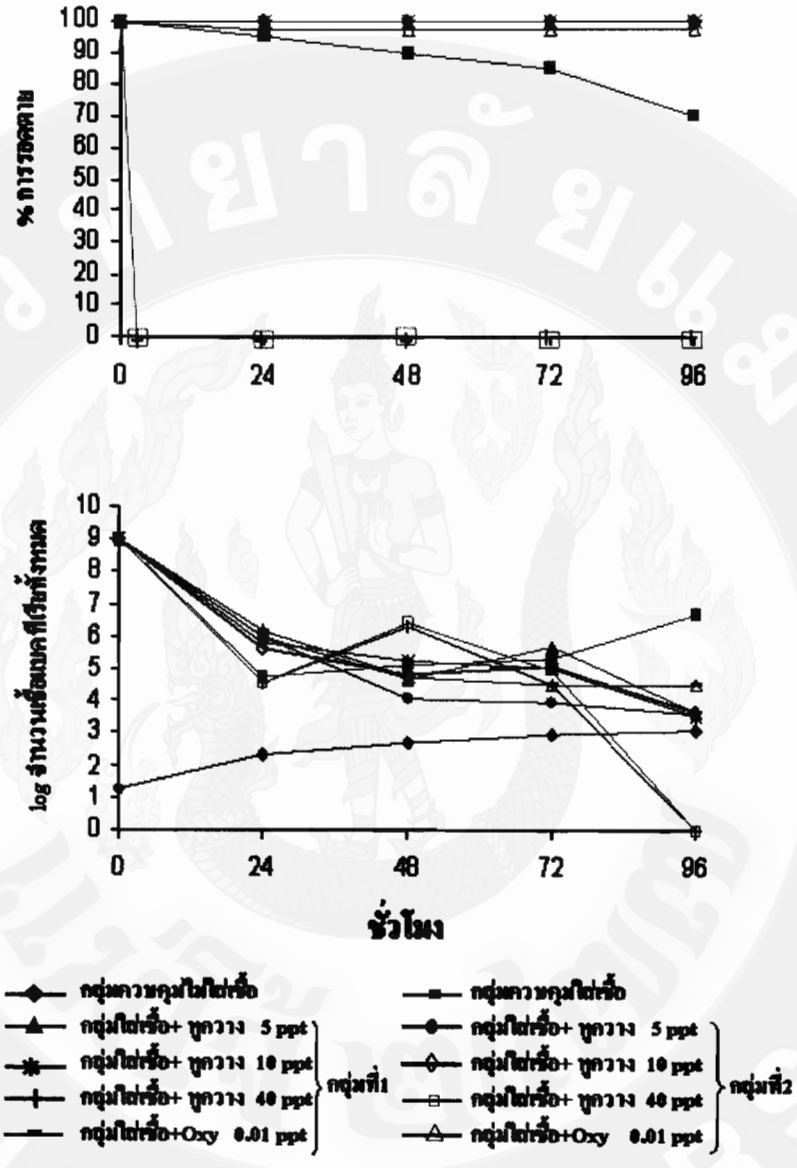
ภาพที่ 20 อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดใบชะพลูด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่



ภาพที่ 21 อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดใบชาเขียวด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่



ภาพที่ 22 อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่



ภาพที่ 23 อัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำ เมื่อใช้สารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50% รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการแช่

3.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรไทยที่จะใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกรามโดยการแช่

ในการใช้สารสกัดกระเทียมสดรักษาเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้ง ที่ความเข้มข้น 3 และ 5 ml/l พบว่า กุ้งเริ่มมีอาการเนื้อขาว เบื่ออาหารหลังจากแช่ 6 ชั่วโมง และตายหมดภายใน 21 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดี จำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 3 และ 5 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการแช่สั้น ส่วนที่ความเข้มข้น 10 ml/l มีผลให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำลดลง แต่กุ้งเริ่มมีอาการเนื้อขาว เบื่ออาหารหลังจากแช่ 2 ชั่วโมง และตายหมดภายใน 6 ชั่วโมง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 10 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการจุ่ม

ในการใช้สารสกัดใบชะพลูรักษาเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้ง ที่ความเข้มข้น 5 ml/l สามารถกำจัดเชื้อได้ดี จำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง แต่กุ้งมีอาการเครียด เริ่มมีอาการเนื้อขาว เบื่ออาหารหลังจากแช่ภายใน 24 ชั่วโมง และตายหมดภายใน 48 ชั่วโมง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 5 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการแช่สั้น ส่วนที่ความเข้มข้น 20-30 ml/l มีผลให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง แต่กุ้งเริ่มมีอาการเนื้อขาว เบื่ออาหารหลังจากแช่ภายใน 30 นาที และตายหมดภายใน 2 ชั่วโมง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 20-30 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการจุ่ม

ในการใช้สารสกัดขาเขียวญี่ปุ่นรักษาเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้ง ที่ความเข้มข้น 5 และ10 ml/l สามารถกำจัดเชื้อได้ดี จำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง แต่กุ้งมีอาการเครียด ภายใน 24 ชั่วโมงแรก และทยอยตายในชั่วโมงที่ 25 ดังนั้นที่ความเข้มข้น 5-10 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการแช่สั้น ส่วนที่ความเข้มข้น 25 ml/l มีผลให้จำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง แต่กุ้งเริ่มมีอาการเนื้อขาว กระสับกระ-ส่ายภายใน 30 นาที และตายหมดภายใน 3 ชั่วโมง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 25 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการจุ่ม

ในการใช้สารสกัดเปลือกทับทิมรักษาเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้ง ที่ความเข้มข้น 4 และ 9 ml/l พบว่า กุ้งรอดตายทั้งหมด มีอาการปกติ ไม่เครียด ตลอดระยะเวลา 96 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อได้ดี จำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 4-9 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการแช่ยาว ส่วนที่ความเข้มข้น 15 ml/l กุ้งเริ่มมีอาการเนื้อขาว เบื่ออาหาร หลังจากแช่ 48 ชั่วโมง ตายหมดภายใน 72 ชั่วโมง และจำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นที่ความเข้มข้น 15 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการแช่สั้น

ส่วนการใช้สารสกัดใบหูกวางรักษาเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้ง ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 ml/l พบว่า กุ้งรอดตายทั้งหมด มีอาการปกติ ไม่เครียด และจำนวนแบคทีเรียในน้ำลดลง ดังนั้น

ที่ความเข้มข้น 5-10 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการแช่ยาว ส่วนที่ความเข้มข้น 40 ml/l กุ้งเริ่มมีอาการเครียดสูง ลำตัวมีสีคล้ำ และตายหมดภายใน 1 ชั่วโมง ดังนั้นที่ความเข้มข้น 40 ml/l เหมาะสมที่จะใช้รักษาโดยการจุ่ม

ดังนั้นสามารถสรุปการใช้สารสกัดเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทย 5 ชนิดนี้ ในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกราม โดยการแช่ ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แนวทางการใช้สารสกัดด้วยเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทย โดยวิธีการแช่รักษาโรคแอโรโมแนส (MAS) ในกุ้งก้ามกราม

สมุนไพร	ความเข้มข้น (ml/l)	วิธีการรักษา	ระยะเวลาการรักษา
กระเทียม (หัว)	3 - 5	แช่สั้น	6 ชม.
	10	จุ่ม	1 - 5 นาที
ชะพลู (ใบ)	5	แช่สั้น	6 ชม.
	20 - 30	จุ่ม	1 - 5 นาที
ขาเขียว (ใบ)	5 - 10	แช่สั้น	6 ชม.
	25	จุ่ม	1 - 5 นาที
ทับทิม (เปลือกผล)	4 - 9	แช่ยาว	ตลอด
	15	แช่สั้น	24 ชม.
หูกวาง (ใบ)	5 - 10	แช่ยาว	ตลอด
	40	จุ่ม	1 - 5 นาที

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการรักษาโรคติดเชื้อ *A. hydrophila* ในกุ้งก้ามกราม โดยวิธีการกิน

การรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกิน ทำโดยการเคลือบอาหารด้วยสมุนไพร ดังนี้ สารสกัดกระเทียมสด ปริมาตร 3, 5 และ 10 ml /อาหาร 100 g สารสกัดเปลือกทับทิม ปริมาตร 4, 9 และ 15 ml/อาหาร 100 g สารสกัดชาเขียวญี่ปุ่น ปริมาตร 5, 10 และ 25 ml /อาหาร 100 g สารสกัดใบชะพลู ปริมาตร 5, 20 และ 30 ml /อาหาร 100 g ปรับปริมาตรที่ใช้เคลือบเท่ากับ 10 ml/อาหาร 100 g และสารสกัดใบหูกวาง ปริมาตร 5, 10 และ 40 ml /อาหาร 100 g

ใส่เชื้อ *A. hydrophila* ในตู้ทดลองเป็นปริมาณ 10^8 cells/ml กลุ่มทดลองประกอบด้วย

1) ชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อและได้รับอาหารปกติ

2) ชุดควบคุมใส่เชื้อและได้รับอาหารปกติ

3) ชุดควบคุมใส่เชื้อ ได้รับอาหารเคลือบ oxytetracycline 0.1 g

4)-6) ชุดทดลองใส่เชื้อ ได้รับอาหารเคลือบสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

สังเกตอัตราการรอดตาย และพฤติกรรมของกุ้ง เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทดสอบจำนวนเซลล์เลือดและจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 24 – 28)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกิน พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 1 วันที่ 0 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแอโรแนสในน้ำเลือดและเซลล์เลือดกุ้งในทุกกลุ่มทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

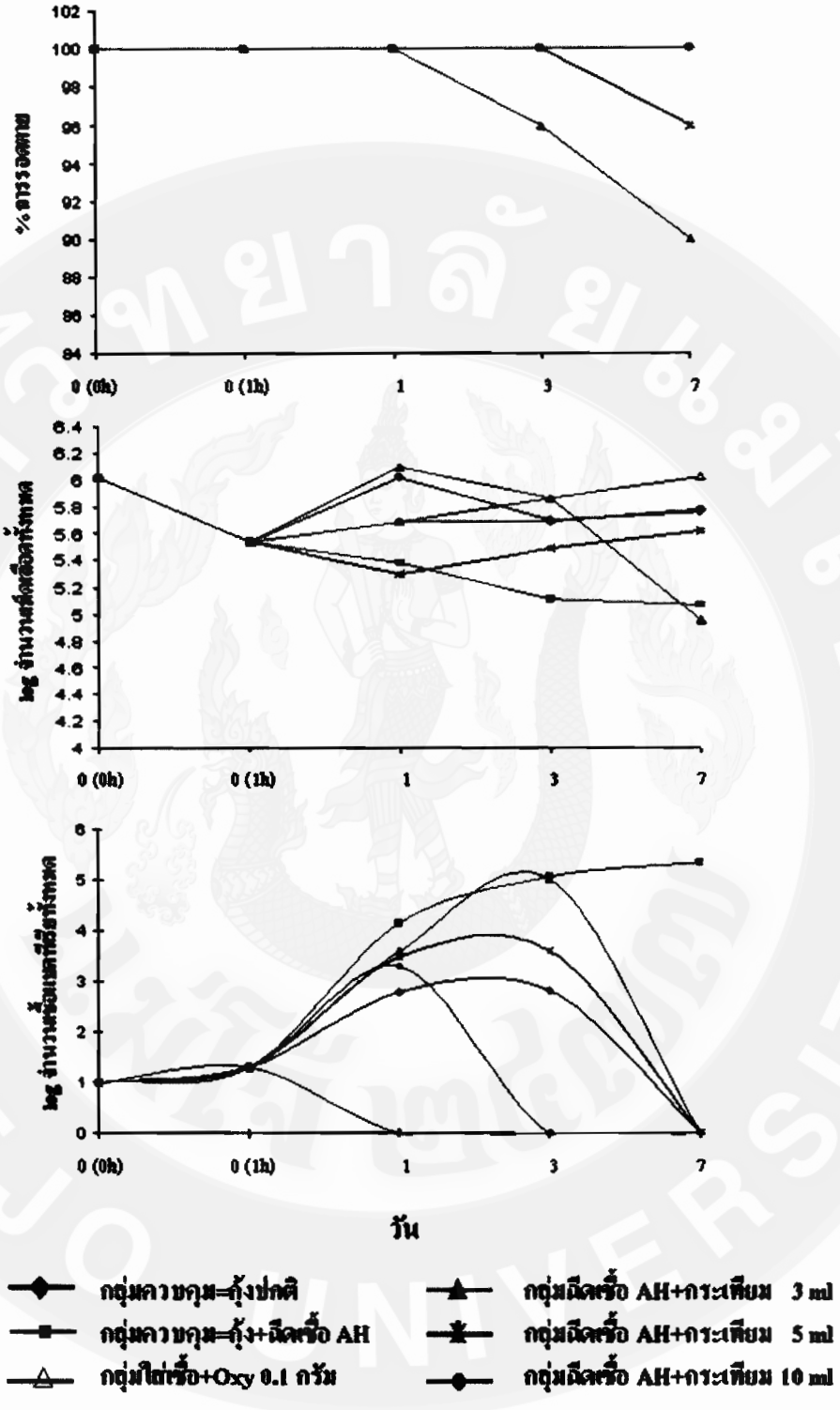
ในวันที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ในน้ำเลือดของกุ้งทดลองแต่ละชุดการทดลอง พบว่าในชุดควบคุมฉีดเชื้อและให้กินอาหารเคลือบด้วย oxytetracycline และชุดทดลองให้กินอาหารเคลือบด้วยทับทิม ที่ปริมาตร 9 และ 15 ml/อาหาร 100 g ไม่มีแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง และทั้งสองชุดทดลองนี้เทียบกับชุดทดลองอื่นๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยชุดทดลองให้กินอาหารเคลือบด้วยชะพลู ที่ปริมาตร 3 และ 20 ml/อาหาร 100 g พบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแอโรโมแนสในน้ำเลือดปริมาณมากที่สุด ดังนั้น มีแนวโน้มว่าสารสกัดเปลือก

ทับทิม มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสได้ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ และชะพลูมีประสิทธิภาพต่ำในการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนส

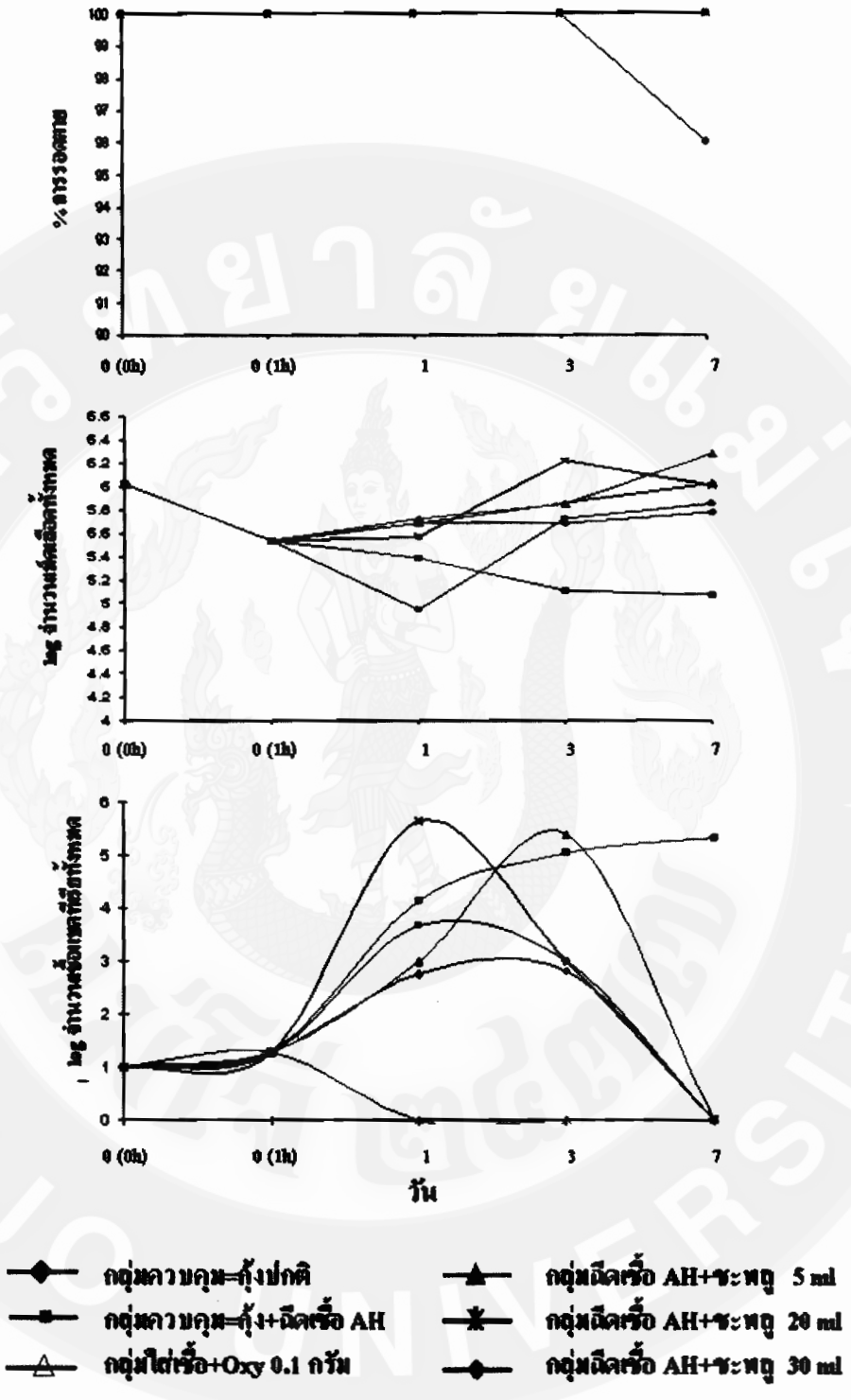
ในวันที่ 3 พบว่าชุดชุดควบคุมให้กินอาหารเคลือบ oxytetracycline มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดน้อยที่สุด มีความแตกต่างกับชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ และชุดควบคุมฉีดเชื้อได้รับอาหารปกติ มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด

ในวันที่ 7 พบว่าชุดควบคุมให้กินอาหารเคลือบ oxytetracycline ชุดทดลองให้กินอาหารเคลือบสารสกัดชะพลู ที่ปริมาตร 5, 20 และ 30 ml/อาหาร 100 g สารสกัดกระเทียมสด ที่ปริมาตร 3, 5 และ 10 ml/อาหาร 100 g สารสกัดขาเขียวญี่ปุ่น ที่ปริมาตร 5, 10 และ 25 ml/อาหาร 100 กรัม สารสกัดใบหูกวาง ที่ปริมาตร 5, 10 และ 40 ml/อาหาร 100 g และสารสกัดเปลือกทับทิม ที่ปริมาตร 4, 9 และ 15 ml/อาหาร 100 g ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อได้รับอาหารปกติ และชุดควบคุมฉีดเชื้อได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

