ผลของพีเอชที่เป็นกรดต่อการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Susceptibility to white spot syndrome virus (WSSV) of *Penaeus monodon* reared under low pH condition

วิชชุดา ประสาทแก้ว ปภาศิริ บาร์เนท* และบุญรัตน์ ประทุมชาติ

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี 20131

Witchuda Prasatkeaw, Praparsiri Barnette and Boonyarath Pratoomchat

Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131.

บทคัดย่อ

ไวรัสมักก่อการตายในกุ้งที่มีความเครียดจากสิ่งแวดล้อม การศึกษาผลของพีเอชที่เป็นกรดต่อการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน โดยการฉีดไวรัสที่เจือจาง 1:100 ให้กับกุ้งชุดทดลอง ระดับความเป็นกรดที่ pH 6 และ pH 8 เป็นเวลา 10 วัน พบว่าอัตราการตายสะสมของกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสทั้งในน้ำ pH6 และ pH8 สูงกว่าในกุ้งที่ไม่ได้รับเชื้อที่เลี้ยงในน้ำ pH ทั้งสองระดับ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกุ้งที่เลี้ยงในน้ำ pH 6 และได้รับเชื้อมีอัตราการตายสะสมสูงที่สุด คือ 86% (n=30 ตัว) ผลการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดพบว่าค่าปกติของปริมาณเม็ดเลือดจากกุ้งที่เลี้ยงในน้ำ pH 8 และไม่ได้รับเชื้อไวรัสเท่ากับ 7.55$\pm$1.34 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตรมีค่าปริมาณสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำ pH 6 ได้รับเชื้อไวรัส (ปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำที่สุดคือ1.98$\pm$0.95 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากเหงือกกุ้งกุลาดำโดยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำ pH 6 ยอมรับไวรัส WSSV ปริมาณ 85% (n=27 ตัว) จากผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ค่าพีเอชที่เป็นกรดทำให้กุ้งกุลาดำยอมรับไวรัสตัวแดงดวงขาวได้มากขึ้น มีอัตราการตายสูง รวมทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำกว่าค่าปกติ

คำสำคัญ : กุ้งกุลาดำ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว วิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay

Abstract

Most viral diseases caused mortality in shrimp reared under environmental stress circumstances. Penaeus monodon at 3 months of age were investigated to find out whether or not low pH (pH 6) could influence shrimp susceptibility to white spot syndrome virus (WSSV). Mortality and total haemocyte counts of *Penaeus monodon* after injected with the WSSV diluted at 1:100 were recorded and accessed during a 10 day period. Cumulative mortality of infected viral groups pH at 6 and 8 had a significantly ($p<0.05$) higher percentage than non-infected shrimp at the same pH level (control group). The infected shrimp reared at pH6 had highest mortality rate at 86.67% (n=30 individuals). Total haemocyte counts of the infected shrimp of both pH levels were significantly ($p<0.05$) lower in number than the control group. The infected group at pH6 had lowest in numbers of total haemocytes (1.98$\pm$0.95 millions cells/mL) compared to the control group at pH8 (7.55$\pm$1.34 millions cells/mL). Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay was a method to confirm shrimp WSSV infection. Of 30 shrimp

*** Corresponding author.**

examined of the infected viral group at pH6, twenty seven specimens (87.18%) were found to have the WSSV. The study indicated that shrimp under low pH stress influence significantly susceptibility to white spot syndrome virus and have lower haemocyte counts.

Keywords : *Penaeus monodon*, White spot syndrome virus, Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay

บทนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำนับเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยอย่างมาก ในปี พ.ศ. 2546 สามารถส่งออกกุ้งกุลาดำได้มากกว่า 1,840 ล้านเหรียญสหรัฐ (กรมส่งเสริมการส่งออก สำนักบริการส่งออก, 2546) ทำให้ประเทศไทยกลายเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งแช่แข็งในรูปแบบต่างๆ จนสามารถครองส่วนแบ่งตลาดการส่งออกกุ้งแช่แข็งได้มากที่สุดในโลก แต่ปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อการส่งออกอย่างมากก็คือการระบาดของโรคที่เพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่ทำให้เกษตรกรสูญเสียและเกิดการขาดทุน การเกิดโรคระบาดเนื่องจากคุณภาพน้ำเสื่อมหรือมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ทำให้กุ้งเครียด ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ขาดภูมิคุ้มกันโรค และเกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการระบาดของโรค โรคกุ้งที่ก่อความเสียหายอย่างใหญ่หลวง ได้แก่โรคที่เกิดจากไวรัส เนื่องจากยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผล

