



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)
ปริญญา

วิทยาศาสตรการประมง	ชีววิทยาประมง
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตาย และอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of DV AQUA on Non-Specific Immune Characteristics, Survival and Growth of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นามผู้วิจัย นางสาวชยพร ทิพย์ศรีมงคล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก _____
(_____ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D. _____)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____
(_____ รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. _____)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม _____
(_____ อาจารย์วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, ป.ร.ด. _____)

หัวหน้าภาควิชา _____
(_____ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc. _____)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(_____ รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. _____)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตาย
และอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of DV AQUA on Non-Specific Immune Characteristics,
Survival and Growth of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นางสาวชยพร ทิพย์ศรีมงคล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2552

ชยพร ทิพย์ศรีมงคล 2552: ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตาย และอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปรินญาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นิตี ชูจิต, Ph.D. 105 หน้า

การศึกษาผลของสารเบต้ากลูแคน (DV AQUA) ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมทั้งในห้องปฏิบัติการและในระดับฟาร์มเลี้ยง การศึกษาในห้องปฏิบัติการ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง (แต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ) โดยแต่ละซ้ำใช้กุ้งขาวแวนนาไมขนาดประมาณ 8-11 กรัม จำนวน 25 ตัว เลี้ยงกุ้งในถังขนาด 500 ลิตร ให้อาหารวันละ 4 มื้อ ในปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.125 และ 0.25% เลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม DV AQUA 0.25% มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 16.11 ± 2.14 กรัม สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุมซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 14.98 ± 2.20 กรัม แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA 0.125% ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 15.56 ± 2.64 กรัม เมื่อพิจารณาถึงอัตราการรอดตายของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA พบว่าอัตราการรอดตายอยู่ระหว่าง 88.67-95.30% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 75.33% ในขณะที่ผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและอัตราการรอดตายของกุ้งหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA 0.25% มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการทำลายแบคทีเรียและกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase และมีอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* สูงกว่ากุ้งในชุดที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA 0.125% และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งนั้นพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA 0.125 และ 0.25% มีค่าเท่ากับ 1:16 ในขณะที่กุ้งในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 1:8 ผลของสาร DV AQUA ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยงนั้น ทำการศึกษาในบ่อขนาด 6 ไร่ จำนวน 8 บ่อ แต่ละบ่อปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นบ่อละ 1 ล้านตัว ทำการทดลอง 4 บ่อต่อชุดการทดลอง โดยเริ่มให้อาหารผสม DV AQUA 0.25% หลังจากเลี้ยงกุ้งได้ 30 วัน และเมื่อเลี้ยงกุ้งได้ประมาณ 90 วัน จึงทำการสุ่มกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA 0.25% มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการทำลายแบคทีเรียและกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และหลังจากจับกุ้งพบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA 0.25% มีผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 2,375 กิโลกรัมต่อไร่และอัตราการรอดตายเท่ากับ 82.08% ในขณะที่ชุดควบคุมได้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 2,202 กิโลกรัมต่อไร่ และมีอัตราการรอดตายเพียง 73.31% ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารผสม DV AQUA 0.25% เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมได้

Chayaporn Tipsrimongkol 2009: Effects of DV AQUA on Non-Specific Immune Characteristics, Survival and Growth of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Assistant Professor Niti Chuchird, Ph.D. 105 pages.