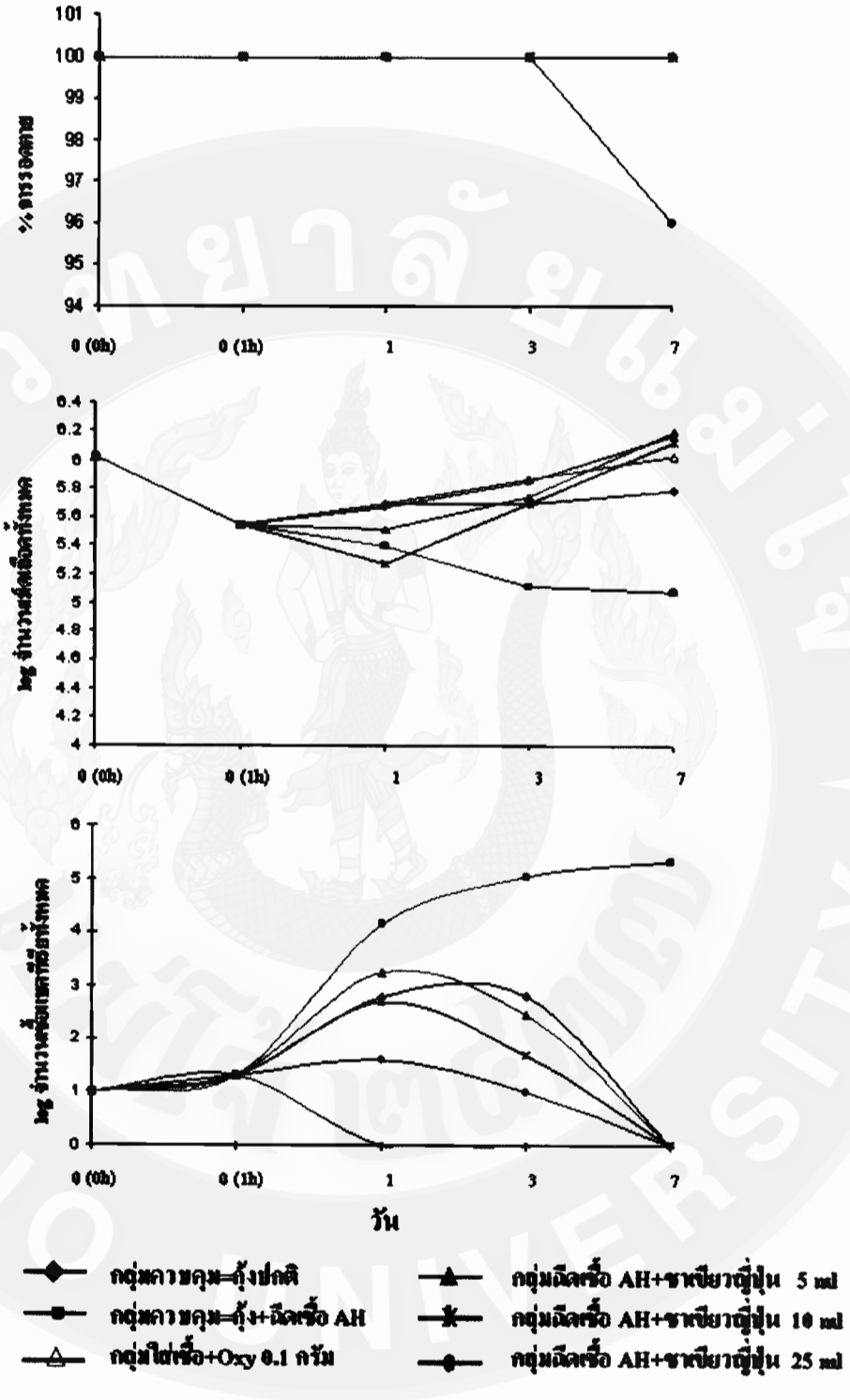
จะเห็นได้ว่า ชุดทดลองให้กุ้งกินอาหารเคลือบ oxytetracycline ในวันที่ 1 กุ้งกินอาหารเคลือบด้วยทับทิม ที่ปริมาตร 9 และ 15 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดเชื้อแอโรโมแนส ส่วนในวันที่ 3 กุ้งกินอาหารเคลือบ oxytetracycline ประสิทธิภาพสูงสุดในการลดเชื้อแอโรโมแนส และในวันที่ 7 กุ้งกินอาหารที่เคลือบด้วยกระเทียมสด ทับทิม หูกวาง ขาเขียวญี่ปุ่น และชะพลู มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกุ้งกินอาหารเคลือบด้วยยาปฏิชีวนะ



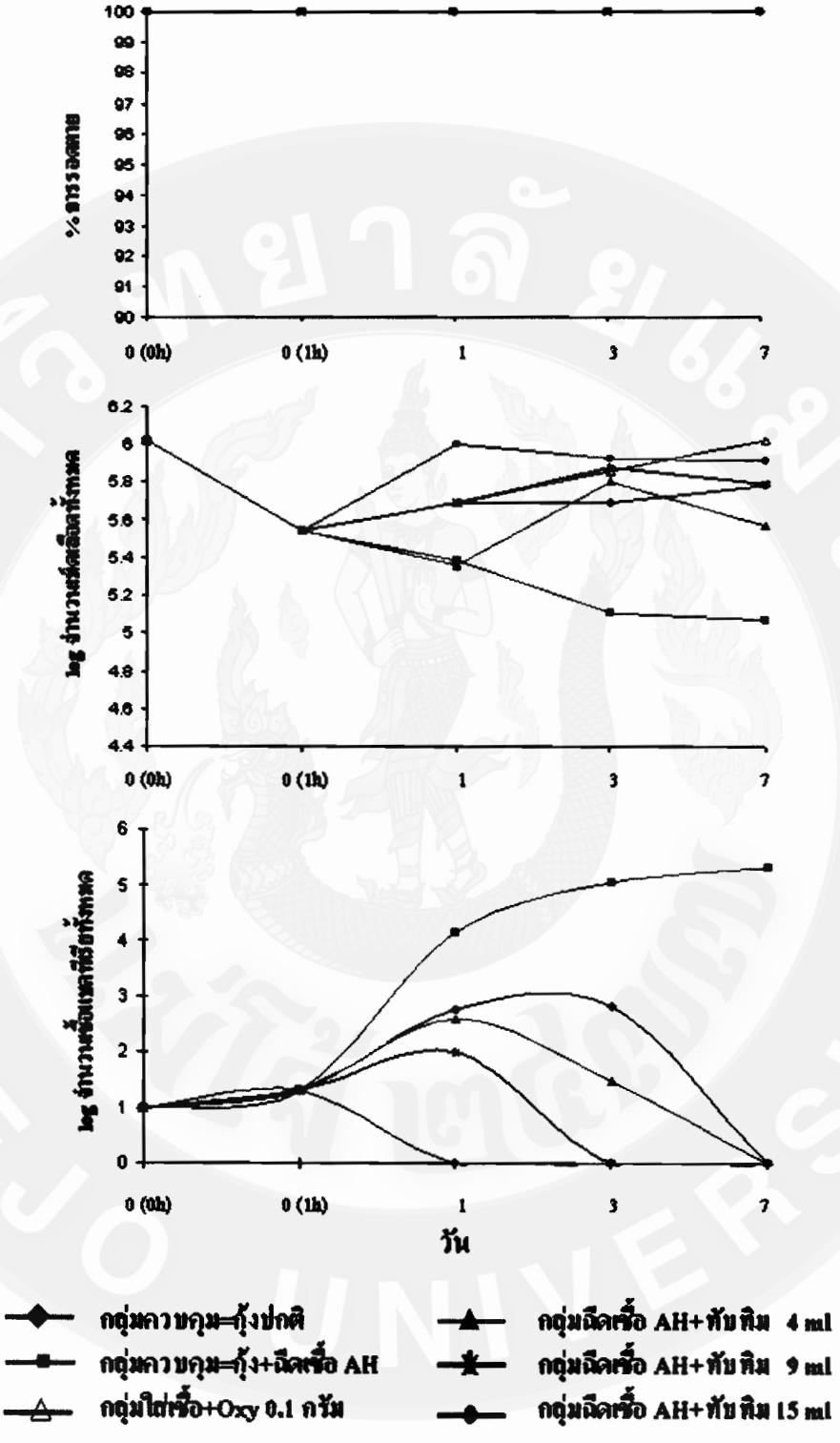
ภาพที่ 24 อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดกระเทียมสดด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน



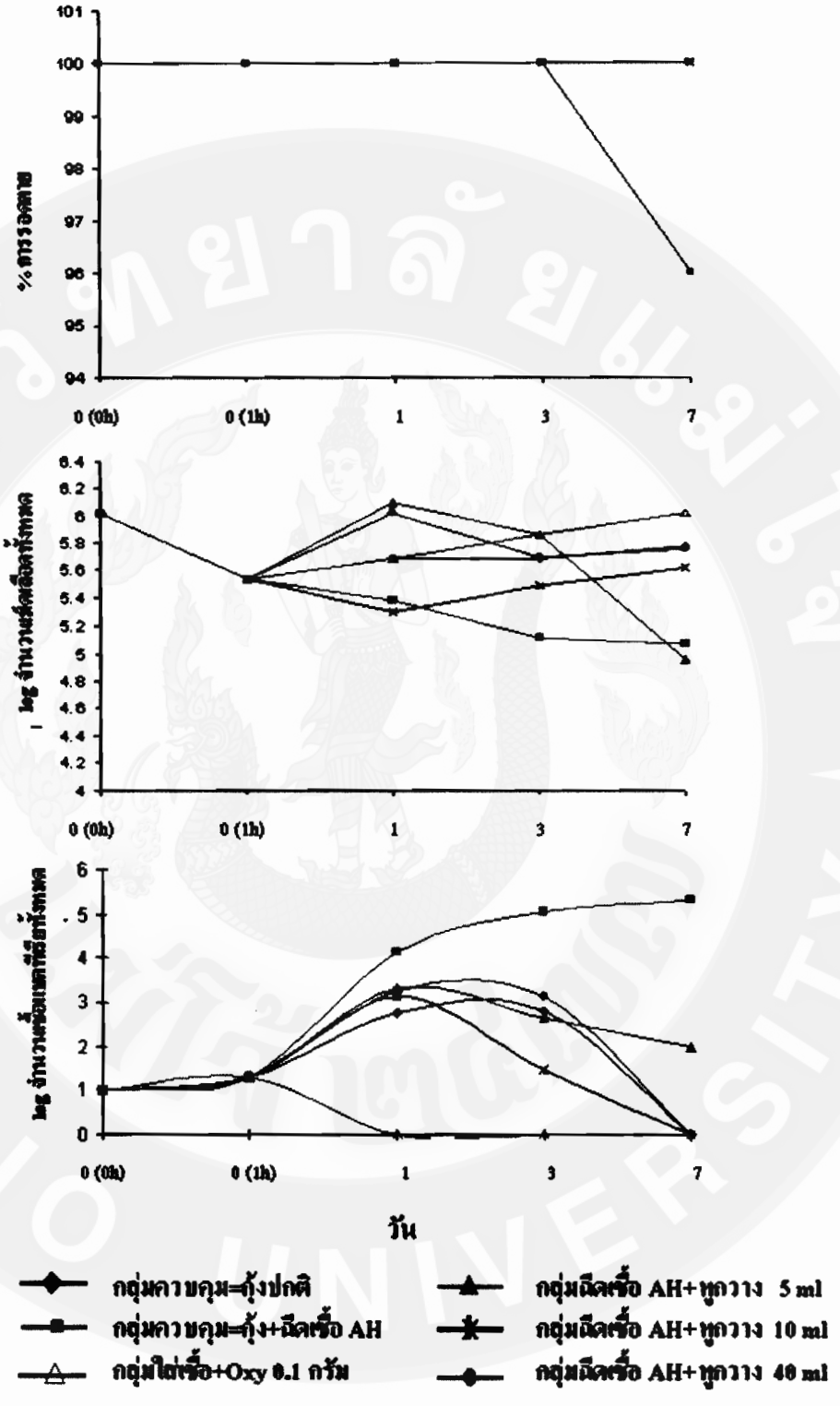
ภาพที่ 25 อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดใบชะพลูด้วยเอธานอล 50 %รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน



ภาพ 26 อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดชาเขียวญี่ปุ่นด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน

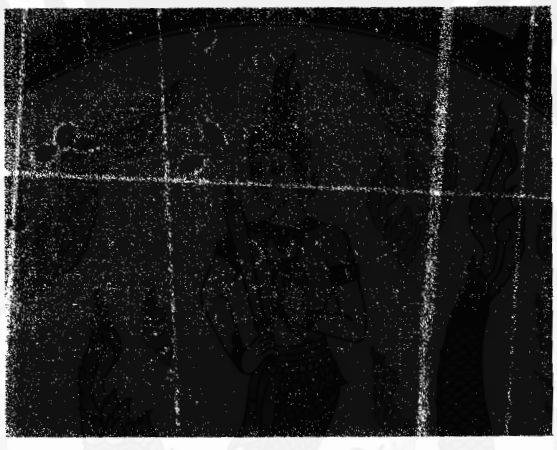


ภาพที่ 27 อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน



ภาพที่ 28 อัตรารอดตาย จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกราม และจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเลือด เมื่อใช้สารสกัดใบหูกวางด้วยเอธานอล 50 % รักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสโดยวิธีการกิน

จากการตรวจนับเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม พบว่า เซลล์เลือดของกุ้งแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนต่างกัน และ จำแนกตามลักษณะรูปร่าง ได้ 3 ชนิด คือ รูปกลม รูปไข่ และรูปกระสวย ดังแสดงผลในภาพที่ 23



ภาพที่ 29 ลักษณะรูปร่างเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม
A: เซลล์รูปไข่ คือ granulocyte
B: เซลล์รูปกระสวย คือ semi-granulocyte
C: เซลล์รูปกลม คือ hyalinocyte

จากการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เลือด (ตารางที่ 13 และภาพที่ 30-32) พบว่า ในวันที่ 1 จำนวนเซลล์เลือดแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อมีจำนวนเซลล์เลือดมากที่สุด อาจเนื่องมาจากกุ้งในกลุ่มนี้ไม่ได้รับความเครียด เพราะไม่มีการฉีดเชื้อ และกินอาหารปกติ สุขภาพจึงแข็งแรง และพบว่า กุ้งที่กินอาหารเคลือบสารสกัดใบชะพลู ที่ปริมาตร 30 ml/อาหาร 100 g มีเซลล์เลือดปริมาณน้อยที่สุด

ในวันที่ 3 จำนวนเซลล์เลือดแต่ละชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากกุ้งแข็งแรงขึ้น จึงทำให้เซลล์เลือดมีปริมาณใกล้เคียงกัน ไม่ต่างกัน

และในวันที่ 7 ชุดควบคุมฉีดเชื้อและได้รับอาหารปกติ มีจำนวนเม็ดแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อ แต่ไม่ได้รับรักษา ทำให้ร่างกายอ่อนแอ ลำตัวสีคล้ำ และไม่กินอาหาร

กิจการและคณะ (2543) ได้ศึกษาเซลล์เลือดของกุ้งกุลาดำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่ามีเซลล์เลือด 3 ชนิด คือ เซลล์ไฮยาลิน (hyalinocyte) มีขนาดเล็กที่สุด มีความยาว 6.8-13.9 ไมครอน กว้าง 6.4-8.3 ไมครอน รูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโตคอนเดรีย (mitochondria) สมูท เอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัม (smooth endoplasmic reticulum, SER) และรัฟเอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัม (rough endoplasmic reticulum, RER) น้อย พบไซโตพลาสมามิกกรานูล (cytoplasmic granules) เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ขณะที่เซลล์เซมิกรานูล (semi-granulocyte) มีความยาว 9.0-14.2 ไมครอน กว้าง 4.2-6.8 ไมครอน รูปร่างไข่หรือกระสวย มีนิวเคลียสอยู่กลางหรือขอบเซลล์ พบ SER และ RER มาก ทำหน้าที่โดยตรงในการสร้างโนดูล (nodule formation) และเอนแคปซูเลชั่น (encap-sulation) รวมทั้งในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating system) และเซลล์ลาร์กรานูล (granulocyte) มีความยาว 12.2-14.6 ไมครอน กว้าง 7.2 ไมครอน มีรูปร่างไข่ มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายเม็ดถั่วอยู่ตรงกลาง บริเวณขอบ SER และ RER ปานกลาง มีกรานูลขนาดใหญ่ และสม่ำเสมอ ทำหน้าที่หลักในการทำงานระบบโปรฟีนอลออกซิเดส

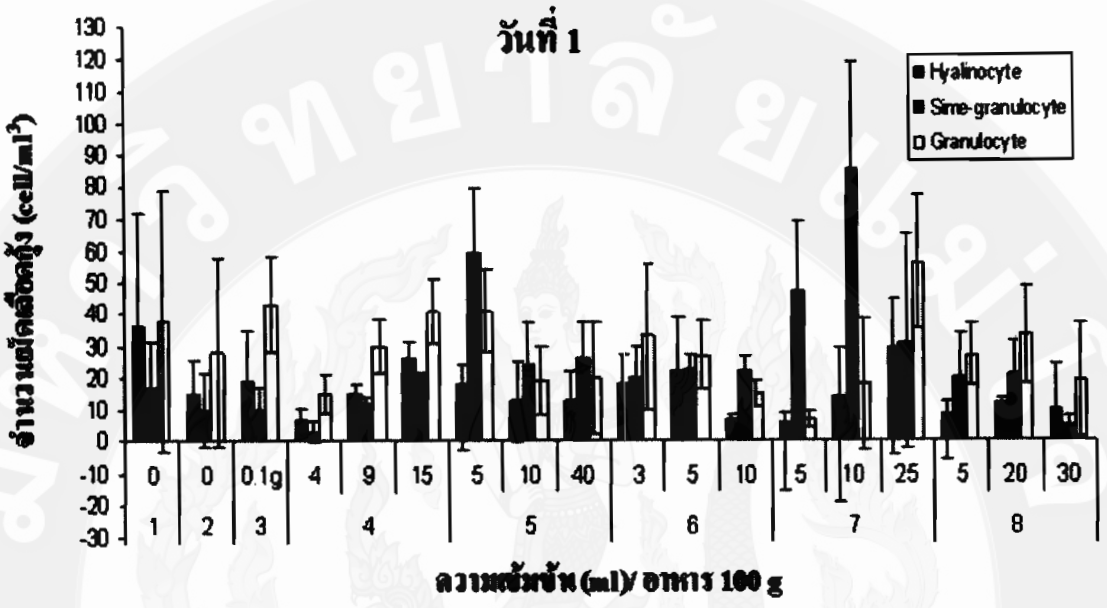
Sung และคณะ (2003) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเลือดของกุ้งกุลาดำขนาด PL33 ซึ่งได้รับเชื้อ *Vibrio spp.* ทำการหาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ในเลือดกุ้งบริเวณตับและตับอ่อนและเก็บน้ำ พบว่า ในแหล่งน้ำจืด กลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/ml ของ Timsen™ มีจำนวนแบคทีเรียรวมในเลือด เท่ากับ 4.17±8.9, 12.4±0.2, 1.4±0.5 CFUx10^2 ตามลำดับ และไม่พบแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ขณะที่ในแหล่งน้ำกร่อย กลุ่มควบคุม ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/ml ของ Timsen™ มีจำนวนแบคทีเรียรวมในเลือด เท่ากับ 55.7±8.6, 34.3±3.3, 15.8±1.3 cfux10^2 ตามลำดับ และพบว่าจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio spp.* เท่ากับ 10.8±3.2, 0, 0.7±0.4 CFUx10^2 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 13 จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด คือ granulocyte semi-granulocyte และ hyalinocyte ของตัวอย่างกุ้งในชุดการทดลองกลุ่มต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