โรคตัวแดงดวงขาว(White Spot Syndrome Virus, WSSV) ได้กลายเป็นสาเหตุสำคัญ ที่ส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงกุ้งในเอเชียตั้งแต่ปี 2536 โดยเริ่มพบในจีนและญี่ปุ่น และแพร่ระบาดทั่วทั้งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในเวลาต่อมา (Cai et al., 1995; Lightner, 1999) ประเทศไทยมีการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวตั้งแต่ปีพ.ศ. 2537 ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพร สงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี และได้ทำความเสียหายให้กับผู้เลี้ยงกุ้งในภาคตะวันออกแถบจังหวัดจันทบุรี และตราด ซึ่งเป็น 2 จังหวัดที่ได้รับความเสียหายอย่างมากคิดเป็นพื้นที่รวมกันถึง6,000 ไร่ (ศุภชัย, 2540) ปัจจุบันการระบาดของโรคก็ยังพบในทุกพื้นที่แต่ความรุนแรงขึ้นกับฤดูกาลและพื้นที่การเลี้ยง ในช่วงปลายปีตั้งแต่เดือนกันยายนจนถึงต้นปีที่อากาศหนาวเย็นจะมีการตายของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวมากกว่าช่วงอื่น ๆ (ชลอ, 2543) กุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวจะมีลักษณะจุดขาวหรือดวงขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-2.0 ม.ม. และว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำหรือเกยขอบบ่อ กินอาหารลดลง มีการลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัว

อัตราการตายของกุ้งหลังจากเกิดโรคขึ้นอยู่กับแหล่งเลี้ยงและฤดูกาล ในช่วงที่มีอากาศหนาวหรือฝนตกหนักติดต่อกันนาน ๆ อัตราการตายของกุ้งอาจสูงถึง 80-100% ภายใน 4-5 วัน (ชลอ, 2543) และจากการทดลองของ Guan et al. (2003) พบว่าที่อุณหภูมิ 23 ˚C เป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่ทำให้กุ้ง *Marsupenaeus japonicus* ที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีอัตราการตายถึง 50% ภายใน 4 วันโดยการเกิดโรคในกุ้งนั้นเริ่มจากสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม ทำให้กุ้งอ่อนแอจนเชื้อโรคสามารถทำอันตรายกุ้งได้ เนื่องจากประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันลดลง เมื่อกุ้งมีความเครียดหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม พรเลิศและคณะ (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมบางประการต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยปรับอุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่างอย่างรวดเร็วพบว่ามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืน และความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียลดลง ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับการเกิดโรคจึงมีความสำคัญเพื่อใช้ข้อมูลเป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคไวรัสกุ้งอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาที่ได้ผล

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเกิดโรคของกุ้งมีหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น พีเอชของน้ำก็มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำมาก เนื่องจาก พีเอชน้ำมีผลต่อคุณสมบัติของน้ำตัวอื่นๆ อีก เช่น มีผลต่อความเป็นพิษของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นต้น พีเอชของน้ำที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 ปัญหาเกี่ยวกับค่าพีเอชนี้มักพบกรณีที่น้ำมีพีเอชต่ำเนื่องจากดินบริเวณที่เลี้ยงเป็นดินเปรี้ยว โดยพบบริเวณป่าชายเลน ผลของพีเอชต่อสัตว์น้ำโดยตรงจะเกิดจากผลกระทบของความเป็นกรด ซึ่งอาจเกิดจากการที่เนื้อเยื่อบุเหงือกถูกทำลาย การผลิตเมือกบริเวณเหงือกไปขัดขวางการหายใจหรือทำให้กระบวนการแลกเปลี่ยนน้ำและเกลือแร่หมดประสิทธิภาพ และทำให้เลือดอยู่ในสภาวะเป็นกรด

ระดับพีเอชที่ไม่ถึงกับเป็นสาเหตุให้สัตว์น้ำตายก็อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการต้านทานโรคของสัตว์น้ำ โดยกิจการและคณะ (2543) พบว่าในสภาพพีเอชที่ต่ำกว่าปกติ (pH 6) มีผลทำให้การกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการต่อต้านการเกิดโรคของกุ้งลดลงด้วย