A study of the effects of Beta-glucan (DV AQUA) on growth, survival and immune response in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was conducted under laboratory conditions and growout ponds. Laboratory tests were carried out in three treatments (with six replicates/treatment). Each replicate consisted of 25 shrimp (8-10 g) in 500-liter tanks. Shrimp were fed four times daily at 3% body weight per day for 50 days with pelleted feed containing graded levels of DV AQUA (0%, 0.125% and 0.25% of the feed). After 50 days of dietary administration, shrimp fed with 0.25% DV AQUA had an average body weight (16.11 ± 2.14 g) significantly higher ($P < 0.05$) than the control group (14.98 ± 2.20 g). No statistical difference was found between the average body weight of shrimp in the control group and the group that fed with 0.125% DV AQUA (15.56 ± 2.64 g). Survival rate of shrimp in the two DV AQUA groups ranged from 88.67-95.33% which was significantly higher ($P < 0.05$) than that in the control group (75.33%). The immune characteristics and survival rate of shrimp after experimental infection with *Vibrio harveyi* revealed that shrimp which fed on diets containing 0.25% DV AQUA had significantly higher ($P < 0.05$) THC, percentage phagocytosis, bactericidal activity, phenoloxidase activity, superoxide dismutase activity and survival rate after injection with *V. harveyi* than the 0.125% DV AQUA and control groups. Shrimp fed with 0.125% and 0.25% DV AQUA had bactericidal activity at the serum dilution of 1:16 while the control group had it at 1:8. Effects of DV AQUA on growth, survival and immune response in pond-reared *L. vannamei* were carried out in eight earthen ponds with an area of 6 rais/pond. Postlarvae 10 (PL10) were stocked at a density of 1,000,000 PL/pond. After 30 days shrimp from four treatment ponds were fed with pelleted feed consisting of 0.25% DV AQUA while shrimp in another four ponds were fed with regular pelleted feed for white shrimp as the control group. After 90 days of culture, shrimp from both treatment and control groups were sampled for immune parameters studies. Results showed that shrimp fed with 0.25% DV AQUA had significantly higher THC, percentage phagocytosis, bactericidal activity, phenoloxidase activity and superoxide dismutase ($P < 0.05$) than those of control group. After shrimp were harvested, the average production and survival rate of 0.25% DV AQUA group was 2,375 kg/rai and 82%, while they were only 2,202 kg/rai and 73% in the control group. The present study indicated that oral administration of 0.25% DV AQUA for at least 30 days could increase the growth, survival and immune response of *L. vannamei*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิตี ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลีมสุวรรณ และ ดร.วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษาแนะนำในด้านการทดลองและการตรวจแก้ไขข้อมูลต่างๆ
ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณบริษัท ไคอามอนด์ วิ เอเซีย จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยและ
ขอขอบพระคุณบริษัท ดิทีแฮล์ม จำกัด ที่ให้ความช่วยเหลือในการประสานงานต่างๆ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีย์ชน ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และ
ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่ให้การ
สนับสนุนการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเจ้าของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จุริย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรีที่ให้ความ
อนุเคราะห์สถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ พี่ๆ ปรียญาเอกและเพื่อนๆ ปรียญาโททุกคน ที่ช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการเก็บ
ข้อมูลระหว่างวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งการดูแลความเรียบร้อยในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง และผู้ใกล้ชิดทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน
การศึกษาและเป็นกำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ชยพร ทิพย์ศรีมงคล

มกราคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	51
สรุปและข้อเสนอแนะ	83
สรุป	83
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	102

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แหล่งที่มาของเบต้ากลูแคน	24
2	ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ DV AQUA	36
3	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน	51
4	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน	55
5	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	58
8	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังได้รับอาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	60
9	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	62
10	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	64
11	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย <i>V.harveyi</i> เท่ากับ 8.2×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง	69
13	แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับ DV AQUA ในระดับต่างกัน	73
14	แสดงข้อมูลผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อทดลองที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้น 0.25% และบ่อควบคุม	75
15	การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสารDV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 60 วัน และกุ้งชุดควบคุม	76
16	คุณสมบัติของน้ำในบ่อทดลองที่ให้อาหารผสม DV AQUA และบ่อควบคุม	82

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการแข็งตัวของเลือด	12
2	การทำงานของสารโปรตีนพอก peroxinectin	15
3	โครงสร้างของเบต้ากลูแคน	23
4	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD [®] superoxide dismutas	43
5	น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความ เข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 50 วัน	52
6	น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความ เข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะ 0, 20, 35 และ 50 วัน	53
7	กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ DV AQUA 0.25 เปอร์เซ็นต์ (A) และ DV AQUA 0.125 เปอร์เซ็นต์ (B) เทียบกับชุดควบคุม (C)	53
8	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน	55
9	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ระยะ 0, 20, 35 และ 50 วัน	56
10	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อ ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	59
11	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	62
13	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	65
14	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	67
15	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i>	69
16	การฉีดเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิตรต่อตัว	71
17	ลักษณะของเม็ดสี melanin ที่ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> บริเวณที่ถูกศรชี้เกิดที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว	71
18	เนื้อเยื่อบริเวณด้านหลังลำตัว บริเวณที่ถูกศรชี้ คือ เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย	72
19	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	77
20	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 90 วัน	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่ง แปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไมเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	79
22	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้ง ขาวแวนนาไม เทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับ ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	80
23	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิตร) ของกุ้ง ขาวแวนนาไมเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับ ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน	81

**ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตายและ
อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)**

**Effects of DV AQUA on Non-Specific Immune Characteristics, Survival and
Growth of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย สามารถทำเงินรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2551 ประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งในปริมาณสูงถึง 327,353 ตัน เพิ่มขึ้น 1 เปอร์เซนต์ จากปี พ.ศ. 2550 และนำเข้ากุ้งประเทศสูงถึงประมาณ 72,000 ล้านบาท ประเทศผู้ซื้อที่สำคัญของไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป และอีกหลายประเทศในภูมิภาคเอเชีย (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2552) โดยผลิตภัณฑ์กุ้งที่ส่งออกเกือบทั้งหมดจะเป็นกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งกรมประมงได้อนุญาตให้มีการนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 และมีการขยายตัวด้านการเลี้ยงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไม เป็นกุ้งที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีขนาดสม่ำเสมอ และสามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงได้ เกษตรกรส่วนใหญ่จึงนิยมปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงทำให้ต้องใช้อาหารสำเร็จรูปในปริมาณมาก อาหารส่วนที่เหลือรวมทั้งของเสียจากการขับถ่ายจากกุ้งจึงมีการสะสมภายในบ่อมากขึ้นตามระยะเวลาในการเลี้ยง เมื่อสภาพแวดล้อมภายในบ่อเสื่อมโทรมลง คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะทำให้กุ้งเกิดความเครียด ต้องปรับตัวมากกว่าปกติ ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ติดเชื้อโรคได้ง่าย และตายในที่สุด ประกอบกับในช่วงที่ผ่านมาประเทศผู้ซื้อกุ้งหลายประเทศให้ความสำคัญกับมาตรการด้านความปลอดภัยของอาหาร จึงทำให้มีการเข้มงวดในการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีในทุกขั้นตอนของการผลิตสัตว์น้ำ เน้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แนวทางหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก คือ การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) ชนิดต่าง ๆ เช่น วิตามิน ซี เปปติโดไกลัยแคน (peptidoglycan; PG), ลิโปโพลีแซคคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) และเบต้ากลูแคน (β -glucan) เป็นต้น (พชรวดี, 2549; วัชรียา, 2549) โดยเฉพาะสารเบต้ากลูแคน ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ มีคุณสมบัติช่วยในการ