เวลาหลังฉีดเชื้อ(วัน)	ชุดทดลอง	ปริมาตรสารสกัด (ml) ต่ออาหาร 100 g	ชนิดเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม (cells/ml)			
			Granulocyte	Semi-granulocyte	Hyalinocyte	Total
1	C=ไม่ฉีดเชื้อ AH	0	38±41.2	17±15.0	36±36.1	91±91.0
	C=ฉีดเชื้อAH	0	15±10.44	10±11.53	28±29.77	31±15.62
	oxytetracycline	0.1 g	19±16	10±7	43±15.04	72±43.47
	กระเทียม	3	18±9.45	20±9.71	33±23.01	71±46.57
		5	22±16.92	23±4.36	27±10.70	72±30.66
		10	7±1.53	22±4.73	15±4.04	34±9.50
	ระพลู	5	8±4.36	20±13.65	27±9.54	55±27.39
		20	12±1.73	21±10.44	33±15.04	66±26.50
		30	10±13.86	5±2.52	19±17.67	34±33.62
	ขาเขียว	5	6±2.65	47±21.73	7±2.52	60±25.51
		10	29±15.31	31±33.23	56±20.50	116±48.10
		25	29±15.31	31±33.23	56±20.50	116±48.10
	ทับทิม	4	7±3.51	3±3.61	15±6.08	25±14.84
		9	15±3.10	12±2.0	30±8.50	57±14.47
		15	26±5.51	21±0.6	41±10.06	88±48.68
	หูกวาง	5	18±6.11	59±20.50	41±13.28	118±12.58
		10	13±12.17	24±13.50	19±10.50	56±40.70
		40	13±8.96	26±11.27	20±17.35	59±37.54
3	C=ไม่ฉีดเชื้อ AH	0	15±2.88	40±32.15	44±28.04	99±57.24
	C=ฉีดเชื้อAH	0	7±3.61	4±1.0	14±2.0	25±.3.61
	oxytetracycline	0.1 g	13±5.03	6±2.90	19±7.64	38±13.61
	กระเทียม	3	8±9.85	9±7.57	17±9.29	34±35.04
		5	10±2.52	31±17.56	39±11.15	80±35.83
		10	5±3.79	14±7.57	21±15.10	40±25.63
	ระพลู	5	12±0.58	35±18.61	49±15.63	96±34.0
		20	13±11.0	28±26.63	36±40.28	77±77.85
		30	17±9.81	17±13.23	33±14.19	67±36.86
	ขาเขียว	5	5±1.15	15±4.04	26±3.46	49±8.14
		10	11±4.51	10±4.58	23±12.22	44±21.03
		25	8±6.43	10±4.51	18±14.22	36±24.70

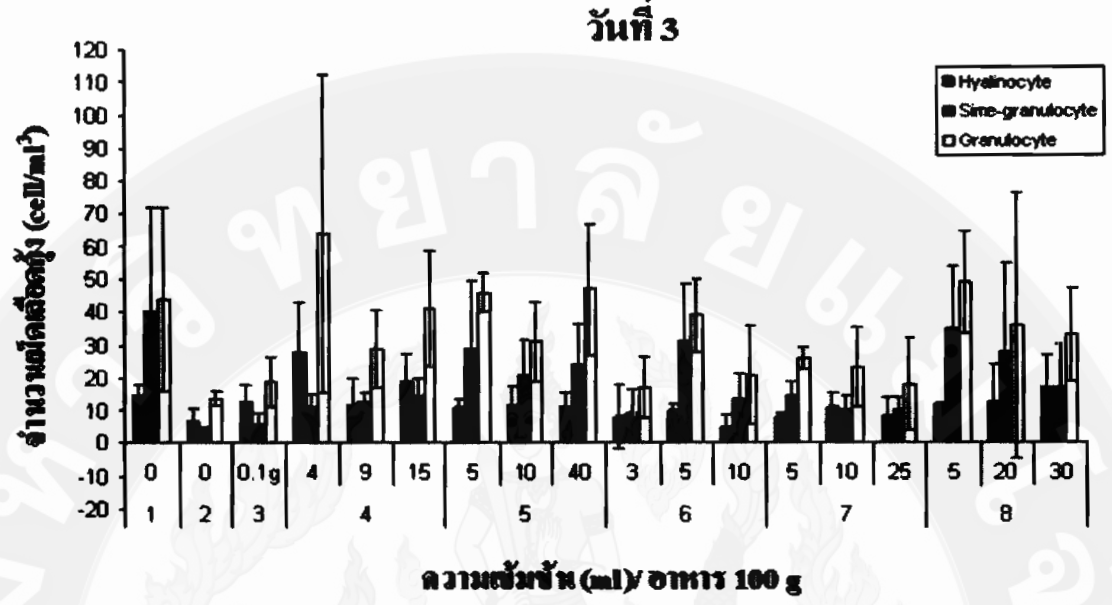
ตารางที่ 13 (ต่อ)

เวลาหลังฉีดเชื้อ(วัน)	ชุดทดลอง	ปริมาตรสารสกัด (ml) ต่ออาหาร 100 g	ชนิดเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม (cells/ml)			
			Granulocyte	Semi-granulocyte	Hyalinocyte	Total
	ทับทิม	4	28±15.01	11±4.04	64±48.21	103±61.65
		9	12±7.81	13±2.89	29±11.68	54±22.11
		15	19±8.50	15±5.03	41±17.24	75±29.67
	หูกวาง	5	11±3.05	29±20.43	46±5.70	86±19.35
		10	12±5.51	21±10.80	31±12.17	64±28.16
		40	11±4.58	24±12.53	47±20.07	82±37.0
7	C=ไม่ฉีดเชื้อ AH	0	5±4.62	6±6.51	17±15.0	28±24.54
	C=ฉีดเชื้อAH	0	15±10.44	10±11.53	28±29.77	53±51.63
	oxytetracycline	0.1 g	25±16.0	17±7.0	32±15.04	74±24.25
	กระเทียม	3	3±4.62	3±5.77	4±7.51	10±17.90
		5	10±14.80	10±10.60	16±23.30	36±48.40
		10	6±2.52	4±2.08	9±1.73	19±5.86
	ระพูล	5	9±4.58	45±16.09	74±32.60	128±27.22
		20	10±1.53	25±8.08	58±3.80	93±8.62
		30	6±6.56	8±8.02	21±22.60	35±32.80
	ขาเขียว	5	17±13.32	65±19.40	91±41.86	173±53.86
		10	21±2.0	23±15.04	59±31.80	103±45.10
		25	10±16.74	12±20.78	23±39.26	45±76.79
	ทับทิม	4	5±3.51	6±3.61	10±6.08	21±12.74
		9	9±3.06	5±2.0	18±8.50	32±13.20
		15	11±5.51	7±0.58	23±10.10	38±14.98
	หูกวาง	5	15±10.54	1±0.57	13±9.61	29±20.03
		10	6±4.73	5±3.21	12±8.54	23±16.04
		40	13±13	8±7.21	27±25.24	48±43.86



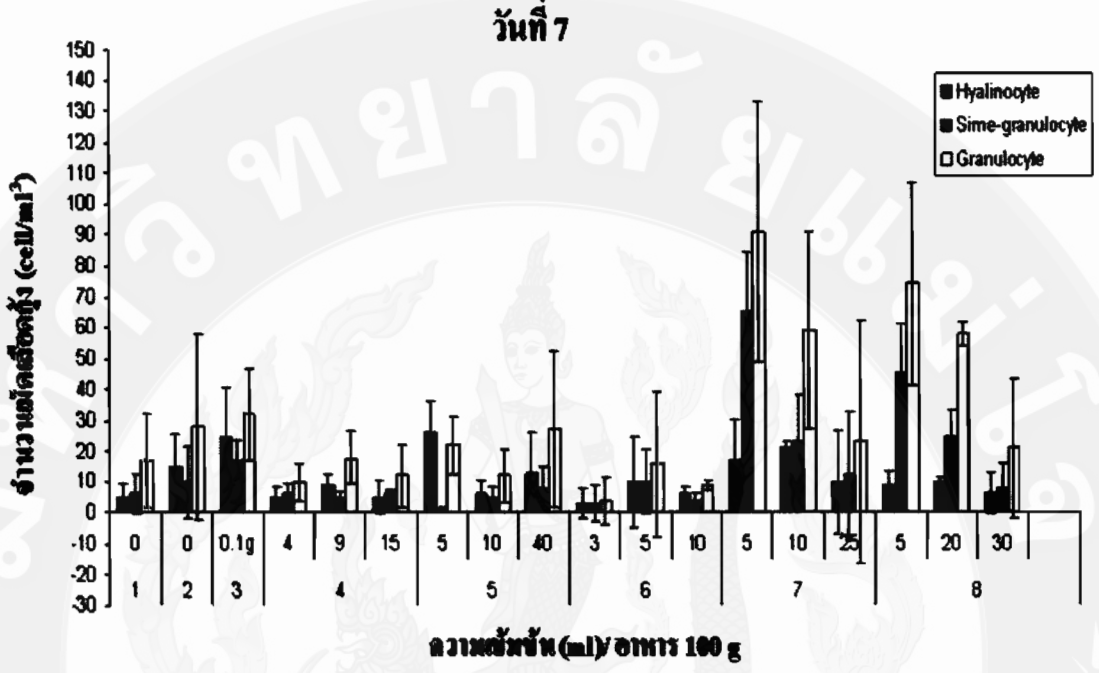
ภาพที่ 30 จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด หลังฉีดเชื้อ 1 วัน

1 = ชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อและให้อาหารปกติ
2 = ชุดควบคุมฉีดเชื้อและ ให้อาหารปกติ
3 = ชุดควบคุมฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบ oxytetracycline
4 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดเปลือกทับทิม ปริมาตร 4, 9 และ 15 ml/ อาหาร 100 g
5 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดใบหูกวางทับทิม ปริมาตร 5, 10 และ 40 ml/อาหาร 100 g
6 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดกระเทียมสด ปริมาตร 3, 5 และ 10 ml/ อาหาร 100 g
7 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดขาเขียว ปริมาตร 5, 10 และ 25 ml/ อาหาร 100 g
8 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดใบระพูล ที่ปริมาตร 5, 20 และ 30 ml/ อาหาร 100 g



ภาพที่ 31 จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด หลังฉีดเชื้อ 3 วัน

1 = ชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อและให้อาหารปกติ
2 = ชุดควบคุมฉีดเชื้อและ ให้อาหารปกติ
3 = ชุดควบคุมฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบ oxytetracycline
4 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดเปลือกทับทิม ปริมาตร 4, 9 และ 15 ml/อาหาร 100 g
5 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดใบหูกวางทับทิม ปริมาตร 5, 10 และ 40 ml/อาหาร 100 g
6 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดกระเทียมสด ปริมาตร 3, 5 และ 10 ml/อาหาร 100 g
7 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดชาเขียว ปริมาตร 5, 10 และ 25 ml/อาหาร 100 g
8 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดใบชะพลู ที่ปริมาตร 5, 20 และ 30 ml/อาหาร 100 g



ภาพที่ 32 จำนวนเซลล์เลือดของกุ้งก้ามกราม 3 ชนิด หลังฉีดเชื้อ 7 วัน

1 = ชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อและให้อาหารปกติ
2 = ชุดควบคุมฉีดเชื้อและ ให้อาหารปกติ
3 = ชุดควบคุมฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบ oxytetracycline
4 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดเปลือกทับทิม ปริมาตร 4, 9 และ 15 ml/อาหาร 100 g
5 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดใบหูกวางทับทิม ปริมาตร 5, 10 และ 40 ml/อาหาร 100 g
6 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดกระเทียมสด ปริมาตร 3, 5 และ 10 ml/อาหาร 100 g
7 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดฮาเชียว ปริมาตร 5, 10 และ 25 ml/อาหาร 100 g
8 = ชุดฉีดเชื้อและได้รับอาหารเคลือบสารสกัดใบระพูล ที่ปริมาตร 5, 20 และ 30 ml/อาหาร 100 g

การสังเกตลักษณะอาการและการรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่ใช้สารสกัดสมุนไพรทำการรักษาโรคแอโรโมแนส เป็นดังนี้

ในการใช้สารสกัดกระเทียมสด พบว่า ที่ปริมาตร 3 มิลลิลิตร/อาหาร 100 กรัม กุ้งเครียด อ่อนแอ ลำตัวคล้ำ เบื่ออาหาร เริ่มตายในวันที่ 3 มีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดมาก เท่ากับ 6x10 cfu/plate และมีเซลล์เลือดรวมจำนวนน้อย เท่ากับ $1x10^5$ cells/ml^3 ส่วนที่ปริมาตร 5 และ 10 ml/อาหาร 100 g เนื่องจากกุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % ลักษณะอาการปกติ ลำตัวอาจคล้ำเล็กน้อย กินอาหารปกติ จำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด เท่ากับ $4x10^1$ และ $3x10^1$cfu/plate ตามลำดับ และมีเซลล์เลือดรวมจำนวนมาก เท่ากับ $3.6x10^5$ และ $1.9x10^5$ cells/ml จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารสกัดกระเทียม 5 - 10 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกินได้ดี

ในการใช้สารสกัดใบชะพลู พบว่า ที่ปริมาตร 5 และ 20 ml/อาหาร 100 g เนื่องจากกุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % ลักษณะอาการปกติ ลำตัวคล้ำเล็กน้อย กินอาหาร มีเซลล์เลือดเท่ากับ $1.28x10^6$ และ $9.3x10^5$ cells/ml ตามลำดับ และไม่พบแบคทีเรียในน้ำเลือด ส่วนที่ปริมาตร 30 ml/อาหาร 100 g กุ้งมีอาการเครียด ลำตัวคล้ำ เบื่ออาหาร เริ่มตายในวันที่ 5 ไม่พบจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด และมีเซลล์เลือดรวม เท่ากับ $3.5x10^5$ cells/ml จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารสกัดใบชะพลู 5 - 20 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกินได้ดี

ขณะที่การใช้สารสกัดขาเขียว พบว่า ที่ปริมาตร 5 - 10 ml/อาหาร 100 g เนื่องจากกุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % ลักษณะอาการปกติ ลำตัวอาจคล้ำเล็กน้อย กินอาหารปกติ จำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด เท่ากับ $4x10^1$ และ $1x10^1$ cfu/plate ตามลำดับ และมีเซลล์เลือดรวมจำนวนมาก เท่ากับ $1.73x10^6$ และ $1.03x10^6$ cells/ml ตามลำดับ ส่วนที่ปริมาตร 25 ml/อาหาร 100 g กุ้งเครียด อ่อนแอ ลำตัวคล้ำ เบื่ออาหาร เริ่มตายในวันที่ 5 มีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด เท่ากับ $1x10^1$ cfu/plate และเซลล์เลือดรวม เท่ากับ $4.5x10^5$ cells/ml อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดสูงเกินไป จนมีผลทำลายเซลล์เลือดด้วย

ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการทดลองของ สุจิตรา (2540) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ tea polyphenol ในกุ้งกุลาดำ น้ำหนัก 7-10 กรัม ให้อาหารผสม tea polyphenol ที่ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 และ 30 วัน ก่อนฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* เข้าในตัวกุ้ง ($2.24x10^7$ เซลล์) หลังจากฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง กุ้งที่ได้รับ tea polyphenol เป็นเวลา 14 วัน ก่อนฉีดเชื้อ มีอัตรารอดไม่แตกต่างกันจากกลุ่มควบคุม ส่วนกุ้งที่

ได้รับ tea polyphenol เป็นเวลา 30 วัน ก่อนฉีดเชื้อ มีอัตรารอดสูงที่สุด 74.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กลุ่มที่ได้รับ tea polyphenol ในระดับต่ำ มีอัตรารอด 40 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ไม่ได้รับ tea polyphenol มีอัตรารอด 38.7 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก แต่หลังจากฉีดเชื้อ 48 ชั่วโมง อัตรารอดไม่ต่างกัน

จากผลการทดลองนี้แสดงว่า สารสกัดใบชาเขียว 5 - 10 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกินได้ดี

ในการใช้สารสกัดเปลือกทับทิม พบว่า ที่ปริมาตร 4 - 9 ml/อาหาร 100 g กุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % มีอาการปกติ ลำตัวคล้ำเล็กน้อย กินอาหารปกติ จำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง เท่ากับ $1x10^{1}$ cfu/plate เท่ากัน และมีเซลล์เลือดรวมจำนวนมาก เท่ากับ $2.1x10^{5}$ และ $3.2x10^{5}$ cells/ml ส่วนที่ความเข้มข้น 15 ml/อาหาร 100 g กุ้งมีอัตรารอดตาย 100 % แต่มีอาการเครียด ลำตัวคล้ำ กินอาหารเล็กน้อย มีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือดมาก เท่ากับ $1.2x10^{2}$ cfu/plate และมีเซลล์เลือดรวมจำนวนน้อยกว่า เท่ากับ $3.8x10^{5}$ cells/ml อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดสูงเกินไป มีผลให้กุ้งเครียด จากผลการทดลองนี้แสดงว่า สารสกัดเปลือกผลทับทิม 4 - 9 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกินได้ดี

ส่วนการใช้สารสกัดใบหูกวาง พบว่า ที่ปริมาตร 10 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพในการรักษาโดยวิธีการกินได้ดี เนื่องจากกุ้งรอดตาย 100 % ลักษณะอาการปกติ ลำตัวคล้ำเล็กน้อย กินอาหารปกติ จำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด เท่ากับ $1x10^{1}$ cfu/plate และมีเซลล์เลือดรวมจำนวนมาก เท่ากับ $2.3x10^{5}$ cells/ml ขณะที่ปริมาตร 5 ml/อาหาร 100 g กุ้งรอดตายทั้งหมด มีอาการปกติ เช่นกัน แต่มีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด เท่ากับ $3x10^{1}$ cfu/plate และเซลล์เลือดรวม เท่ากับ $2.9x10^{5}$ cells/ml อาจเนื่องจากความเข้มข้นต่ำ ประสิทธิภาพการรักษาโรคไม่เพียงพอ จึงทำให้แบคทีเรียมีจำนวนมาก ส่วนที่ปริมาตร 40 ml/อาหาร 100 g กุ้งมีอาการเครียด ลำตัวคล้ำ เบื่ออาหาร เริ่มตายในวันที่ 4 มีจำนวนแบคทีเรียในน้ำเลือด เท่ากับ $1.5x10^{2}$ cfu/plate และมีเซลล์เลือดรวม เท่ากับ $4.8x10^{5}$ cells/ml อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดสูงเกินไป จนมีผลทำลายเซลล์เลือดด้วย จากผลการทดลองนี้แสดงว่า สารสกัดใบหูกวาง 5 - 10 ml/อาหาร 100 g มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคแอโรโมแนสในกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการกินได้ดี