ปัญหาความเป็นกรดของน้ำในพื้นที่นากุ้งส่วนใหญ่มักเกิดจากดินก้นบ่อมีการสะสมของสนิมเหล็กมากทำให้พีเอชของดินและน้ำต่ำ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรค ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของพีเอชที่เป็นกรดต่อการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน ในน้ำความเค็มที่ 10 ppt ให้มีค่าพีเอชปกติคือ pH 8 กับพีเอชที่เป็นกรดคือ pH 6 โดยแบ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและชุดทดลองได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในความเข้มข้นเท่ากัน แล้วศึกษาอัตราการตาย และปริมาณเม็ดเลือด เปรียบเทียบกับกุ้งในชุดควบคุม การศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ของ พีเอชเป็นกรดในบ่อเลี้ยงกุ้งกับการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างมากในปัจจุบัน

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมกุ้งทดลอง

นำกุ้งกุลาดำอายุ 3 เดือน จากบ่อดินมาพักในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร เพื่อปรับสภาพความพร้อม และสุ่มตัวอย่างกุ้งมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ก่อนการทดลองจะเริ่มขึ้น

2. การเตรียมน้ำทะเล

น้ำทะเลที่ใช้ในการทดลองจะนำมาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยโอโซน และทิ้งไว้ให้สลายตัวประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3. การทดลอง

ทำการทดลองในช่วง ธันวาคม 2547 โดยนำกุ้งที่แข็งแรงจำนวน 120 ตัว ใส่ถังไฟเบอร์ขนาด 60 ลิตร จำนวน 12 ถัง ถังละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดทดลองที่เลี้ยงกุ้งในน้ำทะเลพีเอชเป็นกรด (pH 6) และให้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชุดที่ 2 ชุดทดลองที่เลี้ยงกุ้งในน้ำทะเล พีเอชปกติ (pH 8) และให้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชุดที่ 3 ชุดควบคุมที่เลี้ยงกุ้งในน้ำทะเลพีเอชเป็นกรด (pH 6) และไม่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดง

ชุดที่ 4 ชุดควบคุมที่เลี้ยงกุ้งในน้ำทะเล พีเอชปกติ (pH 8) และไม่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

การปรับพีเอชเป็นกรดของน้ำความเค็ม 10 ppt นั้นจะใช้ acetic acid ค่อย ๆปรับลดลงวันละหนึ่งค่าจากพีเอชปกติคือ 8 เป็นพีเอช 7 และให้คงที่อยู่ที่พีเอช 6 นาน 7 วัน แล้วจึงทำการฉีดเชื้อไวรัสให้กับกุ้งในชุดทดลองคือชุดที่ 1 และ 2 ทุกตัวประมาณ 0.1 มล. ทั้ง 4 ชุดการทดลองจะให้อาหารวันละ 3 มื้อ (5% ของน้ำหนักตัว) เป็นเวลา 10 วัน ในระหว่างการทดลองทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันประมาณ 20-30% หลังจากดูดตะกอน

4. การหาความเข้มข้นของไวรัสในการฉีดต่อกุ้งกุลาดำ

นำเชื้อไวรัสที่ได้จากเลือดหรือเนื้อเยื่อสกัดของกุ้งป่วยที่เจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ อัตราส่วน1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 และนำไปตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีDot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay (Nadala et al., 1999) เพื่อดูลักษณะการเกิดจุดสีน้ำเงินบนแผ่นnitrocellulose membrane ซึ่งแสดงผลบวก โดยจะเลือกอัตราการเจือจางที่สามารถสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงินและเจือจางปานกลาง เพื่อให้ปริมาณเชื้อที่ใช้ทำให้กุ้งเกิดโรคแบบกึ่งเฉียบพลัน และฉีดเข้ากุ้งกุลาดำก่อนทดลองจริงในอัตรา0.5% ต่อน้ำหนักตัว (ปรับปรุงจากวิธีของเรวัตร และคณะ 2545)

5. การเก็บตัวอย่าง

ทำการตรวจนับจำนวนกุ้งบันทึกจำนวนตัวที่ตายและตัวที่รอดตายทุก ๆ วัน ตลอดการทดลอง 10 วัน พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างจากเลือดกุ้งทุกวัน โดยเก็บถังละ 3 ตัว เพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยการมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวกุ้งด้วยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay (Nadala et al., 1999)

6. การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดกุ้ง

ทำการดูดเลือดกุ้ง ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างเดียวกับการตรวจไวรัสข้างต้น โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 ml และหัวเข็มเบอร์ 26 G $\frac{1}{2}$ ทำการดูดน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (HAAS) ประมาณ 0.2 ml แล้วดูดเลือดกุ้งจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.2 ml ผสมน้ำยาและเลือดให้เข้ากันโดยกลับเข็มขึ้นลงช้า ๆ ดูดน้ำยา cold fixative ให้เต็ม syringe จำนวน 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหยดลงบน Hemocytometer เพื่อนับปริมาณเม็ดเลือดกุ้งในช่อง W ด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด