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณของสารสกัดสมุนไพรไทยที่จะใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งก้ามกรามโดยผสมอาหารให้กิน

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยทั้ง 5 ชนิด สามารถสรุปการใช้สารสกัดสารสกัดเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทยทั้ง 5 ชนิด เพื่อรักษาโรคแอโรโมแนส โดยการผสมอาหารให้กินในปริมาณต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แนวทางการใช้สารสกัดด้วยเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทย ผสมอาหารให้กินรักษาโรคแอโรโมแนส (MAS) ในกุ้งก้ามกราม

สมุนไพร	ปริมาณ (ml/อาหาร 100 g)	ระยะเวลาการรักษา
กระเทียม (หัว)	5 - 10	7 วัน
ชะพลู (ใบ)	5 – 10	7 วัน
ชาเขียว (ใบ)	5 - 10	7 วัน
ทับทิม (เปลือกผล)	4 - 9	7 วัน
หูกวาง (ใบ)	10	7 วัน

สรุปการวิจัย

จากผลงานวิจัยนี้ จะเห็นได้ว่าสามารถทำการวิจัยบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้ ดังนี้

1. การสำรวจฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยที่สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม

ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* (AH) *Vibrio harveyi* (VH) และ *V. parahaemolyticus* (VP) โดยใช้วิธี disc diffusion จากสมุนไพรทั้งหมด 96 ชนิด ใช้สมุนไพร 112 ชนิดส่วน โดยใช้ส่วนต่างๆของสมุนไพรทั้งสดและแห้งที่หาง่ายหรือมีขายทั่วไป และใช้น้ำ เอธานอล 50% และ 95% เป็นตัวทำละลาย จึงได้สารสกัดสมุนไพรไทยทั้งสิ้น 336 ชนิด พบว่า สารสกัดของสมุนไพร 23 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้ง 3 ชนิดได้ดี ได้แก่ กระเทียม(หัวสด) กระเพรา(ใบ) กานพลู(ดอก) จาสาบเสือ(ใบสดและแห้ง) เจตมูลเพลิงแดง(แก่น) ชะพลู(ใบ) ชาเขียวญี่ปุ่น(ใบ) ชุมเห็ดเทศ(ใบ) ทับทิม(เปลือกผล) เทียนตาตั๊กแตน(เมล็ด) น้อยหน่า(ใบ) ผักเผ็ด(ใบแห้งและสด) ฝาง(แก่น) พริกแดง(ดอก) พลู(ใบ) ฟ้าทะลายโจร(ใบ) มะระหวาน(ใบ) หูกวาง(ใบแห้งและสด) สะระแหน่(ใบ) และ อบเชย(เปลือก) และสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงมาก ได้แก่ กระเทียมสด เจตมูลเพลิงแดง และ ใบหูกวาง ซึ่งสกัดด้วยเอธานอล

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ สารสกัดของสมุนไพร 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VH ได้แก่ ผักไผ่(ใบ) รางจืด(ทั้งต้น) ว่านหางจระเข้(วุ้น) มะยม(ผลสด) และเหงือกปลาหมอ(ใบ) สารสกัดของสมุนไพร 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH และ VP ได้แก่ มะแข่น(ทั้งต้น) มะแว้ก และลูกใต้ใบ(ทั้งต้น) และสารสกัดของสมุนไพร 16 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VP และ VH ได้แก่ กะเม็ง(ทั้งต้น) กระชายม่วง(เหง้า) ขี้เหล็ก(ใบ) ถั่วฝักยาว(ฝัก) เทียนบ้าน(ใบสด) บัวบก(ทั้งต้น) มะกรูด(ใบ) มะระขี้นก(ใบ) มังคุด(เปลือกผล) แมงลัก(ทั้งต้น) ไมยราบ(ใบ) ลำโพงขาว(ใบ) ว่านหางจระเข้(เปลือก) หญ้าลิ้นงู(ทั้งต้น) สะเดา(ใบ) และสาบเสือ(ใบ) จะสังเกตได้ว่า สารสกัดสมุนไพรทั้งหมดในกลุ่มที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิด มีฤทธิ์ไม่สูง (ขนาดวงใส < 10 mm)

สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเชื้อเดียว คือ สารสกัดของสมุนไพร 9 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ AH ได้แก่ กระเพรา(ใบสด) จันทน์แปดกีบ(ดอก) ดาวเรือง(ดอก) ต้อยติ่ง(ใบ) บัวหลวง(เกสรตัวผู้+กลีบดอก) ผักบุ้งแดง(ใบสด) ผักบุ้งขาว(ใบสด) ผักปลัง (ใบ) และฝรั่ง(ใบ) สารสกัดของสมุนไพร 16 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VH ได้แก่ กะทกรก(ผล) กระชายดำ(เหง้า) ขลู่(ใบ) คูน(ใบ) ต้นตายใบเป็น(ใบ) บัวบก(ทั้งต้นสด) เปล้าตองแตก(ใบ) ผักเบี้ย(ใบ) ฝิ่น(ต้น) พลูคาว(ใบ) หญ้ากรดน้ำ(ใบ) หญ้าสามวัน(ใบ) หญ้าหัวโม่ง(ใบ) หนุมานประสานกาย(ใบ) หมาก(ผล) และสาหร่ายไป

รูลิน่า(เซลล์) ส่วนสารสกัดของสมุนไพร 7 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ VP ได้แก่ กุยช่าย(ใบ) น้ำนมราชสีห์ (ใบ) มะระขี้นก(ผล) ยอ(ใบ) หนุมานประสานกาย(ใบสด) หม่อน(ใบ) และโหระพา(ใบ)

สารสกัดของสมุนไพรไทย 29 ชนิด ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสาม ได้แก่ กระวาน(ผล) กระสัง(ทั้งต้น) กล้วย(ผล) ขนุน(แก่น) ข้าวโพด(ขัง) ข้าวสาลี(เปลือก) คำฝอย(ดอก) จันทน์เทศ(ผล) ชะเอมเทศ(ทั้งต้น) ดีปลี(ผล) ต้อยติ่ง(ทั้งต้น) ตะไคร้(ทั้งต้น) เตย(ใบ) เตยหอม(ใบ) เทียนข้าวเปลือก(เมล็ด) บอระเพ็ด(กิ่ง) เปราะหอม(ต้น) ผักเค็ด(ทั้งต้น) ผักชี(ต้น) ผักชีลาว(ทั้งต้น) พริกไทยดำ(เมล็ด) ไพล(เหง้า) ฟ้าทะลายโจร(ใบสด) ไมยราบยักษ์(ใบ) มะม่วงหิมพานต์(เปลือกผล) มะยม(ใบ) หงอนไก่ (ใบ) หนุมานนั่งแท่น(ยางสด) และหญ้าพันงู(ทั้งต้น)

2. ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อโรคในกุ้งก้ามกรามโดยการหาค่า MIC /MBC

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร 34 ชนิด โดยการหาค่า MIC/MBC ด้วยวิธี broth dilution และ total plate count พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพดีต่อเชื้อก่อโรคทั้งสาม คือ สารสกัดกระเทียมด้วยเอธานอล 50% (AH : MIC = 5 ml/l, MBC = 10 ml/l; VH : MIC = 15 ml/l, MBC = 20 ml/l; VP : MIC = 7 ml/l, MBC = 10 ml/l) สารสกัดเปลือกผลทับทิมด้วยเอธานอล 50% (AH : MIC = 9 ml/l, MBC = 15 ml/l; VH : MIC = 5 ml/l, MBC = 15 ml/l; VP : MIC = 3 ml/l, MBC = 20 ml/l) สารสกัดเมล็ดเทียนตาตั๊กแตนด้วยเอธานอล 50% (AH : MIC = 10 ml/l, MBC = 30 ml/l; VH : MIC = 5 ml/l, MBC = 10 ml/l; VP : MIC = 35 ml/l, MBC = 40 ml/l) สารสกัดแก่นฝางด้วยเอธานอล 50% (AH : MIC = 5 ml/l, MBC = 15 ml/l; VH : MIC = 5 ml/l, MBC = 15 ml/l; VP : MIC = 10 ml/l, MBC = 15 ml/l) สารสกัดใบหูกวางแห้งด้วยเอธานอล 50% (AH : MIC = 10 ml/l, MBC = 40 ml/l; VH : MIC = 1 ml/l, MBC = 12 ml/l; VP : MIC = 2 ml/l, MBC = 4 ml/l) และสารสกัดใบหูกวางแห้งด้วยเอธานอล 95% (AH : MIC = 20 ml/l, MBC = 30 ml/l; VH : MIC = 1 ml/l, MBC = 9 ml/l; VP : MIC = 2 ml/l, MBC = 3 ml/l)

3. ได้ศึกษาแนวทางในการใช้สารสกัดสมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรคแบคทีเรียในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม โดยการหาค่าความเป็นพิษของสารสกัด และนำมาทดสอบการใช้รักษาโรคโดยการแช่และผสมอาหารให้กิน

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อลูกกุ้งก้ามกราม โดยหาค่า LC_{50} 96 h ด้วยการแช่ พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษสูง (มีค่า LC_{50} < 2 ml/l) ได้แก่ กระชายม่วง สกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 0.92 ml/l) สกัดด้วยเอธานอล 95% (LC_{50} = 0.94 ml/l) กระเทียมสกัดด้วยเอธานอล 95% (LC_{50} = 1.83 ml/l) และเทียนตาตั๊กแตนสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 1.65 ml/l) เอธานอล 95% (LC_{50} = 1.09 ml/l) ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่มีความเป็นพิษต่ำ (มีค่า LC_{50} > 30 ml/l) ได้แก่ ผลมะระขี้นกสกัดด้วยเอธานอล 50% (LC_{50} = 32.63 ml/l) และใบหูกวางสกัดด้วยน้ำ (LC_{50} = 33.46 ml/l)

การทดลองเพื่อทำการรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสต่อกุ้งก้ามกรามโดยวิธีการแช่และผสมอาหารกิน โดยได้เปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าไซคลิน พบว่าสารสกัดด้วยเอธานอล 50 % ของสมุนไพรไทยทั้ง 5 ชนิด สามารถใช้รักษาโรคแอโรโมแนสได้ดีเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ และสามารถกำหนดแนวทางการรักษาได้ดังนี้

สารสกัดสมุนไพร	วิธีรักษา	ปริมาณ	ระยะเวลา
กระเทียม (หัว)	แช่สั้น	3 – 5 ml/l	6 ชม.
	จุ่ม	10 ml/l	1 - 5 นาที
	ผสมอาหาร	5 - 10 ml/อาหาร 100 g	7 วัน
ชะพลู (ใบ)	แช่สั้น	5 ml/l	6 ชม.
	จุ่ม	20 – 30 ml/l	1 - 5 นาที
	ผสมอาหาร	5 – 10 ml/อาหาร 100 g	7 วัน
ขาเขียว (ใบ)	แช่สั้น	5 – 10 ml/l	6 ชม.
	จุ่ม	25 ml/l	1 - 5 นาที
	ผสมอาหาร	5 - 10 ml/อาหาร 100 g	7 วัน
ทับทิม (เปลือกผล)	แช่ยาว	4 - 9 ml/l	ตลอด
	แช่สั้น	15 ml/l	24 ชม.
	ผสมอาหาร	4 - 9 ml/อาหาร 100 g	7 วัน
หูกวาง (ใบ)	แช่ยาว	5 – 10 ml/l	ตลอด
	จุ่ม	40 ml/l	1 - 5 นาที
	ผสมอาหาร	10 ml/อาหาร 100 g	7 วัน

4. ได้แนวทางในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบยั่งยืนและรักษาสิ่งแวดล้อม ไม่มีสารตกค้าง

ผลการวิจัยแสดงว่าสามารถนำสารสกัดสมุนไพรไทยมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี โดยสารสกัดที่นำมาทำการทดลองนำร่อง ได้คัดเลือกจากประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสูง ความเป็นพิษต่อลูกกุ้งก้ามกรามต่ำ และใช้ในปริมาณน้อยก็ได้ผลดี นอกจากนี้สมุนไพรไทยเหล่านี้ยังไม่มีรายงานความเป็นพิษเมื่อตกค้างในสิ่งแวดล้อม และใช้ในปริมาณน้อย ทำให้การใช้สารสกัดสมุนไพรไทย 5 ชนิดนี้ มีความปลอดภัยสูงได้ ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้งและสิ่งแวดล้อมน้ำในธรรมชาติ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียในกุ้งและสัตว์น้ำอื่นได้ ซึ่งเป็นการสนับสนุนการผลิตสัตว์น้ำปลอดสารในระบบการเลี้ยง GAP CoC และอินทรีย์ ให้ได้ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่มีคุณภาพสูง

5. ได้ทำการเผยแพร่ข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับสมุนไพรในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

โดยได้เข้าร่วมการนำเสนอผลงานทางวิชาการในระดับชาติ ดังนี้

- การประชุมวิชาการประจำปี พ.ศ. 2547 สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 วันที่ 12-15 ธันวาคม 2547 ณ โรงแรมท๊อปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก (ภาคผนวก ก การนำเสนอผลงานวิชาการ 1)
- การประชุมวิชาการ "The International Conferecne on Shrimp Biotechnology at BioThailand 2005 : Biotechnology Challenges in the 21th Century" จัดโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ วันที่ 4-5 พฤศจิกายน 2548 (ภาคผนวก ก การนำเสนอผลงานวิชาการ 2)
- การประชุมวิชาการ "The 18th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology Biotechnology : Benefits & Bioethics (B^3) จัดโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ วันที่ 2-3 พฤศจิกายน 2549 (ภาคผนวก ก การนำเสนอผลงานวิชาการ 3)
- "การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2552 (Thailand Research Expo 2009)" จัดโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) วันที่ 26-30 สิงหาคม 2552 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพฯ (ภาคผนวก ก การนำเสนอผลงานวิชาการ 4)

- จัดทำเอกสารแผ่นพับ เรื่อง การใช้สารสกัดสมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (ภาคผนวก ก เอกสารเผยแพร่)
- การดำเนินการจดอนุสิทธิบัตร ดังในภาคผนวก ข

บรรณานุกรม

กมลพร ทองอุไทย. 2539. โรคปลานิล. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดกรมประมง เกษตรหลวงจตุจักร กรุงเทพฯ. 19 หน้า. อ้างถึง Roberts, R.J. and C. Sommervill. 1982. Disease of tilapia, In Proceeding of the International Conference on the Biology and Culture of Tilapias, R.S.V Pullin and R.H Lowe- McConnel (eds), bellagio, Italy, p 247-263.

กมลพร ทองอุไท. 2540. โรคในกุ้งก้ามกราม. ข่าวโรคสัตว์น้ำ 4(2):2-3.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2545. ผักเชียงดา "แหล่งผลิตผักพื้นบ้านเชิงการค้า ปี 2545". [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.doae.go.th/stat/newpage/page_53.htm (4 ธันวาคม 2549).

การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคกลาง เขต 1. ม.ป.ป.. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.tat7.com/th/all_link.html (5 พฤษภาคม 2550).

กรรณิการ์ กาญจนชาตรี. 2534. การสลายตัวของออกซีเตตร้าซัยคลินในน้ำจืดและในน้ำเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกสรจันทร์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรค และองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. สงขลานครินทร์ 22(ฉบับพิเศษ): 567-580.

กิติพันธ์ คำมา. 2543. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิล่าในกบนา. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 52 น.

กิติวรรณ ทองดอนเหมือน. 2545. ประสิทธิภาพของกระเทียมและใบหูกวางเพื่อกำจัดเห็บระฆังในลูกปลานิลและผลข้างเคียงที่มีต่อลูกปลานิล. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 38น.

กุ้งก้ามกราม. 2548. โรคกุ้งก้ามกราม. สัตว์น้ำ 16(185): 121-124.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข และเกรียงศักดิ์ สายธนู .2528 . อัตราการใช้ยาของเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิล่า สเตรนจากปลาดุก. วารสารชมรมโรคปลา.(3)1: หน้า 9 – 13.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2539 . หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ภาควิชา เทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการประมง และทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ . หน้า 30.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข และคณะ. 2533. โรคระบาดในปลาน้ำจืดสาเหตุจากเชื้อ แอร์โรโมนาสไฮโดรฟิล่าในประเทศไทย. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 6(1): 39 – 40.

แก้วมังกรเภสัช. 2549. กระชายดำ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.kaewmungkorn.com/index3-3.htm (29 พฤศจิกายน 2549).

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547. เทียนข้าวเปลือก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มาhttp:// www.pharm.chula.ac.th/museum/th-crud/su-5.htm (9 ตุลาคม 2549).

คณิต ง่านวิสุทธิพันธ์. 2543ก. เทคนิคการตรวจสุขภาพกุ้งเบื้องต้น. เชียงใหม่: สัมมนาประมง(พล 499) ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 30 น.

โครงการจัดฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ม.ป.ป.. ลำโพงขาว.[ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/2007/research.php (18 กุมภาพันธ์ 2550).

โครงการปริญญานิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2543. ยานอนหลับและยาคลายกังวล "ขี้เหล็ก". [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.pharm.chula.ac.th/.../keeleak.htm (18 กุมภาพันธ์ 2550).

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2544ก. พืชเครื่องเทศ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rspg.thaigov.net/.../use/spicies06.htm (9 ตุลาคม 2549).

จงกล พรมยะ และ นิวุฒิ หวังชัย. 2546. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาเพื่อเป็นอาหารปลา สำเร็จรูป. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 76 น.

จริยา สินเต็มสุข, สมเกียรติ ตีกิจเสริมพงศ์ และวีณา จารุปรีชาชาญ. 2532. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจาระร่วง, เบาหวาน ใบฝรั่งและเปลือกมังคุด.วารสารเภสัชศาสตร์ 16(2); 32-35

จารุณี สุภาวงค์.2545. การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรในการป้องกันการติดเชื้อ Aeromonas hydrophila.ในปลาดุกบิ๊กอุย. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. หน้า 22-24.

จำรัส เซ็นนิล และ มนตรี ตรีชารี. 2545. กระชายดำ สมุนไพรมหัศจรรย์. กรุงเทพฯ: เคพีเอ็ม มีเดีย สยาม. 134 น.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และคณะ. 2541. โรค Motile Aeromonas ในปลา. เวชสารสัตวแพทย์ แหล่งที่มา www.yalor.yru.ac.th.

จิราพร โรจน์ทินกร และอัญชลี ธำมรงค์คงสถิต. 2549. การแช่รักษาโรคแอโรโมแนสในสัตว์น้ำโดยใช้สารสกัดเปลือกทับทิมและใบหูกวาง. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. (เอกสารไม่ตีพิมพ์). อ้างถึง Braga, L. C., J. W. Shupp, C.