ปริมาณเม็ดเลือด (cells/ml^3)

$$= \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้} \times \text{ค่า dilution factor} \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่ใช้นับ}}$$

8. การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay (Nadala et al., 1999)

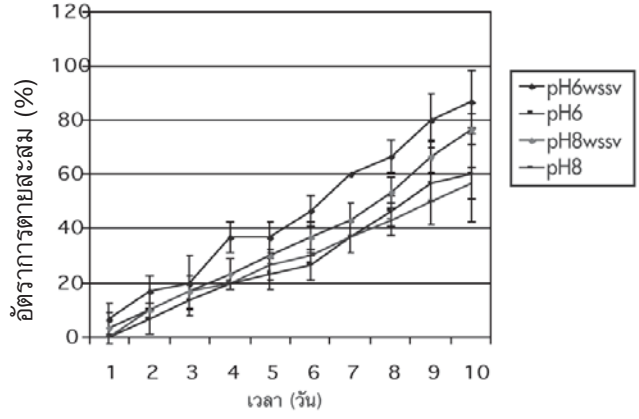
นำตัวอย่างลูกกุ้งหรือตัดส่วนเหงือกกุ้งมาใส่ใน eppendorf ที่มีสารละลาย triton-X 100 μL แล้วใช้แท่งพลาสติกบดชิ้นส่วนกุ้งให้ละเอียด จากนั้นหยดสารละลายใน eppendorf ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane 1μL ทิ้งไว้ให้แห้ง นำแผ่น nitrocellulose membrane ใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มี Blocking solution (5% nonfat dry milk in PBS) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. เมื่อครบ 1 ชม. ล้างด้วย PBS-TW 20 (0.05% Tween-20 in PBS) นาน 5 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ลงใน mouse anti-WSSV MAb (ได้รับจาก Chalvisuthangkura et al., 2004) นานหนึ่งคืนที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS-TW 20 นาน 5 นาที 3 ครั้ง แล้วจึงแช่ลงใน goat anti mouse นาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้องและล้างด้วย PBS-TW 20 นาน 5 นาที 3 ครั้ง จึงนำมาแช่ในสารละลาย NBT/BCIP (33+66 μL ใน alkaline buffer 10 mL) ทิ้งไว้ 30 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วอ่านบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยเป็นผลบวกเมื่อเกิดจุดสีน้ำเงิน

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาผลของพีเอชที่เป็นกรดต่อการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำขนาด 20-30 กรัม แบ่งออกเป็นชุดทดลองและชุดควบคุมทำการเลี้ยงในน้ำทะเลที่มี pH 6 และ pH 8 ที่ความเค็ม 10 ppt โดยชุดทดลองได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือจาง 1:100 (เป็นปริมาณที่ก่อโรคแบบกึ่งเฉียบพลัน กุ้งไม่ตายในระยะสั้น) ส่วนชุดควบคุมไม่ได้รับเชื้อไวรัสแต่ฉีดน้ำเกลืออย่างเดียว จากนั้นทำการเปรียบเทียบอัตราการตาย ปริมาณเม็ดเลือดรวม และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay (Nadala et al., 1999)

1. อัตราการตาย (Mortality) และความรุนแรงในการก่อโรค

ผลการศึกษาอัตราการตายของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดทดลองเป็นเวลา 10 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำในชุดทดลอง pH 6 ที่ติดเชื้อไวรัส WSSV มีอัตราการตายสูงสุด โดยมีอัตราการตายสะสมที่ 86.67% (26 ตัวจาก 30 ตัว) และมีอัตราการตายสะสมสูงกว่า 50% ในวันที่ 7 ของการทดลอง รองลงมาคือชุดทดลอง pH 8 ที่ติดเชื้อไวรัส WSSV โดยมีอัตราการตายสะสม 76.67% (23 ตัวจาก 30 ตัว) และมีอัตราการตายสูงกว่า 50% ในวันที่ 8 ของการทดลอง ส่วนกุ้งในชุดควบคุม pH 6 มีอัตราการตายสะสม 60.00% (18 ตัวจาก 30 ตัว) โดยอัตราการตายสะสมสูงกว่า 50% ในวันที่ 9 ของการทดลอง ส่วนชุดทดลองที่มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุด คือชุดควบคุมที่ pH 8 โดยมี 56.67% (16 ตัว จาก 30 ตัว) (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำ pH 6 และ pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV และได้รับเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