Cummings, M. Jett, J. A. Takahashi, L. S. Carmo, E. Chartone-Souza and M. A. Nascimento. 2005. Pomegranate extract inhibits Staphylococus aureus growth and subsequent enterotoxin production. Journal of Ethnopharmacology. 96 : 335-339.

จุรีรัตน์ แก้วปาน. 2548. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Aeromonas hydrophila ในกุ้งก้ามกราม. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. หน้า 9-13. อ้างถึง พร้อมจิต ศรลัมพ์. 2537. สมุนไพรและยาที่ควรรู้.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 39-56.

ฉัตรมงคล ศรสุวรรณ. 2548. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรีย Aeromonas hydrophila ในปลานิล. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. หน้า 7-10. อ้างถึง สมพร หิรัญรามเดช. 2523. ตำราตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพร. กรุงสยามการพิมพ์ : กรุงเทพฯ. 132 น.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2548. เอกสารประกอบการเรียนวิชาโรคปลา. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 142 น.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2547. คู่มือปฏิบัติการโรคปลา. ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่. 37 หน้า

ชมรมรักษ์สมุนไพรลำปาง. ม.ป.ป.. สมุนไพร "ใบหม่อน". [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.herblpg.com/thai/herb63.html (4 ธันวามคม 2549).

ชยันต์ พิเชียรสุนทร และ วิเชียร จีรองส์. 2547. คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 5. กรุงเทพฯ: อมรินทร์. 144-191.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2528. โรคปลา. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, บางเขน กรุงเทพฯ. 227 หน้า.

ชลิดา ชมานนท์, สมภพ รุ่งสุภา, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ วีณา เคยพุดซา. 2542. การศึกษาผลใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. กรุงเทพฯ: สาขาประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ช่อฟ้า ทองไทย. 2536. การเกิดโรคโดยเชื้อจุลินทรีย์. แบคทีเรียพื้นฐาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 156-158.

ชัยชาญ แสงดี. 2523. เภสัชวิทยา. เชียงใหม่: เจริญการค้า. 399 น..

ชาติ ประชาชื่น. 2549. มะแขว่นเครื่องเทศของไทยทางภาคเหนือ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http:// www.matichon.co.th/youth/youth.php?tagsub=031 (24 ตุลาคม 2549).

ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2542. กุ้งก้ามกราม. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.5, 70-70น.

ฐานข้อมูลทรัพยากรพืชพรรณของฝ่ายปฏิบัติการวิจัย. ม.ป.ป.. วัชพืช. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.dev.uru.ac.th/botany/detail.php?botany_id=7-53000-001-0342 (18 กุมภาพันธ์ 2550).

ฐานข้อมูลพรรณไม้ โครงการสวนพฤษศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคราม. ม.ป.ป.. หูกวาง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มาhttp://yalor.riy.ac.th/~research/biodiversity/round_riy/hukwang.html (4 ธันวามคม 2549).

ณรงค์ รุ่งรัตน์ชัชวาล. 2542. พิษเฉียบพลันของสารสกัดสะเดาต่อสัตว์น้ำจืดบางชนิด.กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 151 น.

ดารุณี แซ่อุ่ย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และ ลิลา เรืองแป้น. 2530. Vibrio harveyi สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (Penaeus merguiensis). กรุงเทพฯ: กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง. 11 น.

เต็มดวง สมศิริ. 2540. การศึกษาฤทธิ์ของฟ้าทะลายโจรต่อเชื้อวิบริโอ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง. 11 น

ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์. 2538. เอกลักษณ์สมุนไพร. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 197 น.

ธงชัย เปาอินทร์. 2544. ต้นไม้ยาน่ารู้. กรุงเทพฯ: บริษัทออฟเซ็ทเพรส. 267-333.

ธเนศ ชินวราภรณ์ และคณะ. 2546. ข้อมูลพื้นฐานทางโลหิตวิทยา และค่าทางสรีรวิทยาของปลาเสือตอ. เวชสารสัตวแพทย์. 33(4): 29 – 36.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2537. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร. 143 น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 735 น.

นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2537. การวิจัยและการควบคุมโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 75 น.

นพดล ศุกระกาญจน์. 2549. คู่มือปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สงขลา: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. 103 น.

นลิน วงศ์ขัตติยะ และ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง. 2544. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่. 28 หน้า

นันทริกา ชันซื่อ. 2539. แบคทีเรียวิทยาในปลา. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 88 น.

นันทวัน บุญยะประภัศร. 2539. ก้าวไปกับสมุนไพร (1). กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 130 น.

นันทวัน บุญยะประภัศร. 2541. ก้าวไปกับสมุนไพร(2). สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นันทวัน บุญยะประภัศร. 2542. ก้าวไปกับสมุนไพร(3). สำนักงาน ข้อมูลสมุนไพร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

นันทวัน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพรไทยพื้นบ้านเล่ม 1. บริษัท ประชาชนจำกัด. 65-71น.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2541. สมุนไพรไทยพื้นบ้านเล่ม 2. กรุงเทพฯ: ประชาชนจำกัด. 329-333 น.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2535. ก้าวไปกับสมุนไพร โครงการสมุนไพรเพื่อ การพึ่งตนเอง. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 207 หน้า

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.หน้า 67, 147, 852-854

นิจศิริ เรืองรังษี และพยอม ตันติวัฒน์. 2534. พืชสมุนไพร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 243 หน้า.

นิภาพร ตะเภาพงษ์. 2547. สมุนไพรเพื่อสุขภาพ.

นิภาพร ทิพย์เดโช. 2541. ประสิทธิภาพของมังคุดและกระเจี๊ยบในการรักษาโรคแอโรโมนาสโดยวิธีการแช่. กรุงเทพฯ: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 59 น.

นิลศิริ เรืองรังสี และพยอม ตันติวัฒน์. 2535.พืชสมุนไพร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 243 หน้า

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2525. จุลชีววิทยา เล่ม 1. มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒ บางเขน ชลบุรี. 356 หน้า.

บ้านจอมยุทธ. 2543. ดอกบัวนานาพันธุ์. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http:// www.baanjomyut.com/library/lotus/index.html (4 ธันวาคม 2549).

ปถมาพร สุกปลั่ง และ อัจฉราวรรณ ทองมี. 2547. Antimicrobial Testing. น. 16-23. ใน การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial Testing). หมวดวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต วันที่ 20-21 พฤษภาคม 2547. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรังสิต.

ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. 2537. โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว. 184 น.

ประจวบ หล่ำอุบล. ม.ป.ป.. สรีรวิทยาของกุ้ง. กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 310 น.

ประจวบ หล่ำอุบล. 2530. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำ บ่อกุ้ง นากุ้ง และระบบต่างๆ ของกุ้ง. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประพันธ์สาส์น. 2543. ผักชีลาว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.praphansarn.com/herb/herb28.asp (9 ตุลาคม 2549).

ประพนธ์ รักสินเจริญศักดิ์. 2535. การตกค้างและผลของปฏิชีวนะชนิดออกซิเตตร้าคลินต่อการเจริญเติบโต และโรคในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร, สมโภชน์ วีระกุล, กิ่งกาญจน์ สาระขู และ สาธรพรตระกลู พิพัฒน์. ม.ป.ป.. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเชื้อAeromonas hydrophila และ Streptococcus agalactiae ที่แยกจากปลานิลป่วย. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 1-15 น.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545. สารต้องห้ามในการผลิตกุ้งกุลาดำเพื่อการส่งออกกับทางรอดของประเทศไทย. สัตว์น้ำ 13(153): 73-78.ประเทศไทย. สัตว์น้ำ 13(153): 73-78.

ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. 2529. การเลี้ยงกุ้ง. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผะอบและคณะ. 2546. ปริมาณการตกค้างของยาปฏิชีวนะออกโซลินิคแอซิดในกุ้งก้ามกราม. วารสารการประมง. ปีที่56. ฉบับที่6. 521-525น.

พรชัย รุ่งศรี. 2546. ประสิทธิภาพของสารสกัด Cavacrol และ Thymol ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอและรักษาโรคขี้ขาวในกุ้งกุลาดำ. ซิตโต้ อควา นิวส์ 1(2): 21-25.

พรรณไม้ไทย. 2542. ไม้มงคลกับราศีเกิด. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.panmai.com/Zodiac2/zodiac.shtml (8 สิงหาคม 2549).

พรรณศรี จริโมภาส. 2548. การใช้จุลินทรีย์ทดแทนการใช้ยาออกซีเตตร้าไซคลินในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม. รายงานการวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

พรรนิภา ชุมศรี. 2542. สมุนไพรนานาชาติ ตอนที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. น. 23-25.

พรเลิศ จันทร์รัชชกุล และชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2529. การใช้เกลือแกงในการป้องกันและรักษาโรคปลา.วารสารประมงไทย. 9(9). หน้า 24-26.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. การตกค้างของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินในกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง 44(1): 31-33.

พรเลิศ จันทร์วัชชกูล เจ เอฟ เทอร์บอบ ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2537. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พรสวรรค์ ดิษยบุตร. 2543. สมุนไพร: การใช้อย่างถูกต้อง. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. น. 66-69.

พรสวรรค์ ดิษยบุตร, จักรพงษ์ ลิปนุสสรณ์, ธัญวรัตน์ กาจสงคราม, พงศธร หลิมศิริวงศ์ และลักขณา พงศ์พงัน. 2543. สมุนไพร: การใช้อย่างถูกวิธี. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.). 87 น.

พร้อมจิต ศรลัมพ์. 2537. สมุนไพรกับโรคระบบทางเดินอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 121 น.

พร้อมจิต ศรลัมพ์, รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์ล, วงศ์สถิต ฉั่วกุล และ อาทร ริ้วไพบูลย์. 2537. สมุนไพรและยาที่ควรรู้. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อาร์ ดี พี. 235 น.

พิเชษฐ์ ออมชมพู. 2548. การใช้สารสกัดแคลเซียม สไปรูแลน จากสาหร่าย Spirulina platensis ในการป้องและยับยั้งโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. เชียงใหม่: สัมมนาประมง (พล 499) ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 22 น.

พุทธ ส่องแสงจินดา และ ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2538. ผลของออกซีเตตร้าซัยคลินระดับต่างๆ กันต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจน อินทรีย์คาร์บอนรวม และปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2538, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรุงเทพฯ. 8 น.

เพ็ญศรี บุญตามช่วย, อรอนงค์ คงทวี และ มานพ เห็นดี. 2549. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งด้วยวิธีการต้มต่อการยับยั้งเชื้อวิบริโอในกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. น. 54.

เพิ่มพูน ศักดิ์เกษม. 2531. ปลานิล. ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร กรุงเทพฯ.

ฟิตเวย์ ประเทศไทย. 2002. "ชาเขียว" พืชมหัศจรรย์. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thaifitway.com/education/ndata/n2db/question.asp? qid=114 (4 ธันวาคม 2549).

ภัสสร สวาทะสุข, เครือวัลย์ อ่อนทอง และ สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2543. ผลของสารสกัดลูกใต้ใบต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2543 ครั้งที่ 38. วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2536. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ: เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด. 330 น.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน. 2548. พืชสมุนไพร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.nan.rmutl.ac.th/webvijai/research/plantshow.php?Category =xml& No=30 (30 เมษายน 2550).

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ ,นันทริกา ขันชื่อ. 2544. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อแอร์โรโมแนสไฮโดร ฟิลล่าในกบนา. เอกสารวิชาการ. ฉบับที่2

มารศรี เรืองจิตชัชวาล. 2547. สาหร่ายสไปรูลินา (Spirulina sp.). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.scithai.com/explore/content.asp?id=122&cat=22 (9 ตุลาคม 2549).

มาลัย วรจิตร และ มาลิน จุลศิริ. 2538. แบคทีเรียพื้นฐาน. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. หน้า205-208

มาลิน จุลศิริ และคณะ. 2538. สารสกัดละลายน้ำต้านจุลชีพจากเปลือกทับทิม: การศึกษาความแรงต้านจุลชีพและความคงตัว. วารสารเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล. 22(1): 1 – 7.

มาลิน จุลศิริ และคณะ. 2538. สารสกัดละลายน้ำต้านจุลชีพจากเปลือกทับทิม: การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนและเคมีเบื้องต้น. วารสารเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล.107 – 112.

มาลิน จุลศิริ และคณะ. 2538. สารสกัดละลายน้ำต้านจุลชีพจากเปลือกทับทิม: องค์ประกอบในยาบ้วนปากฆ่าเชื้อ. วารสารเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล. 22(4): 150 – 159

มาลิน จุลศิริ, อรษา สุตเธียรกุล, จิตต์กวี ปวโร และยุวดี วงษ์กระจ่าง. 2529. สารสกัดสมุนไพรเพื่อรักษาโรคอุจาระร่วง ผลต่อเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง. วารสารสาธารณสุขศาสตร์ 16(1): 69-73

เมฆ บุญพราพรหมณ์. 2527. การเลี้ยงปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 150 หน้า.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์, จารุวรรณ สมสิริ, ธนากรณ์ จิตตปาลพงศ์ และณฉัตรา วีระฉัตร. 2536.ผลของสารสกัดหนอนตายหยากที่มีผลต่อสัตว์น้ำบางชนิด. เอกสารวิชาการสถาบันประมงน้ำจืด 205-208.

ยนต์ ไชยมุสิก. 2529. การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. ภาควิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ:146 น.

ยอดยิ่ง เทพธรานนท์. 2540. วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำ และกุ้งอื่นๆ ในสกุล *Penaeus*: หลักการรายละเอียดของวัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและกำจัดโรคและผลของการใช้วัคซีนกับกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus). กรุงเทพฯ: บางแคการพิมพ์. 570 น.

เยาวนิตย์ ดนยดล และคณะ. 2530. ผลของมาลาไคท์กรีนต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดบางประการในปลากระพง. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา. 12 น. อ้างถึง Blaxhall, P.C., 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish. J. Fish Biol. 4: 593-604. Wedemeyer, G.A. and W.T. yasutake, 1977. Clinical methods for the assessment of the effect of environmental stress on fidh health. U.S. Dep. Inter fish Wildl. Serv. Tech. Pap. p 89:18.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 215 น.

รุ่งระวี เต็มศิณิฤทษ์กุล. 2536. สมุนไพรรักษาโรคเรื้อรังบางชนิด. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. น. 21-132.

รุ่งระวี เต็มศิริฤทธิ์, พร้อมจิต ศรลัมพ์, วงศ์สถิต ฉั่วกุล, วิชิต เปานิล, สมภพ ประธานธุรารักษ์ และนพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2545. สมุนไพรยาที่ควรรู้. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 176 น.

ลัดดา. 2548. สมุนไพรรักษาโรค. สำนักพิมพ์บ้านหนังสือ. 338 น.

ลัดดาวัลย์ ครองพงษ์. 2541. การใช้วิตามินซีทดแทนเตตร้าซัยคลินในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิลา เรืองแป้น. 2545. ปัญหายาปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง. วารสารการประมง. ปีที่55.ฉบับที่3. 203-207น.

ลิลา เรืองแป้น และชัยวุฒิ สุดทองคง. 2547. โรคที่พบในฟาร์มเลี้ยงและทำให้กุ้งตายจำนวนมากอย่างรวดเร็ว. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร. แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=102, 5 มีนาคม 2550.

ลิลา เรืองแป้น, สถาพร ดิเรกบุษราคม และ เยาวนิตย์ นพดล. 2543. ประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของการใช้พญายอ (Clinacanthus nutans) ป้องกันโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำ. ใน การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติครั้งที่ 2 " การยกระดับกุ้งไทยด้วยงานวิจัยและพัฒนา ". วันที่ 23-25 พฤศจิกายน2543 โรงแรมรอยัล ภูเก็ต ซิตี้. ภูเก็ต. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

วรวุฒิ ชัชวาลชัยพรรณ, มณฑิรา ถาวรยุติการต์ และ จิราพร เกษรจันทร์. 2541. การกระเทียมสดในการกำจัดพยาธิกรีการีนในกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง

วันดี กฤษณพันธ์. 2534. สมุนไพรสารพัดประโยชน์. ภาควิชาเภสัชวิจัย คณะเภสัชศาสตร มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 264 หน้า.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. เกร็ดความรู้สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เมดิคัล มีเดีย. 223 น.

วิกันดา ชัยบุตร. 2546. สารสกัดธรรมชาติ "YUCCA" แก้ปัญหาลดแอมโมเนียในบ่อกุ้ง.ซิตโต้ควา นิวส์ 1(3): 21-25.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. บริษัทโอเอสติ้งเฮ่าส์จำกัด. 32-551น.

วินิตย์ ชูแก้ว. 2539. การใช้สมุนไพรรักษาโรคติดเชื้อแอโรโมแนสในปลาดุกบิ๊กอุยโดยวิธีการแช่. แห่งชาติบางเขน กรุงเทพฯ. หน้า 1

วิษณุ บุญวิวัฒน์. 2542. โรคและความถดถอยทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกราม. สัตว์น้ำ 10(114): 101-104.

วีระสิงห์ เมืองมั่น. 2543. การใช้สมุนไพรรักษาโรคของผู้ใหญ่. กรุงเทพฯ: ธรรกมลการพิมพ์. 132 น.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. เภสัชกรรมไทยรวมสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.444-446 น.

ศราวุธ ชัยศรีสวัสดิ์. 2543. การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิล่า ในปลาดุกบิ๊กอุย. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 59 น

ศศวรรณ มงคลภาพ. 2537. สุคนธบำบัดและคุณประโยชน์จากเครื่องหอม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มายิก. น. 12-29.

ศิรินยา. 2547. พืชผักรักษาโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มิตรสัมพันธ์กราฟฟิค จำกัด. น. 38-51.

ศุภชัย นิลวานิช. 2543. กุ้งก้ามกราม. กรุงเทพฯ: พิมเณศ พริ้นติ้ง เซ็นเตอร์จำกัด. 98 น.

ศูนย์เกษตรกรรมบางไทร. 2548. ฟ้าทะลายโจร-ปัญจขันธ์ สุดยอดสมุนไพรแห่งปี 48. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http:// www.bangsaiagro.com/knowledge_detail.asp?news (29 พฤศจิกายน 2549).

ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 207 หน้า

ศูนย์พัฒนาการเรียนการสอน สถาบันพระบรมราชนก กระทรวงสาธารณสุข. 2548. สมุนไพรในงานสารธารณสุขมูลฐาน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.centered.pbri.net/.../jantaburee/web/p10.htm (24 ตุลาคม 2549).

ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีเชียงราย กรมปศุสัตว์. ม.ป.ป.. เครื่องยา. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.dld.go.th/trcr_cri/Samunpri/Samunpai1.htm (4 ธันวาคม 2549).

ศูนย์ศึกษาพันธุ์สัตว์น้ำและพรรณไม้เฉลิมพระเกียรติ. 2551. ระบบออนไลน์. www.wpm.ac.th/fish/fish_data/Nile_tilapia.html (12 กันยายน 2551)

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2547. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2544. กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 96 น.

ศูนย์สารสนเทศกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย. 57 น.

สถาบันการแผนไทย. ม.ป.ป.. เทียนบ้าน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ittm.dtam.moph.go.th/Service/herb_data/herb_ssm21.htm (4 ธันวาคม 2549).