หมายเหตุ

pH 6 WSSV คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 6 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 WSSV คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

จากการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการตายสะสมในชุดควบคุม pH 6 และ pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายสะสมระหว่างชุดทดลอง pH 6 และ pH 8 ที่ได้รับเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายสะสมระหว่างชุดควบคุม pH 6 กับชุดควบคุม pH 8 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามอัตราการตายของกุ้งชุดควบคุมค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำได้อยู่ในช่วง 24-26 ˚C ทำให้กุ้งอ่อนแอได้ แต่ปัจจัยอื่นๆถูกควบคุมเหมือนกับชุดทดลอง

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแนวโน้มอัตราของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในพีเอชเป็นกรดสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในสภาพพีเอชปกติและหากได้รับเชื้อไวรัสร่วมด้วยก็จะทำให้มีอัตราการตาย

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบทางสถิติของอัตราการตายและปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับและไม่ได้รับไวรัส WSSV เมื่อเลี้ยงในน้ำ pH6 และ pH8

พารามิเตอร์	พารามิเตอร์			
	pH6	pH8	pH6 WSSV	pH8 WSSV
% อัตราการตายสะสม	60.00 [a]	56.67 [a]	86.67 [b]	76.67 [b]
ปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ย (ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร)	6.06±0.57[a]	7.55±1.34[b]	1.98±0.95[c]	2.47±0.81[c]

หมายเหตุ

pH 6 WSSV คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 6 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 WSSV คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

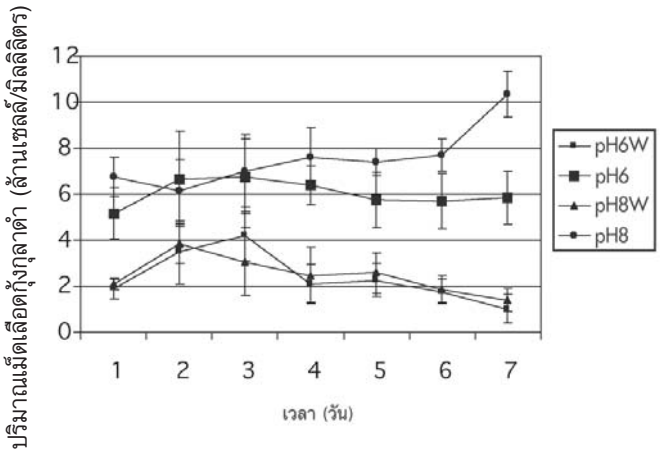
สูงขึ้นและมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำลง อนึ่งแม้กุ้งไม่มีการติดเชื้อไวรัสแต่ถ้าถูกเลี้ยงในสภาพพีเอชเป็นกรดจะมีผลกระทบต่อปริมาณเม็ดเลือดได้ เนื่องจากพีเอชเป็นกรดมีผลทำให้เยื่อบุเหงือกถูกทำลายและเลือดมีสภาวะเป็นกรด กระบวนการแลกเปลี่ยนน้ำและเกลือแร่หมดประสิทธิภาพ เป็นผลให้การเจริญเติบโตและความต้านทานโรคมีประสิทธิภาพต่ำ กุ้งจึงอ่อนแอลงและหากได้รับเชื้อไวรัส ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจะไม่สามารถต้านทานเชื้อได้จึงมีการติดโรคและตายในที่สุดโดย Robert (1989) รายงานว่าความเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ สามารถส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำลดลง จากการวิจัยของ Swingle (1969) พบว่าสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้อัตราการรอดและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำลดลงด้วย นอกจากนี้ Allan and Maquire (1992) ได้ทดลองพบว่าน้ำที่มีค่า pH 3.7 จะทำให้กุ้งกุลาดำวัยรุ่นตาย 50% ภายใน 96 ชั่วโมง

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือด (Total Hemocyte Counts)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดกุ้งในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสตลอดการทดลอง 7 วัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดกุ้งในสภาวะปกติคือ ชุดควบคุม pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อซึ่งใช้ทำการศึกษาค่าปกติของเม็ดเลือดกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 7.55 $\pm$ 1.34 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุม pH 6 มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 6.06 $\pm$ 0.57 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณเม็ดเลือดรวมในชุดควบคุมทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในแต่ละวันที่ทำการศึกษา ส่วนปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้งชุดทดลอง pH 6 และ pH 8 ที่ได้รับเชื้อไวรัสพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำตลอด 7 วันโดยมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน และมีค่าต่ำมากตั้งแต่วันแรกหลังจากได้รับเชื้อ แต่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 2 หรือ 3 จากนั้นลดลงเรื่อย ๆ ในชุดทดลอง pH 6 มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย 1.98 $\pm$ 0.95 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนชุดทดลอง pH 8 ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยเท่ากับ 2.47 $\pm$ 0.81 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมซึ่งมีค่าสูงสุดในชุดควบคุม pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม pH 6 และชุดทดลองทั้ง pH 6 และ pH 8 ที่ได้รับเชื้อไวรัส ส่วนชุดควบคุม pH 6 ที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัสมีปริมาณเม็ดเลือดสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองทั้ง pH 6 และ pH 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 1)

ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งที่ถูกเลี้ยงในสภาพพีเอชเป็นกรด (pH 6) จะต่ำกว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งที่อยู่ในสภาพพีเอชปกติ (pH 8) และเมื่อได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ร่วมด้วยจะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำลดต่ำลงมากขึ้น ทั้งกุ้งที่เลี้ยงในพีเอชที่เป็นกรดและพีเอชปกติ จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดพบว่าในกุ้งชุดทดลองทั้ง pH 6 และ pH 8 ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีปริมาณเม็ดเลือดลดลงตั้งแต่วันแรก ซึ่งสัมพันธ์กับรายงานของ กิจการ และคณะ (2543) ที่ทดลองฉีดเชื้อไวรัสให้กับกุ้งกุลาดำและทำการหาปริมาณเม็ดเลือดรวมหลังจากกุ้งได้รับเชื้อในวันที่ 5 พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสมีปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำกว่ากุ้งในชุดควบคุมมาก แต่อย่างไรก็ตาม Bauchau (1981) และ Tsing et al. (1989) รายงานว่าวงจรการลอกคราบ เพศ และคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดเช่นเดียวกัน ส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งมีความแปรปรวน ซึ่งปัญหานี้พบได้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดในสัตว์น้ำทั่วไป การที่ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสลดลงนั้นมาจากกุ้งได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกาย เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอมขณะเดียวกันกุ้งเกิดความเครียด มีการกินอาหารลดลง ทำให้การสร้างเม็ดเลือดลดลง ปริมาณเม็ดเลือดจึงมีค่าต่ำ และเชื้อไวรัสยังเข้าไปเจริญในเม็ดเลือดโดยตรง ทำให้เม็ดเลือดตาย และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย จากการที่ปริมาณเม็ดเลือดรวมต่ำลงนี้เองเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความต้านทานโรคของกุ้งลดลงเพราะระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งนั้นอาศัยเม็ดเลือดทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ โดยวิธีการ phagocytosis หรือ encapsulation เป็นต้น เมื่อปริมาณเม็ดเลือดต่ำลงการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคโดยระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจึงลดลง กิจการและคณะ (2543) กล่าวว่าการที่ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ลดลงเกิดจากผลของกิจกรรมของเม็ดเลือดคือความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและความว่องไวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (phagocytosis) ลดลงเมื่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่นเดียวกับผลการทดลองของพรเลิศ (ม.ป.ป.) ที่ทำการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมบางประการต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำพบว่าการลดพีเอชจาก 7.8 เป็น 6.0 นาน 3 ชม. ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนลดลง



ภาพที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำ pH 6 และ pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV และได้รับเชื้อในเวลา 7 วัน

หมายเหตุ

pH 6 W คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 6 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 W คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

3. การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay

หลังจากฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจาง 1:100 ให้กับกุ้งกุลาดำในชุดทดลองทั้ง pH 6 และ pH 8 เป็นเวลา 10 วันได้นำตัวอย่างกุ้งที่ทดลองทั้งหมดมาทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้ตัวอย่างจากเหงือกกุ้งกุลาดำพบว่าในชุดทดลอง pH 6 ฉีดไวรัส มีการติดเชื้อมากที่สุดคือ 85.18% (23 ตัว จาก 27 ตัว) รองมาคือชุดทดลอง pH 8 ติดเชื้อ 55.56% (16 ตัว จาก 27 ตัว) และพบการติดเชื้อในชุดควบคุมด้วยเล็กน้อย ส่วนการตรวจไวรัสจากเลือดกุ้ง พบได้เฉพาะชุดทดลอง ฉีดไวรัส pH 6 และ pH 8 เท่านั้น (ดังตารางที่ 2) การที่สภาพพีเอชของน้ำที่เป็นกรดทำให้กุ้งเกิดความเครียด มีการกินอาหารลดลง ส่งผลให้การสร้างเม็ดเลือดลดลงด้วย เม็ดเลือดเป็นตัวสำคัญที่ทำหน้าที่