สถาพร ดิเรกบุษราคม และ อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์. 2535. ผลของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งต่อเชื้อวิบริโอที่แยกจากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง, 16-18 กันยายน 2535. น. 259 - 262

สถาพร ดิเรกบุษราคม, อังคณา หิรัญสาลี, สิทธิ บุณยรัตนผลิน, เยาวนิตย์ ดนยดล และอุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์. 2536. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญายอต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ 8/2536, สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 7 น.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, อังคณา หิรัญสาลี และ ลิลา เรืองแป้น. 2539ก. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ. สงขลา: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 7 น.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, อังคณา หิรัญสาลี และ สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์. 2539ข. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรเก้าชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. สงขลา: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 7 น.

สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2540. สมุนไพรกับการเลี้ยงกุ้ง. ข่าวกรมประมง 21(4): 11–15.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, เครือวัลย์ อ่อนทอง, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ และ นิพัทธ์ โชติการ. 2540. ฤทธิ์ของสารสกัดจาก สมุนไพรบางชนิดต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. น. 145 - 150.

สถาพร ดิเรกบุษราคม, ชาญเดช วังสะวิบูลย์ และ เยาวนิตย์ นพดล. 2541. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบฝรั่งและออกซีเตตราซัยคลินในการกำจัดแบคทีเรียเรืองแสง

ในกุ้งกุลาดำ. น. 144-151. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 36, 3-5 กุมภาพันธ์ 2541. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สนั่น ศุภธีรสกุล. ม.ป.ป.. กะเม็ง: สมุนไพรที่ไม่ควรมองข้าม. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.herbal.pharmacy.psu.ac.th/.../10-44/Eclipta.htm (9 ตุลาคม 2549).

สมพงศ์ สุวรรณทศ. 2546. กลวิธีการเพาะและอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย. การประมง 56(3): 207-225.

สมพร ภูติยานัน. 2542. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. น. 220-222.

สมพร หิรัญรามเดช. 2526. ตำราตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพร เล่มที่ 5. กรุงเทพฯ: กรุงสยามการพิมพ์. 312 น.

สมศักดิ์ พรหมศาสตร์. 2540. การใช้สมุนไพรรักษาโรคแอโรโมแนสในปลาดุกบิ๊กอุยโดยวิธีผสมอาหาร ตอนที่ 2. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 52 น.

สวนดอกไม้ประดับออนไลน์. 2549. ต้อยติ่ง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.medplant.mahidol.ac.th (8 มกราคม 2550).

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ม.ป.ป.ก. น้อยหน่า. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/..%5Cpubhealth%5Cannona.html (8 สิงหาคม 2549).

สำลี ใจดี, สุนทรี วิทยานารถไพศาส, ระพีพล ภโววาท, จิราพร ลัปนานนท์, พิยดา เกียรติยิ่งอังศุลี และ วิทิต วัณนาวิบูล. 2542. การใช้สมุนไพร เล่มที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ:โครงการพัฒนาเทคนิคการทำสมุนไพร. 200 น.

สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2534. การใช้ยาและสารเคมีป้องกันและกำจัดโรคสัตว์น้ำ. การประมง: 509–522.

สิริ ทุกขีวินาศ. 2545. แนวทางการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างมีความรับผิดชอบตาม Code of Conduct.การประมง 55(6): 551-554.

สุกัญญา บุญกล่อม และ สุนทรี ทวีเขตต์. 2540. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแทนนินจากใบไม้ 5 ชนิด. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://library.rits.ac.th/journal/s540338.html (26 ตุลาคม 2549).

สุคนธ์ พูนพัฒน์ และคณะ. 2532. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 2 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 243 หน้า.

สุจิตรา สหัสนฤภัยพงษ์. 2540. การศึกษาประสิทธิภาพของ Tea Polyphenol ในการป้องกันโรควิบริโอซิสในกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 90 น.

สุปราณี ชินบุตร. 2545. ยาตกค้างในเนื้อกุ้ง. การประมง 55(3): 213-214.

สุพจน์ ศิลานเภสัช. 2543. สมุนไพรเครื่องเทศและพืชปรุงแต่งกลิ่นรส. กรุงเทพฯ: ประพันธ์สาส์น จำกัด. น. 22-125.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2542. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: พิมพ์ดีจำกัด. 128 น.

สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน. กรุงเทพฯ: ศิริยอด. 248 น.

โสภา อารีรัตน์ และสุปราณี ชินบุตร. 2528. ผลของ Aeromonas hydrophila ที่มีต่อเนื้อเยื่อของปลาดุกด้าน. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน กรุงเทพฯ. 4 หน้า.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์. 2544. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำแช่แข็ง. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 96 น.

องอาจ หาญชาญเลิศ, ฉลองชัย แบบประเสริฐ และ ยิ่งยง ไพสุขศานติ. 2536. พืชสมุนไพร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ku.ac.th/AgrInfo/plant/plant2/p016.html (24 ตุลาคม 2549).

อรรถชัย คันธะชุมภู. 2545. ความแปรปรวนและประสิทธิภาพของใบบัวบกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Aeromonas hydrophila. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 28 น.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และ มะลิ บุณยผลิน. 2539. การพัฒนาคุณภาพอาหารเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยวิตามินซี. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2539, กองควบคุมและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ กรมประมง. กรุงเทพฯ. 10น.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และ โสภณ อ่อนคง. 2539. การละลายของออกซีเตตร้าซัยคลินจากอาหารสำเร็จรูปชนิดจมน้ำ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2539, กองควบคุมและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำ กรมประมง. กรุงเทพฯ. 12 น.

อนันตภัทร บุญยะกมล. 2541. ประสิทธิภาพของกระเทียมและกานพลูในการรักษาโรคแอโรโมนาสโดยวิธีการแช่. เชียงใหม่: ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 59 น.

อภินันท์ สุวรรณรักษ์ และจิราพร โรจน์ทินกร. 2547. การทดสอบประสิทธิภาพสมุนไพรไทยบางชนิดต่อเชื้อแอโรโมแนส ไฮโดรฟิลล่า. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อัคนี นวรัตน. 2527. การตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคปลา. วารสารโรคสัตว์น้ำ. 7(3): 139 – 152.

อังคณา หิรัญสาลี. 2546. ใช้สมุนไพรไทยต้านไวรัสหัวเหลือง. สัตว์น้ำเศรษฐกิจ 2(8): 69-72.

อังคณา หิรัญสาลี. 2545. สมุนไพรที่ใช้ในกุ้ง สมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมผลิตสัตว์. โรงพิมพ์แสงเทียนการพิมพ์.กรุงเทพฯ. 133 หน้า

อัญชลี ธำมรงค์คงสถิต และจิราพร โรจน์ทินกร. 2549. ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม. รายงานการประชุมทางวิชาการทางการประมง. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรธนะ, ถวิล จอมเมือง, อารมย์ แสงวนิชย์; 2540. " การสกัดและแยกสารลิโมนีนตามแหล่งต่างๆ" รายงานประจำปี กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการเกษตร 12 หน้า.

อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, วินัย กระจายวงศ์ และสิทธิ บุณยผลิน. 2538. การตกค้างของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินในกุ้งกุลาดำและตะกอนดินจากฟาร์มขนาดต่างๆ ในจังหวัดสงขลา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2538, , สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. กรุงเทพฯ. 8 น.

Abutbul, S., A. Golan-Goldhirsh, O. Barazani and D. Zilberg. 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). Aquaculture 238: 97-105.

Arias, M. E., J. D. Gomez, N. M. Cudmani, M. A. Vattuone and M. I. Isla. 2004. Antibacterial active of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. Ex Hook et Arn. Life Sciences 75: 191-202.

Battinalli, Lucia, Beatrice Tita, Maria Grazia Evandri and Gabriela Mazzanti. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. Extracts. It farmaco 56: 345-348.

Bioluminescence, La. 2004. Organismes. [online]. Available http//www.ascussat.free.fr/organisms.htm (14 October 2006).

Boquene, G, Galgani, F.; 1998. " Biological effects of contaminants; Cholinesterase inhibition by Organophosphates and Carbamate Compounds". ICE techniques in Marine Environmental Sciences, 10 pp.

Braga, L. C., J. W. Shupp, C. Cummings, M. Jett, J. A. Takahashi, L. S. Carmo, E. Chartone Souza and M. A. Nascimento. 2005. Pomegranate extract inhibits *Staphylococus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. Ethnopharmacology 96: 335-339.

Cheng, Winton, Chun-Hung Liu, Chih-Hsin Cheng and Jiann-Chu Chen. 2001. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of *Macrobrachium rosenbergii* in relation to size and molt stage. Aquaculture 198: 387-400.

Christofilogiannis. P. 2001. Current inoculation methods in MIC determination. Aquaculture, 169: 297–302.

Ellman , Gl.; Courney, K.D.; Fratherstone, Andres and R.M.; 1961. " A new and rapid Colorimetric determination of acetylcholinesterase activity"., Biochem. Phamacol., 7, 88-95.

Fai, P. B. A. and S. O. Fagade. 2005. Acute toxicity of *Euphorbia kamerunica* on *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 62: 123-131.

Finney, D.J.; 1971. Probit Analysis, 2 nd edition, Cambridge U., Press, London, 333 pp.

Germano, M. P., V. D Angelo, R. Sanogo, S. Catania, R. Alma, R. De O. Parquale and G. Bisignano. 2005. Hepatoprotective and antibacterial effects of extracts from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). Ethnopharmacology 96: 227-232.

Gislene, Nascimento G. F., Juliana Locatelli, Paulo C. Freitas and Giuliana L. Silva. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant acteria. Microbiology. 31: 247-256.

Immanuel, G., V. C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam and M. P. Marlan. 2004. Effect of butanalic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (Vibrio parahaemolyticus) load on shrimp *Peneaus indicus* juveniles. Aquaculture 236(1-4): 53-65.

Inglis, Valerie, Ronald J. Roberts and Niall R. Bromage. 1993. Bacterial diseases of fish.Oxford: Blackell Scientific Publications. 312 pp.

Inya-Agna, S.J.; Ogantimein, B.O.; Sofowora, A.; Benjamin, T.V.; 1987. In J. Crude Drug Res., 25(1), 49-52.

Kim R. Finer. 1997. Evaluation of Natural Compounds for Antimicrobial Activity in the Introductory Microbiology Laboratory. The American Biology Teacher 59(1): 44-47.

Kloucek, P., Z. Polesny, B. Svobodova, E. vlkova and L. Kokoska. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. Ethnopharmacology 99: 309-312.

Lightner D.V. 1979. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture and Fisheries Science. Vol 6.

M.E. Arias, J.D. Gomez, N.M. Cudmani, M.A. Vattuone, M.I. Isla. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. Ex Hook et Arn. 2003. Buenos Aires, Argentina.

Magnus, Karen. no date. Hemocyanin. [online]. Available http://www.moray.ml. duke.edu/projects/Magnus/images (2 May 2007).

Machigashira AS, Abe S and Ito S. 1991. Effects of L-scorbic acid-2-phosohate-magnesium on *Penaeus monodon*. Kagoshima Aquaculture & Laboratory. Mitsui orin Marine Product Development Co.,Ltd., Kagoshima, Japan. 5 p.

Magarelli PC, Hunter B, Lightner DV and Colvin LB. 1979. Black Death : an ascobic acid defficiency in Penaeid shrimp. Comp Biochem. Physiol. 6A: 103-108.

Makino K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. [online]. Available http://www.wishart.biology. ualberta. ca/BacMap/cgi/getSpe (14 October 2006).

Meesungnoen, Jintana, Jean-Paul Jay-Gerin and Samlee Mankhetkorn. 2002. Relation between MDR1 mRNA levels, resistance factor, and the efficiency of P-glycoprotein-mediated efflux of pirarubicin in multidrug resistant K562 sublines. Physiol. Pharmacol 80: 1054-1063.

MSDS for Aquasolv. "Limonene HF".; 2001. Last Revision, 24 May 2001 .(3 pp.)

NICNAS (National Industrial Chemical Notification and Association Scheme); Limonene, Priority Existing Chemical Assessment Report No. 22, May, 2002. Commonwealth of Australia 2002., (ISBN 0 642 501904.)

Ponce – de- Leon, -El; dela – Rosa, -L.D.; 1995. "Botanical pesticides for rice blackBug Scotinophora Coarctata) control". Philippine Journal of crop science (Philippines), May, 1993, 18, (Supplement no. 1), 39, Issued Jun. 1995.

Ponce, A. G., R. Fritz, C. del Valle and S. I. Roura. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensm.–Wiss. m-Technol 36: 679-684.

Shanna L. Siegel; T. Lindsay Lewis, Niraj K. Tripathi, Victoria V. Burnley and Kenneth S. Latimer. 2002. Ulcerative Bacterial Dermatitis of Koi (Cyprinus carpio) and Ornamental Goldfish (Carassius auratus auratus). [online]. Available http:// www.vet.uga.edu/VPP/Undergrad/Siegel/index.php (14 October 2006).

Singh, Digvijay and Ajiay Shingh. 2005. The toxicity of four native Indian plants: Effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. Chemosphere 60: 135-140.

Sivaram, V., M. M. Babu, G. Immanuel, S. Murugadass, T. Citarasu and M. P. Marian. 2004.With herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture: 629 -502

Sung, Hung-Humg, Su-Ching Lin, Wen-Liang Chen, Yun-Yuan Ting and Wei-Liang Chao. 2003. Influence of TimsenTM on Vibrio population of cluture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 219: 123-133.

Upper Midwest Environmental Sciences Center. 2006. Oxytetracycline. [online]. Available http// www.umesc.usgs.gov/.../oxytetracycline.html (4 May 2007).

Vanerkar, A. P., Shanta Satynryan, and D. M. Dharmadhikari. 2004. Toxicity of Herbal Pharmaceutical Wastewater on Fish-Lebistes reticulates (Peter). Environmental science and health 1(B39): 115-123.

Vidal, Alexis, Adyary Fallarero, Blanca R. Pena, Maria E. Medina, Bienvenido Gra, Felicia Rivera, Yamilet Gutierrez and Pia M. Vuorela. 2003. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. Ethnopharmacology 89: 295-300

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การนำเสนอผลงานวิชาการ 1

การประชุมวิชาการประจำปี พ.ศ.2547 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16

"นวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ : หนึ่งทางเลือกเพื่อยกระดับสู่ครัวของโลก"
วันที่ 12-15 ธันวาคม 2547
ณ โรงแรมทีอปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก

ใบตอบรับ

เรียน คุณจิราพร โรจน์ทินกร

ตามที่ท่าน ได้จัดส่งผลงานวิจัยเพื่อนำเสนอใน การประชุมวิชาการประจำปี พ.ศ.2547 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 ณ โรงแรมทีอปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 12-15 ธันวาคม 2547 บัดนี้ คณะกรรมการวิชาการได้พิจารณาผลงานวิจัยของท่านและเห็นสมควรให้

☐ ร่วมประชุม

☑ ร่วมประชุมและเสนอผลงานวิชาการ ☐ โปสเตอร์ ☑ บรรยาย

โดยผลงานของท่านเรื่อง **"การสำรวจหาสมุนไพรไทยต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (Macrobrachium resenbergii)"**

จัดอยู่ในกลุ่ม Food and Agricultural Biotechnology หมายเลขอ้างอิง O-FB-023

และได้รับเงินค่าลงทะเบียน เป็น จำนวนเงิน 1700 บาท (-หนึ่งพันเจ็ดร้อยบาทถ้วน)

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ พันธ์ณรงค์ จันทร์แสงศรี)
ประธานคณะกรรมการฝ่ายวิชาการ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทร. 0-5526-1000 ต่อ 2703 โทรสาร 0-5526-1987

สมุนไพรไทยต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium resenbergii*)

จิราพร โรจน์ทินกร[1], ศรีกาญจนา คล้ายเรือง[2], จงกล พรมยะ[1], สถาพร ดิเรกบุษราคม[3]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
[3]สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์น้ำ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

บทคัดย่อ

การรักษาโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาที่สำคัญ คือ สารตกค้างในผลิตภัณฑ์ประมง อีกทั้งยังเป็นข้อห้ามที่สำคัญในการเกษตรระบบอินทรีย์ (organic production) หรือระบบ COC (Code of Conduct) การใช้สมุนไพรเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกที่สำคัญในการแก้ปัญหานี้ งานวิจัยนี้ทำการสำรวจหาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญของกุ้งก้ามกราม ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio parahaem- lyticus* (VP) และ *V. harveyi* (VH) จากสมุนไพรไทย 80 ชนิด พบว่า สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ อบเชย กานพลู ฝาง เจตมูลเพลิงแดง ฝรั่ง ว่านหางจระเข้ กระเทียม พริกแดง สะระแหน่ เทียนตาตั๊กแตน น้อยหน่า ฟ้าทะลายโจร มะระหวาน ชุมเห็ดเทศ ชะพลู ผักเผ็ด กะเพรา และจาสาบเสือ สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้แก่ มังคุด บัวบก กระชายม่วง เชียงดา เทียนบ้าน สาบเสือ สะเดา มะกรูด ถั่วฝักยาวไมยราบ และโหระพา สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง VP ชนิดเดียว ได้แก่ ขลู่ หนุมานประสานกาย และยอ สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง VH ชนิดเดียว ได้แก่ ขมิ้น ข่า และหม่อน สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AH ชนิดเดียว ได้แก่ จันทน์แปดกลีบ กระชาย ขิง รางจืด ดอกบัวหลวง มะแว้ง ต้อยติ่ง และผักปั้ง

คำสำคัญ : กุ้งก้ามกราม, *Macrobrachium resenbergii*, สมุนไพรไทย, ต้านแบคทีเรีย, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*

Screening of Thai Herbs for Anti- bacterial Pathogens in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium resenbergii*).

Jiraporn Rojtinnakorn[1], Srikanjana Klayraung[2], Jongkol Promya[1], Sataporn Direkbusarakom[3]

[1] Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Production, Maejo University
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University
[3] Program in Technology of Aquatic Animal Production, Institute of Agricultural Technology, Walailak University

Abstract

Using antibiotics in aquaculture to disease control and treatment has been being the critical problem recently, causing antibiotic residues in fishery products and serious irregular point in organic production or COC (Code of Conduct) system. The most efficient alternative strategy to substitute those antibiotics is considered to be herb application. This study was screen of Thai herbs that reveal effective to the particular bacterial pathogens of giant freshwater prawn; *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) and *V. harveyi* (VH). Among 80 experimental herbs, showing inhibition against 3 pathogens was such as cinnamon, clove, sappan wood, rose colored leadwort, guava, aloe, garlic, red chili, spearmint, dill, custard apple, kalmegh, chayote, ringorm bush, betel, Para cress, basil, and guacos. Showing inhibition against *Vibrio* spp. was such as mangosteen, Asiatic pennywort, purple fingerroot, gymnema, garden balsam, Siam weed, magosa, kaffir, cowpea, sensitive plant, and sweet basil. Showing inhibition against VP alone was such as Indian marsh fleabane, hanuman prasankai, and noni. Showing inhibition against VH alone was such as turmeric, galingale, and mulberry. Showing inhibition against AH alone was such as Chinese star anise, fingerroot, ginger, blue trumpet vine, lotus, small eggplant, ruelia, and woolly morning glory.