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวในเหงือกและเลือดกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay

ตัวอย่าง	พารามิเตอร์			
	pH6 WSSV	pH6	pH8 WSSV	pH6
เหงือก	85.18±16.98	37.03±6.41	55.55±11.11	14.81±12.83
เลือด	33.33±12.17	0±0.00%	27.78±6.09	0±0.00

หมายเหตุ

pH 6 WSSV คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 6 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 6 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 WSSV คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 และได้รับเชื้อ WSSV

pH 8 คือกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเล pH 8 ที่ไม่ได้รับเชื้อ WSSV

กำจัดสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอนุภาคของไวรัสจะเข้าไปเจริญในเม็ดเลือดโดยตรง ความสามารถในการต่อสู้กับเชื้อโรคของกุ้งลดลงเนื่องจากในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งจะมีเม็ดเลือดทำหน้าที่หลักในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเมื่อปริมาณเม็ดเลือดต่ำลงย่อมทำให้ความต้านทานโรคในกุ้งลดลงเป็นสาเหตุให้กุ้งที่เลี้ยงในพีเอชเป็นกรดติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในพีเอชปกติ ส่วนสาเหตุที่พบการติดเชื้อในชุดควบคุมร่วมด้วยโดยที่ก่อนการทดลองตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อไวรัสนั้นน่าจะมีสาเหตุมาจากก่อนการทดลองกุ้งอาจมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวแต่อาจมีปริมาณน้อย ซึ่งต้องทำการตรวจด้วยเทคนิคที่มีความไวสูง เช่นเทคนิค PCR โดยสถาพร (2539) รายงานว่าการที่กุ้งมีเชื้อไวรัสไม่จำเป็นต้องแสดงอาการของโรคและตายทุกตัว มีกุ้งในบ่อเลี้ยงหลายพื้นที่ที่กุ้งมีการติดเชื้อไวรัสแต่กุ้งก็ยังมีอาการปกติปรากฏให้เห็น ถ้าอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมและกุ้งแข็งแรงดีก็จะไม่แสดงอาการ แต่อาจตรวจสอบการติดเชื้อได้โดยวิธีที่มีความไวสูงมากๆ เช่นเทคนิค PCR ในการทดลองเมื่อนำกุ้งมาอยู่ในสภาพกักขัง มีความหนาแน่นมากกว่าในบ่อเลี้ยง ทำให้เกิดความเครียด และอ่อนแอลง ส่งผลให้เชื้อไวรัสเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้ตัวอย่างจากเหงือก สามารถพบการมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวกุ้งได้ตั้งแต่วันแรกหลังจากที่กุ้งได้รับเชื้อไวรัส โดยศุภชัย (2540) กล่าวถึงสาเหตุโน้มนำและปัจจัยที่ทำให้กุ้งอ่อนแอ ภูมิต้านทานลดลงได้แก่ ฤดูกาล คุณภาพน้ำ เช่น อุณหภูมิ และพีเอช รวมทั้งความหนาแน่นในการเลี้ยง ทำให้กุ้งเกิดความเครียดและอ่อนแอจึงง่ายต่อการเข้าทำอันตรายของเชื้อไวรัส

จากการที่พบว่าสภาพบ่อเลี้ยงกุ้งหลายพื้นที่อยู่ในแหล่งที่เป็นดินเปรี้ยว เช่นในแถบจังหวัดจันทบุรีและตราด (ศุภชัย, 2540) ส่งผลให้น้ำมีค่าพีเอชต่ำลง สภาพแวดล้อมเช่นนี้นอกจากทำให้มีอาหารธรรมชาติน้อยหรือมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งแล้วยังทำให้กุ้งเกิดความเครียด ปริมาณเม็ดเลือดลดลง ซึ่งมีผลทำให้ภูมิต้านทานโรคในกุ้งต่ำลง ดังนั้นเกษตรกรที่มีการเลี้ยงกุ้งอยู่ในบริเวณพื้นที่ดินเปรี้ยวควรเฝ้าระวังการเกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ เป็นกรณีพิเศษหากพบการมีเชื้อไวรัสในกุ้งสภาพน้ำที่เป็นกรดทำให้ภูมิคุ้มกันของกุ้งมีความบกพร่องในการต่อสู้กับเชื้อโรค เกษตรกรจำต้องมีการจัดการบ่อและคุณภาพน้ำที่ดีตลอดการเลี้ยง

สรุปผลการทดลอง

1. กุ้งกุลาดำที่ถูกเลี้ยงในสภาพพีเอชที่เป็นกรดจะมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ถูกเลี้ยงในสภาพพีเอชปกติ และหากได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวร่วมด้วยก็จะมีอัตราการตายสูงขึ้น

2. ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งที่ถูกเลี้ยงในสภาพพีเอชเป็นกรด (pH 6) จะต่ำกว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งที่อยู่ในสภาพพีเอชปกติ (pH 8) และเมื่อได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวร่วมด้วยจะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำลดต่ำลงมากทั้งกุ้งที่เลี้ยงในพีเอชที่เป็นกรดและพีเอชปกติ

3. กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในพีเอชที่เป็นกรด (pH 6) จะพบเชื้อไวรัสจากการตรวจที่เหงือกได้มากกว่ากุ้งจากชุดทดลองอื่นๆ

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay มีความไวน้อยกว่าวิธี PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบได้แม่นยำกว่า จึงควรนำไปใช้ตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว กรณีที่วิธี Dot-Blot nitrocellulose enzyme immunoassay ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยเฉพาะสุ่มตรวจในกุ้งก่อนการทดลอง

2. ควรเปรียบเทียบข้อมูลจากกุ้งทดลองกับค่าปริมาณเลือดในกุ้งเลี้ยงตามธรรมชาติ ที่มีปัญหาบ่อดินมีพีเอช เป็นกรด

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และนรินทร์ สงสีจันทร์. 2543. การศึกษา ค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22 (ฉบับพิเศษ) : 597-603.

กรมส่งเสริมการส่งออก สำนักบริการการส่งออก. กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์ 2546. ข้อมูลการส่งออกสินค้าปี2546.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ. เจริญรัฐการพิมพ์.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2531. ระบบน้ำและของเสียในบ่อกุ้ง. กรุงเทพฯ. ศรีเมืองการพิมพ์.

ประจวบ หลำอุบล. 2531. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง. กรุงเทพฯ. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, นภดล ศุกระกาญจน์ และสัมพันธ์ ปานจรัตน์. ม.ป.ป. ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมบางประการต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรุงเทพฯ. กรมประมง.

เรวัตร คงประดิษฐ์, จิราพร เกษรจันทร์ และกิจการ ศุภมาตย์. 2545. การผลิตโพลิโคนอลแอนติบอดีต่อเชื้ออิริโดไวรัสที่แยกได้จากปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่3/2545 สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย กรมประมง.

สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2539. การป้องกันโรคและธรรมชาติและธรรมชาติของไวรัสในการกุ้งกุลาดำ. ในความรู้เกี่ยวกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. เอสทีซี ฟีด.

ศุภชัย นิลวานิช. 2540. กุ้งกุลาดำ ทางเลือก-ทางรอด. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มติชน.

Allan, G.L.; and Maguire, G.B. 1992. Effect of pH and salinity on survival, growth and osmoregulation in *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 107 (1), 33-47.

Bauchau, A G. 1981. Crustacea in invertebrate Blood Cell Volumn 2. New York. Academic press. Cai, S. L., Huang, J. and Song, X.L. 1995. Epidermiological studies on the explosive epidermic diseases of prawn in 1993-1994. Journal of Fish Disease. 19 (2), 112-117.

Cai, S. L.; Huang, J.; and Song, X.L. 1995. Epidermiological studies on the explosive epidermic diseases of prawn in 1993-1994. Journal of Fish Disease. 19 (2), 112-117.

Chalvisuthangkura, P.; Tanngkhabuanbutra, J.; Longyant, S.; Sithigorngul, W.; Rukpratanporn, S.; Menasveta, P.; and Sithigorngul, P. 2004. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. Science Asia. 30, 359-363.

Guan, Y.; Yu, Z.; and Li, C. 2003. Effect of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. Journal of Invertebrate Pathology. 83, 257-260.

Lightner, D.V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV : current status in the Americas, available diagnastic methods, and management strategies. Journal of Applied Aquaculture 9(2), 27-52.

Nadala, J.R.; Eric, C. B.; and Loh, C. 1999 Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the infection of white spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. Journal of Virological Methods. 84, 175-179.

Roberts, R.J. 1989. Fish Pathology Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, UK.

Swingle, H.S. 1969. Method of Analysis for Water Oraganic Matter and Pond Bottom Soils Use in Fishery Research. Auburn University, Alabama, USA.

Tsing, A.; Arcier, J-M.; and Brehelin, M. 1989. Hemocyte of Penaeid Pelaemonid Shrimp : Morphology, Cytology and Hemograms. Journal of Invertebrate Pathology. 53(1), 64-77.