Key words : Giant freshwater prawn, *Macrobrachium resenbergii*, Thai herbs, Antibacteria, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*

Introduction

Shrimp and prawn culture is the major fishery production of Thailand. In the past few years, the residues of chemotherapeutic agents, particularly antibiotics such as chloramphenical and oxytetracyclin, have been being the most serious problem for international trade. For super-intensive system of shrimp culture, prophylaxis and disease treatment are crucially emphasized. Chemicals and antibiotics have been applied by feed additive or bathing with unwarily to over dose and/or concentration. Influentially, the disadvantage is risk to environment as reservoir of discharged wastewater and to human health as final consumer.

In order to decrease using of such chemicals, enhancing health of aquatic animals, for instant nutritional supplement using vitamins ((Magarelli *et al.*, 1979; Lightner *et al.*, 1979; Machigashira *et al.*, 1991; Sermwatanakul and Boonyapalin, 1996; Cuzon *et al.*, 2004) immunostimulant (Itami *et al.*, 1998) and probiotics (Rengpipat *et al.*, 2000; Chythanya *et al.*, 2002; Alavandi *et al.*, 2004) have been being considered.

Several herbs and their extracts are use as alternative effective natural medicines of antimicrobial diseases for many thousand years. However its application in aquaculture has been being less reported, including from Thai researchers. In China, dried plant has been directly added with feed or immersed in culture pond (Liping, 1994). In Thailand, Dirakbusarakom *et al.* (1996) reported that guava and bitter malon showing strong antivibrios. In India, antibacterial activity and toxicity of certain ayurvedic herbs were reported to aquatic pathogens and culturing animals (Immanuel *et al.*, 2004; Mottakin *et al.*, 2004)

This study was screening local Thai plants for their antibacterial against 3 particular pathogens in giant freshwater prawn, in order to substitution of antibiotic application. Among 80 plants, 30 species revealed inhibition activity against 2 or 3 bacterial pathogens.

Materials and Methods

1. Microbes

Three particular pathogens; *Aeromonas hydrophila, Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi,* were kindly supported by The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Co-operatives.

2. Herbs and Extraction

Selected herbs were dried at 50^{O}C and 5 g. were immersed in 50 ml. of 50 % ethanol at 4^{O}C for overnight. Half of solution was filtrated with filter paper No.4, as Treatment 1. The other half part was incubated at 70 ^{O}C for 1 hour and filtrated, as Treatment 2.

3. Inhibition Test

Inhibition activity was tested by disc diffusion method, using NA for *A. hydrophila* and NA with 1.5% NaCl for *Vibrio* spp.

Result

The list of herbs showing positive inhibition against 2 or more bacteria was in table bellowed.

Inhibition zone of herbal extracts against bacterial pathogens of *M. resenbergii*

Herbs	pH		Clear zone (mm)					
			Aeromonas hydrophila		*Vibrio parahaemolyticus*		*Vibrio harveyi*	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1. **cinnamon** *Cinnamonum* sp.	4.76	7.82	-	9.92	12.10	12.72	6.25	-
2. **clove** *Eugenia aromatica* Ktze.	4.48	4.62	8.66	13.58	18.57	9.65	9.03	8.05
3. **sappan wood** *Caesalpinia sappan* L.	5.21	4.83	9.08	9.51	14.70	8.23	9.12	10.83
4. **rose colored leadwort** *Plumbago indica* Linn.	4.83	4.72	17.52	16.13	21.10	16.47	24.15	22.50
5. **guava** *Psidium guajava* L.	5.86	5.81	7.03	7.48	9.18	8.33	9.03	9.60
6. **aloe** *Aloe vera* L. Burm. f.	7.49	6.59	7.03	7.80	9.3	6.0	8.0	6.93
7. **garlic** *Allium sativum* Linn.	6.95	6.71	11.53	11.1	17.58	13.4	19.8	18.17
8. **red chili** *Capsicum sp.*	5.40	5.12	9.50	8.00	-	6.05	-	7.20
9. **spearmint** *Mentha condifolia* Opiz.	6.21	6.18	8.50	10.46	-	8.6	-	8.15
10. **dill** *Anethum graveolens Linn.*	6.81	6.13	10.81	-	7.35	7.60	6.40	6.51
11. **custard apple** *Annonasquamosa*L.	5.20	5.12	9.4	-	-	9.71	7.10	6.30
12. **kalmegh** *Andrographis paniculata* Wall.	7.44	7.14	9.45	-	7.40	-	6.80	-
13. **chayote** *Sechium edule* Sw	5.63	5.71	9.42	-	11.10	8.35	7.70	7.20
14. **ringworm bush** *Cassia alata* Linn	6.01	6.09	13.20	8.36	13.00	12.82	13.00	14.28
15. **betel** *Piper sarmentosum* Roxb.ex Hunter	6.17	5.79	11.75	7.73	12.73	7.20	10.45	8.50
16. **Para cress** *Spilanthes paniculata*	5.79	6.09	7.95	6.80	8.28	11.05	8.00	11.63
17. **basil** *Ocimum sanctum,* Linn	6.02	6.01	9.50	7.00	-	6.07	8.70	-
18. **sweet basil** *Ocimum basilicum* Linn.	4.71	4.41	-	-	6.93	-	-	6.00
19. **gauco** *Mikania guaco*	5.52	5.63	7.20	6.80	7.85	8.07	8.18	8.75
20. **mangosteen** *Garcinia mangostana* L.	4.68	4.24	-	-	8.83	6.80	8.40	6.96
21. **Asiatic penny wort** *Centella asiatica* (L.) Urb.	5.10	5.05	-	-	6.6	-	9.0	6.45
22. **purple fingerroot** *Boesenbergia* sp.	7.05	7.23	-	-	8.9	9.12	8.96	7.72
23. **garden balsam** *Eupatorium Odoratum* Linn.	5360	5.64	-	-	7.68	8.56	8.95	11.3
24. **magosa** *Azadirachta indica* A. Juss	5.42	5.48	-	-	8.06	8.33	8.43	8.88
25. **Kaffir** *Citrus hystrix* DC.	4.68	5.23	-	-	8.30	10.40	-	9.05
26. **Cowpea** *Vigna unguiculata* (L.) Walp.	5.50	5.68	-	-	6.25	6.85	6.27	6.50
27. **sensitive plant** *Mimosa pudica* L.	4.62	4.90	-	-	8.00	-	-	7.55
28. **hanuman prasankai** *Schefflera leucantha* Viguier	5.55	.527	-	-	13.6	14.0	-	-

Summary and Discussion

Interestingly, it is resulted that at least 28 species of Thai herbs might be been effectively available to substitute antibiotics for prevent and treatment of bacterial diseases in giant prawn culture. Their activities and effective ingredients will be analyzed in further study.

Acknowledgement

The authors are grateful to The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Department of Fisheries for supporting the bacteria. The research was funded by National Research Council of Thailand (NRCT).

References

Alavandi SV, Vijayan KK, Santiago TC, Poornima M, Jithendran KP, Ali SA and Rajan JJS. 2004. Evalution of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 17(2):115-120.

Chythanya R., Karunasagar I and Karunasagar I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture 208(1-2):1-10.

Cuzon G, Lawrence A, Gaxiola G, Rosas C and Guillaume J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture 235:513-551.

Dirakbusarakom S, Rungkomneradwong S, Herunsalee A and Rungpan L. 1996. Screeing of Thai traditional herbs against shrimp pathogenic bacteria. Technical paper no.7/1996. National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries.

Immanuel G, Vincybai VC, Sivaram V, Palavesam A and Marian MP. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture 236(1-4):53-65.

Itami T, Asano M, Tokushige K, Kubono K, Nakagawa A, Takeno N, Nishimura H, Maeda M, Kondo M and Takahashi Y. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture 164:277-288.

Lightner DV. 1979. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture and Fisheries Science. Vol 6.

Liping B. 1994. Herbs used in Chinese fish farms. AAHRI Newsletter Article 3(2) December 1994.

Magarelli PC, Hunter B, Lightner DV and Colvin LB. 1979. Black Death : an ascobic acid defficiency in Penaeid shrimp. Comparative Biochemical Physiology 6A: 103-108.

Mottakin AKM, Chowdhury R, Haider MS, Rahman KM, Hasan CM and Rashid MA. 2004. Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*. Fitoterapia 75(3-4):355-359.

Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S and Menasaveta P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). Aquaculture 191;271-288.

Sermwatanakul A and Boonyapalin M. 1996. Developing quality of Giant freshwater prawn feed using Vitamin C. Technical paper no.1/1996. Control and Development of Feed Division, Department of Fisheries, Thailand.

การนำเสนอผลงานวิชาการ 2

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

No. BIOTEC 5402/4058

8 September 2005

Dr.Jiraporn Rojtinnakorn
Faculty of Fisheries Technology
and Aquatic Resource,
Maejo University,
Nhong-han, Sansai, Chiangmai 50290
E-mail: jiraroj@mju.ac.th

Dear Dr.Jiraporn Rojtinnakorn,

In reference to your abstract submission titled **"Thai Herbs for Antibacterial Pathogens in Giant Prawn"**for poster presentation in The International Conference on Shrimp Biotechnology at BioThailand 2005: Biotechnology Challenges in the 21st Century at the Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC) in Bangkok, Thailand during 4-5 November 2005. The abstract has been reviewed by the Scientific Committee and has been accepted for poster presentation in The International Conference on Shrimp Biotechnology at BioThailand 2005.

Since **the full paper** will be published in the proceeding and distributed at the Conference, we request you to kindly email us your full paper as well as revised abstract by sending an email to **Ms.Jaruwan** at jaruwanm@biotec.or.th, **Ms.Nuchjaree** at nuchjaree.pis@biotec.or.th **and Ms.Siriporn** at siriporn@biotec.or.th **before 15 September 2005.**

The complete registration of at least one author is required in order for the abstract/full paper will be included in the Proceeding. Please register **before 15 September 2005**, on-line registration is available on http://biothailand2005.biotec.or.th/home/regis.htm. (If you have not done so). Each registrant is responsible for making his/her own hotel and transfer reservation.

Please do not hesitate to contact us if you have any inquiry. We are looking forward to see you in BioThailand 2005.

Yours sincerely,

Morakot Tanticharoen

Prof. Dr. Morakot Tanticharoen
Chairman of the Organizing Committee
and Director of BIOTEC

BioThailand2005 Secretariat
Tel : (66-2) 564 6700 Ext. 3442
Fax : (66-2) 564 6704
E-mail : siriporn@biotec.or.th

Thai Herbs for Antibacterial Pathogens in Giant Prawn.

Jiraporn Rojtinnakorn[1] and Sataporn Direkbusarakom[2]
[1]Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resource, Maejo University, Chiangmai, Thailand 50290
[2]Program in Technology of Aquatic Animal Production, Institute of Agricultural Technology, Walailak University, Thailand 80000

Abstract

Using antibiotics in aquaculture to disease control and treatment has been being the critical problem recently, causing antibiotic residues in fishery products and serious irregular point in organic production or COC or GAP systems. The most efficient alternative strategy to substitute those antibiotics is considered to be herb application. This study was screen of Thai herbs that reveal effective to the particular bacterial pathogens of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*); i.e. *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio parahaemolyticus* (VP) and *V. harveyi* (VH). Among 80 experimental herbs, showing inhibition against 3 pathogens was such as cinnamon, clove, sappan wood, rose colored leadwort, guava, aloe, garlic, red chili, spearmint, dill, custard apple, kalmegh, chayote, ringorm bush, betel, Para cress, basil, and guacos. Showing inhibition against *Vibrio* spp. was such as mangosteen, Asiatic pennywort, purple fingerroot, gymnema, garden balsam, Siam weed, neam, leech lime, cowpea, sensitive plant, and sweet basil. Showing inhibition against VP alone was such as Indian marsh fleabane, hanuman prasankai, and noni. Showing inhibition against VH alone was such as turmeric, galingale, and mulberry. Showing inhibition against AH alone was such as Chinese star anise, fingerroot, ginger, blue trumpet vine, lotus, small eggplant, ruelia, and woolly morning glory.

Introduction

Shrimp and prawn culture is the major fishery production of Thailand. In the past few years, the residues of chemotherapeutic agents, particularly antibiotics such as chloramphenical and oxytetracyclin, have been being the most serious problem for international trade. For super-intensive system of shrimp culture, prophylaxis and disease treatment are crucially emphasized. Chemicals and antibiotics have been applied by feed additive or bathing with unwarily to over dose and/or concentration. Influentially, the disadvantage is risk to environment as reservoir of discharged wastewater and to human health as final consumer.

In order to decrease using of such chemicals, enhancing health of aquatic animals, for instant nutritional supplement using vitamins ((Magarelli *et al.*, 1979; Lightner *et al.*, 1979; Machigashira *et al.*, 1991; Sermwatanakul and Boonyapalin, 1996; Cuzon *et al.*, 2004) immunostimulant (Itami *et al.*, 1998) and probiotics (Rengpipat *et al.*, 2000; Chythanya *et al.*, 2002; Alavandi *et al.*, 2004) have been being considered.

Several herbs and their extracts are use as alternative effective natural medicines of antimicrobial diseases for many thousand years. However its application in aquaculture has been being less reported, including from Thai researchers. In China, dried plant has been directly added with feed or immersed in culture pond (Liping, 1994). In Thailand, Dirakbusarakom *et al.* (1996) reported that guava and bitter malon showing strong antivibrios. In India, antibacterial activity and toxicity of certain ayurvedic herbs were reported to aquatic pathogens and culturing animals (Immanuel *et al.*, 2004; Mottakin *et al.*, 2004)

This study was screening local Thai plants for their antibacterial against 3 particular pathogens in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), in order to substitution of antibiotic application. Among 80 plants, 30 species revealed inhibition activity against 2 or 3 bacterial pathogens.

Materials and Methods

1. *Microbes*

Three particular pathogens; *Aeromonas hydrophila, Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi,* were kindly supported by The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Co-operatives.

2. *Herbs and Extraction*

Selected herbs were dried at 50°C and 5 g. were immersed in 50 ml. of 50 % ethanol at 4°C for overnight. Half of solution was filtrated with filter paper No.4, as Treatment 1. The other half part was incubated at 70 °C for 1 hour and filtrated, as Treatment 2.

3. *Inhibition Test*

Inhibition activity was tested by disc diffusion method, using NA for *A. hydrophila* and NA with 1.5% NaCl for *Vibrio* spp. Diameter of clear ring was measured. Each value was averaged from triplicate samples.

Result

The list of herbs showing positive inhibition against 2 or more bacteria was in table bellowed. The clear zone represented the activity of anti-bacterial pathogen.

Table 1 *Inhibition zone of herbal extracts against bacterial pathogens of Macrobrachium resenbergii*

Herbs	pH		Clear zone (mm)					
			Aeromonas hydrophila		*Vibrio parahaemo-lyticus*		*Vibrio harveyi*	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
aloe *Aloe vera* L. Burm. f.	7.49	6.59	7.03	7.80	9.30	6.00	8.00	7.37
Asiatic penny wort *Centella asiatica* (L.) Urb.	5.10	5.05	-	-	6.60	-	9.00	6.45
basil *Ocimum sanctum,* Linn	6.02	6.01	9.50	7.00	-	6.07	8.70	-
betel *Piper sarmentosum* Roxb. ex Hunter	6.17	5.79	11.75	7.73	12.73	7.20	10.45	8.50
blue trumpet vine *Thunbergia laurifolia* Lindl.	5.84	5.73	9.33	-	8.13	-	8.23	-
chayote *Sechium edule* Sw	5.63	5.71	9.42	-	11.10	8.35	7.70	7.20
cinnamon *Cinnamomum* sp.	4.76	7.82	-	9.92	12.10	12.72	6.25	-
Chinese star anise *Illicium verum* Hook.f.	4.26	4.28	9.75	-	-	-	-	9.08
clove *Eugenia aromatica* Ktze.	4.48	4.62	8.66	13.58	18.57	9.65	9.03	8.05
cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp.	5.50	5.68	-	-	6.25	6.85	6.27	6.50
custard apple *Annonasquamosa*L.	5.20	5.12	9.40	-	-	9.71	7.10	6.30
dill *Anethum graveolens* Linn.	6.81	6.13	10.81	-	7.35	7.60	6.40	6.51

Herbs	pH		Clear zone (mm)					
			Aeromonas hydrophila		*Vibrio parahaemo-lyticus*		*Vibrio harveyi*	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
fig *Solanum trilobatum* L.	5.43	5.40	8.10	9.70	-	-	6.25	-
fingerroot *Boesenbergia rotunda* (Linn.) Mansf.	6.42	6.33	-	9.85	-	-	-	-
galingale *Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.	6.16	6.00	-	-	-	-	-	10.03
garden balsam *Eupatorium Odoratum* Linn.	5360	5.64	-	-	7.68	8.56	8.95	11.3
garlic *Allium sativum* Linn.	6.95	6.71	11.53	11.1	17.58	13.4	19.8	18.17
ginger *Zingiber officinale* Roscoe	7.18	7.27	-	9.25	-	-	-	-
Goose-berry *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels.	3.71	3.15	7.36	-	-	-	-	8.12
guaco *Mikania guaco*	5.52	5.63	7.20	6.80	7.85	8.07	8.18	8.75
guava *Psidium guajava* L.	5.86	5.81	7.03	7.48	9.18	8.33	9.03	9.60
gymnema *Gymnema inodorum* Decne.	6.61	6.70	-	-	7.10	-	-	7.15
hanuman prasankai *Schefflera leucantha* Viguier	5.55	5.27	-	-	13.60	14.00	-	-
Indian marsh fleabane *Pluchea indica (Linn) Less.*	5.73	5.53	-	-	8.00	-	-	-
kalmegh *Andrographis paniculata* Wall.	7.44	7.14	9.45	-	7.40	-	6.80	-
Leech lime *Citrus hystrix* DC.	4.68	5.23	-	-	8.30	10.40	-	9.05
lotus *Nelumbo nucifera* Gaertn.	5.30	5.06	-	8.90	-	-	-	-
luk tai bai *Phyllanthus sp.*	4.95	4.93	7.32	-	15.26	-	-	-
mangosteen *Garcinia mangostana* L.	4.68	4.24	-	-	8.83	6.80	8.40	6.96
mulberry *Morus alba* L.	6.72	6.93	-	-	-	-	9.7	7.3
neam *Azadirachta indica* A. Juss	5.42	5.48	-	-	8.06	8.33	8.43	8.88
noni *Morinda citrifolia* L.	6.27	6.22	-	-	8.17	-	-	-
pak-pai *Polygonum odoratum* Lour.	5.71	5.55	-	7.30	-	-	6.85	-
para cress *Spilanthes paniculata*	5.79	6.09	7.95	6.80	8.28	11.05	8.00	11.63
purple fingerroot *Boesenbergia* sp.	7.05	7.23	-	-	8.9	9.12	8.96	7.72
red chili *Capsicum sp.*	5.40	5.12	9.50	8.00	-	6.05	-	7.20
ringworm bush *Cassia alata* Linn	6.01	6.09	13.20	8.36	13.00	12.82	13.00	14.28

Herbs	pH		Clear zone (mm)					
			Aeromonas hydrophila		*Vibrio parahaemo-lyticus*		*Vibrio harveyi*	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
rose colored leadwort *Plumbago indica* Linn.	4.83	4.72	17.52	16.13	21.10	16.47	24.15	22.50
ruelia *Hygrophila erecta* Hochr.	7.00	6.85	-	8.80	-	-	-	-
sappan wood *Caesalpinia sappan* L.	5.21	4.83	9.08	9.51	14.70	8.23	9.12	10.83
sensitive plant *Mimosa pudica* L.	4.62	4.90	-	-	8.00	-	-	7.55
Siam weed *Chromolaena odorata* (Linn.)	5.36	5.64	-	-	7.68	8.56	8.95	11.3
spearmint *Mentha condifolia* Opiz.	6.21	6.18	8.50	10.46	-	8.6	-	8.15
star gooseberry *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels	3.71	3.15	7.36	-	-	8.12	-	-
sweet basil *Ocimum basilicum* Linn.	4.71	4.41	-	-	6.93	-	-	6.00
turmeric *Curcuma longa Linn.*	5.67	5.63	-	-	-	-	-	9.38
woolly morning glory *Impomoea reptans* Poir. (Syn.)	6.31	6.09	-	6.33	-	-	-	-

Herbs, which didn't show anti-bacterial pathogen to all three pathogen, were Siam cardamom (*Amomum krervanh* Pierre.), jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), safflower (*Carthamus tinctorius* L.), cumin (*Carum carri* Linn.), parsley (*Coriandrum sativa* Linn.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), gout stalk (*Jatropha podagrica* Hook. f.), galangal (*Kaempferia galanga* Linn.), cat-clow mimosa (*Mimosa pigra* L.), bitter cucumber (*Momordica charantia* Linn.), nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.), fragant screw-pine (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), screw-pine (*Pandanus tectorius* Blume), betel pepper (*Piper betle* L.), Idian long pepper (*Piper chaba* Hunter), black pepper (*Piper nigrum* L.), Thai copper pod (*Senna siamea* (Lam.) Irwin & Barneby), bo-ra-pet (*Tinospora crispa* Miers ex Hook.f. & Thoms), and wheat (*Triticum aestivum* L.).

Summary and Discussion

Interestingly, it is resulted that at least 46 species of Thai herbs might be been effectively available to substitute antibiotics for prevent and treatment of bacterial diseases in giant prawn culture. Their effectives and application root have being been analyzed.

These results will be useful for organic aquaculture program. Furthermore it is not only available for freshwater prawn culture but also applicable for estuarine shrimp and fish as well.

Acknowledgement

The authors are grateful to The Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Department of Fisheries for supporting the bacteria. The research was funded by National Research Council of Thailand (NRCT).

References

Alavandi SV, Vijayan KK, Santiago TC, Poornima M, Jithendran KP, Ali SA and Rajan JJS. 2004. Evalution of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 17(2):115-120.

Chythanya R., Karunasagar I and Karunasagar I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture 208(1-2):1-10.

Cuzon G, Lawrence A, Gaxiola G, Rosas C and Guillaume J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture 235:513-551.

Dirakbusarakom S, Rungkomneradwong S, Herunsalee A and Rungpan L. 1996. Screeing of Thai traditional herbs against shrimp pathogenic bacteria. Technical paper no.7/1996. National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries.

Immanuel G, Vincybai VC, Sivaram V, Palavesam A and Marian MP. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture 236(1-4):53-65.

Itami T, Asano M, Tokushige K, Kubono K, Nakagawa A, Takeno N, Nishimura H, Maeda M, Kondo M and Takahashi Y. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture 164:277-288.

Lightner DV. 1979. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture and Fisheries Science. Vol 6.

Liping B. 1994. Herbs used in Chinese fish farms. AAHRI Newsletter Article 3(2) December 1994.

Magarelli PC, Hunter B, Lightner DV and Colvin LB. 1979. Black Death : an ascobic acid defficiency in Penaeid shrimp. Comparative Biochemical Physiology 6A: 103-108.

Mottakin AKM, Chowdhury R, Haider MS, Rahman KM, Hasan CM and Rashid MA. 2004. Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*. Fitoterapia 75(3-4):355-359.

Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S and Menasaveta P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). Aquaculture 191;271-288.

Sermwatanakul A and Boonyapalin M. 1996. Developing quality of Giant freshwater prawn feed using Vitamin C. Technical paper no.1/1996. Control and Development of Feed Division, Department of Fisheries, Thailand.

การนำเสนอผลงานวิชาการ 3

The 18th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology
Biotechnology : Benefits & Bioethics (B^3)
November 2-3, 2006, Bangkok, Thailand

October 10, 2006

Re: Confirmation of Registration

Dear Delegate,

We are pleased to confirm your registration for The 18th Annual Meeting of the TSB / The JSPS Grant-in-Aid-for Scientific Research Symposium that will be held in Bangkok, Thailand during November 2-3, 2006 in the Montien Riverside Hotel.

1. Registration Status: **Incomplete Registration** (Registration Code: will be informed)
2. Payment Received: Total Amount: - Baht
3. Participation Status:
   - [x] Poster Presentation: Poster Number **IX-P-21**
     The poster must be presented on the providing board (please refer to www.tsb2006.net for the suggested poster size) by the morning of November 2, 2006.
     Title: POMEGRANATE EXTRACT SUBSTITUES ANTIBIOTICS FOR BATH TREAT IN AQUACULTURE
     Authors: Jiraporn Rojtinnakorn
   - [ ] Oral Presentation: Oral Presentation Number
     Session:
     Date: Time:
   - [ ] Only attending
4. Editing of your extended abstract for the proceedings (if you have submitted one)
   Your paper is being edited by our scientific committee. We will return your paper to you as soon as possible, if revision and resubmission are required.

Please present this confirmation letter at the registration desk when you pick up your conference materials and receipt on November 2, 2006.

In all future contacts, please kindly refer to the Registration Code provided herein.

We look forward to seeing you at the meeting.

Sincerely yours,

Asst. Prof. Cheunchit Boonchird, Ph.D
Chairperson of Organizing Committee

Registration: Dr. Pramvadee Y. Wongsaengchantra (headscbt@mahidol.ac.th)
Secretariat: Dr. Isada Lengwehasatit (scilw@mahidol.ac.th)
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University
Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
Tel: +66 (0) 2354-7145 Fax: +66 (0) 2354-7160

POMEGRANATE EXTRACT SUBSTITUES ANTIBIOTICS FOR BATH TREAT IN AQUACULTURE

Jiraporn Rojtinnakorn[*1]

[1]*Department of Fisheries Technology and Aquatic Resource, Maejo University University, Nhong-han, Sansai, Chiangmai 50290, Thailand*

Pomegranate (*Punica granatum* L . var.) extract with 50% ethanol showed efficacy to inhibit the significant bacterial pathogens; *Aeromonas hydrophila* (AH), *Vibrio harveyi* (VH) and *V. parahaemolyticus* (VP). Activity, efficiency and toxicity tests of the extract against the three pathogens were investigated. Activity test by agar disc diffusion revealed modulate level with 10-12 mm clear zone side. Efficiency test by total plate count for MIC/MBC value showed MIC = 3-9 ppt and MBC = 15-20 ppt. Toxicity value by LC_{50} at 96 h technique resulted 1.05 ppt for tilapia fry and 4.30 ppt for juvenile shrimp. Bath using the concentrations of MIC, MBC and LC_{50} treated the infected animals by each pathogen. The treat of extract to each pathogen was compared to treat of oxytetracyclin. Both reagent treats showed closely recover rate from disease symptom. It is concluded that pomegranate extract is been able to substitute antibiotics for control these bacterial pathogens, effectively.

Keywords: *Punica granatum, bacterial pathogen, aquaculture*

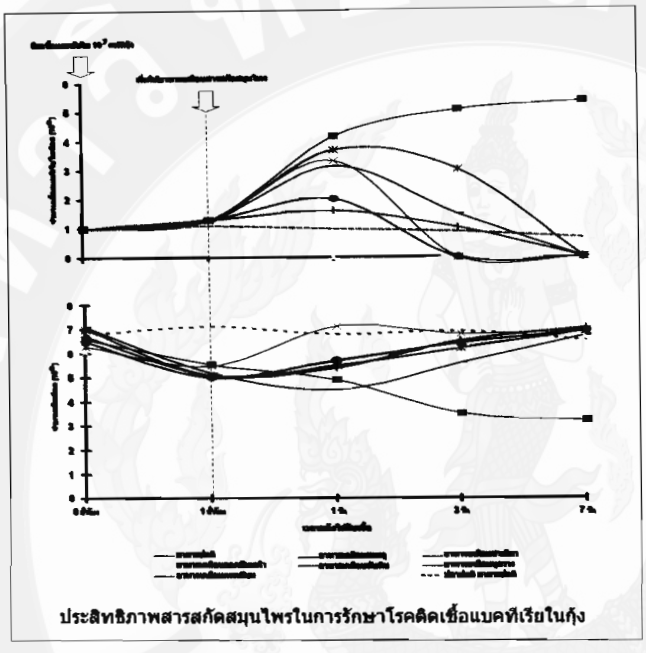
*corresponding author: Jiraporn Rojtinnakorn (E-mail: jrojtinnakorn@yahoo.com)

- Payment must be made by bank transfer and free of all bank or other charges, payable to **"Workshop Biotech"** Saving account # **026-2-76295-1** Siam Commercial Bank, Ramathibodi Branch.

การนำเสนอผลงานวิชาการ 4

สารสกัดสมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในกุ้ง

ดร. จิราพร โรจน์ทินกร*
คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้



ประสิทธิภาพสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง

เปรียบเทียบอัตรารอดกุ้งที่รักษาด้วยยาปฏิชีวนะและสารสกัดสมุนไพร

สูตรอาหาร	อัตรารอด (%)			
	1 ชั่วโมง	1 วัน	3 วัน	7 วัน
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
อาหารเคลือบกระเทียม	100	100	100	100
อาหารเคลือบชะพลู	100	100	100	98
อาหารเคลือบขาเขียว	100	100	100	95
อาหารเคลือบทับทิม	100	100	100	100
อาหารเคลือบหูกวาง	100	100	100	100
อาหารเคลือบออกซิเตตร้า	100	100	100	100

สารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี
C = ตัวทำละลาย 1, 2, 3 = สารสกัดชะพลู 4,5,6 = สารสกัดทับทิม

* jrojtinnakorn@yahoo.com; 0 89 633 8482

กิตติกรรมประกาศ
การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักงานวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2547-2549

เอกสารเผยแพร่

การใช้สารสกัดสมุนไพรไทย ทดแทนยาปฏิชีวนะ ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

ดร. จิราพร โรจน์ทินกร

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

63 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย
จ.เชียงใหม่ 50290
โทร 053 873470-2 ; 089 6338482
jiraroj@mju.ac.th

ภาคผนวก ข

เอกสารการขอจดอนุสิทธิบัตร

สถาบันบ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ www.mjubi.mju.ac.th
ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290 โทร.0-5387-3017 โทรสาร.0-5387-3017

สำหรับเจ้าหน้าที่
เลขที่.....
รับวันที่.....
ชื่อผู้รับ.....

แบบขอรับการคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาในนาม มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ข้าพเจ้า (ชื่อเจ้าของ/ผู้ขอ) ....ดร. จิราพร โรจน์ทินกร.....
ที่อยู่เลขที่.....6.....หมู่ที่.....4.....ถนน.....เชียงใหม่-พร้าว.....ตำบล/แขวง.....หนองหาร.....
อำเภอ/เขต..... .....สันทราย..... จังหวัด.....เชียงใหม่.....รหัสไปรษณีย์.....50290.....
โทรศัพท์ (บ้าน) ..... โทรศัพท์ (ทำงาน) ..... 053 87347-2..... โทรสาร.... 053 87347-2 ต่อ 130...
โทรศัพท์มือถือ.....0896338482..... E-mail Address .....jiraroj@mju.ac.th.....
มีความประสงค์ขอขึ้นทะเบียนคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาประเภท

- √ อนุสิทธิบัตร
- ☐ สิทธิบัตร
- ☐ เครื่องหมายทางการค้า
- ☐ ความลับทางการค้า
- ☐ ลิขสิทธิ์
- ☐ แบบผังภูมิของวงจรรวม
- ☐ ภูมิปัญญาท้องถิ่นไทย
- ☐ สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์
- ☐ อื่นๆ.....

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์/ชื่อเรื่อง.....
.....สารสกัด *Punica* spp. ใช้ต่อต้านเชื้อโรคในสัตว์น้ำ.....
คำสืบค้น(Key Word) .....*Punica* spp. สารสกัด น้ำ เอธานอล เชื้อโรค สัตว์น้ำ.....
.....
รายละเอียดโดยย่อ
.....การเตรียมสารสกัด *Punica* spp. ด้วยน้ำและเอธานอล ที่เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม ใช้ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ เช่น แอโรโมแนส วิบริโอ ในสัตว์น้ำโดยวิธีผสมอาหารหรือแช่ที่เวลาต่างๆ.....
.....
.....

ข้าพเจ้าจึงใคร่ขอความอนุเคราะห์ให้สถาบันบ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เป็นผู้ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือดำเนินการในการขึ้นทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญาประเภทดังกล่าว พร้อมกันนี้ข้าพเจ้ายินดีที่จะปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ และเงื่อนไขค่าธรรมเนียมการรับบริการจากสถาบันฯ โดยไม่มีข้อทักท้วงแต่ประการใด

(ลงชื่อ) .....
(.....ดร. จิราพร โรจน์ทินกร.....)
.....30/ตุลาคม/2562.....

สถาบันบ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ *www.mjubi.mju.ac.th*
ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290 โทร.0-5387-3017 โทรสาร.0-5387-3017

สำหรับเจ้าหน้าที่
เลขที่.....
รับวันที่.....
ชื่อผู้รับ.....

แบบขอรับการคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาในนาม มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ข้าพเจ้า (ชื่อเจ้าของ/ผู้ขอ) ....ดร. จิราพร โรจน์ทินกร.....

ที่อยู่เลขที่.....6.....หมู่ที่.....4.....ถนน.....เชียงใหม่-พร้าว.....ตำบล/แขวง.....หนองหาร.....

อำเภอ/เขต.... .....สันทราย..... จังหวัด.....เชียงใหม่.....รหัสไปรษณีย์.....50290.....

โทรศัพท์ (บ้าน) ..... โทรศัพท์ (ทำงาน) ..... 053 87347-2..... โทรสาร.... 053 87347-2 ต่อ 130...

โทรศัพท์มือถือ.....0896338482..... E-mail Address .....jiraroj@mju.ac.th.....

มีความประสงค์ขอขึ้นทะเบียนคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาประเภท

√ อนุสิทธิบัตร	☐ สิทธิบัตร	☐ เครื่องหมายทางการค้า
☐ ความลับทางการค้า	☐ ลิขสิทธิ์	☐ แบบผังภูมิของวงจรรวม
☐ ภูมิปัญญาท้องถิ่นไทย	☐ สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์	☐ อื่นๆ.....

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์/ชื่อเรื่อง.....

.....สารสกัด *Piper* spp. ใช้ต่อต้านเชื้อโรคในสัตว์น้ำ.....

คำสืบค้น(Key Word) .....ชะพลู สารสกัด เอธานอล เชื้อโรค สัตว์น้ำ.....

.....

รายละเอียดโดยย่อ

.....การเตรียมสารสกัด *Piper sarmentosum* และ *Piper betle* ด้วยเอธานอล ใช้ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ เช่น แอโรโมแนส วิบริโอ ในสัตว์น้ำ โดยวิธีผสมอาหารหรือแช่ที่เวลาต่างๆ.....

.....

.....

ข้าพเจ้าจึงใคร่ขอความอนุเคราะห์ให้สถาบันบ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เป็นผู้ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือดำเนินการในการขึ้นทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญาประเภทดังกล่าว พร้อมกันนี้ข้าพเจ้ายินดีที่จะปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ และเงื่อนไขค่าธรรมเนียมการรับบริการจากสถาบันฯ โดยไม่มีข้อทักท้วงแต่ประการใด

(ลงชื่อ) .....

(.....ดร.จิราพร โรจน์ทินกร.....)

30 / กรกฎาคม / 2562

สถาบันบ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ www.mjubi.mju.ac.th
ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290 โทร.0-5387-3017 โทรสาร.0-5387-3017

สำหรับเจ้าหน้าที่
เลขที่.....
รับวันที่.....
ชื่อผู้รับ.....

แบบขอรับการคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาในนาม มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ข้าพเจ้า (ชื่อเจ้าของ/ผู้ขอ) ....ดร. จิราพร โรจน์ทินกร.....

ที่อยู่เลขที่.....6.....หมู่ที่.....4.....ถนน.....เชียงใหม่-พร้าว.....ตำบล/แขวง.....หนองหาร.....

อำเภอ/เขต..... .....สันทราย..... จังหวัด.....เชียงใหม่.....รหัสไปรษณีย์.....50290.....

โทรศัพท์ (บ้าน) ..... โทรศัพท์ (ทำงาน) ..... 053 87347-2..... โทรสาร.... 053 87347-2 ต่อ 130...

โทรศัพท์มือถือ.....0896338482..... E-mail Address .....jiraroj@mju.ac.th.....

มีความประสงค์ขอขึ้นทะเบียนคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาประเภท

√ อนุสิทธิบัตร	☐ สิทธิบัตร	☐ เครื่องหมายทางการค้า
☐ ความลับทางการค้า	☐ ลิขสิทธิ์	☐ แบบผังภูมิของวงจรรวม
☐ ภูมิปัญญาท้องถิ่นไทย	☐ สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์	☐ อื่นๆ.....

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์/ชื่อเรื่อง.....

.....สารสกัดหูกวางใช้ต่อต้านเชื้อโรคในสัตว์น้ำ.....

คำสืบค้น(Key Word) .....หูกวาง สารสกัด น้ำ เอธานอล เชื้อแบคทีเรีย สัตว์น้ำ.....

.....

รายละเอียดโดยย่อ

.....การเตรียมสารสกัดหูกวางด้วยน้ำและเอธานอล ใช้ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์โรคที่สำคัญในสัตว์น้ำชนิดต่าง เช่น แอโรโมแนส วิบริโอ โดยวิธีผสมอาหารหรือแช่ที่เวลาต่างๆ.....

.....

.....

ข้าพเจ้าจึงใคร่ขอความอนุเคราะห์ให้สถาบันบ่มเพาะวิสาหกิจ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เป็นผู้ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือดำเนินการในการขึ้นทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญาประเภทดังกล่าว พร้อมกันนี้ข้าพเจ้ายินดีที่จะปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ และเงื่อนไขค่าธรรมเนียมการรับบริการจากสถาบันฯ โดยไม่มีข้อทักท้วงแต่ประการใด

(ลงชื่อ) .....

(.....ดร. จิราพร โรจน์ทินกร.....)

.....30 / ตุลาคม / 2552.....