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดี สามารถป้องกันและกำจัดเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายได้ (ฉันทนัน, 2549; Purivirojkul *et al.*, 2006) เนื่องจากสารเบต้ากลูแคนเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) สายยาวของน้ำตาลกลูโคส (Dijkgraaf *et al.*, 2002) สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบอาศัยเซลล์เม็ดเลือดและในน้ำเลือดของกุ้งได้อย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปเบต้ากลูแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ พืชน้ำพอกสาหร่าย เชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิดแต่โดยมากนิยมสกัดจากยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* และ *Schizophyllum commune*) สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารเบต้ากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ (*S. cerevisiae*) ร่วมกับกรดอะมิโนที่สำคัญ คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ รวมถึงวิตามินต่าง ๆ ภายใต้ชื่อการค้า DV AQUA ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัท Diamond V ประเทศสหรัฐอเมริกา (Burgents *et al.*, 2004) ในการเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) ทั้งในห้องปฏิบัติการและในฟาร์มเลี้ยงจริงของเกษตรกร โดยผลการศึกษาที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการเจริญเติบโต และเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้แก่กุ้งขาวแวนนาไมในระดับฟาร์มเลี้ยงต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาผลของสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาผลของสาร DV AQUA ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยง

การตรวจเอกสาร

1. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย

ชลอ และพรเลิศ (2547) กล่าวถึงรูปแบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยแบ่งตามความเค็มของน้ำได้เป็น 2 แบบ คือ

1. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำ เป็นการเลี้ยงในเขตพื้นที่น้ำจืด เช่น พื้นที่ทางภาคกลาง ใช้น้ำความเค็มต่ำมากจนเกือบจะเป็นระดับที่ถือว่าเป็นน้ำจืด โดยจะใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีความเค็ม 100-200 พีพีที มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ระดับความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วทำการเลี้ยงในระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะกั้นคอกก่อน โดยใช้พลาสติกพื้นที่ประมาณ 100 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือเข้าไปในคอกจนได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นก็จะใช้ลูกกุ้งซึ่งปรับความเค็มจากโรงเพาะฟักมาแล้วโดยลูกกุ้งระยะโพสลา์ว่า 10-12 มาปล่อยในคอก อนุบาลประมาณ 3-4 วัน ก็เปิดคอกออก จะไม่นิยมอนุบาลนานเกินไปเพราะอาจจะมีอาการกินกันเอง ส่วนอีกวิธีหนึ่งเกษตรกรจะไม่ทำคอกเหมือนกุ้งกุลาดำ คือเตรียมน้ำความเค็มประมาณ 3-5 พีพีที ทิ้งบ่อแล้วให้ทางโรงเพาะฟักปรับความเค็มของลูกกุ้งอยู่ที่ความเค็มต่ำที่สุดประมาณใกล้เคียงกับที่ปล่อยในบ่อ แล้วนำลูกกุ้งมาปล่อย

2. การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ คือ น้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีทีขึ้นไป ในพื้นที่ริมชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะการเลี้ยงทางภาคใต้และภาคตะวันออก ส่วนใหญ่จะมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 120,000 ตัวต่อไร่ ทำให้ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมสูงมากกว่า 2 ตันต่อไร่ โดยการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกตินั้นจะได้ผลดีกว่าน้ำความเค็มต่ำ เนื่องจากมีการถ่ายน้ำในปริมาณที่มากในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยงได้

2. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม arthropod มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Bachère *et al.*, 2000) โดยจะไม่มีกระบวนการตอบสนองและการสร้างสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) (กิจการ และคณะ, 2543 จ) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด (open circulatory system) (Söderhäll *et al.*, 1996) ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue พบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดิน พบอยู่เป็นชุด ๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และบริเวณใกล้เคียงกับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และทองแดง (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุทองแดง ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน ในน้ำเลือดกุ้งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ hemocyanin (Ratcliffe *et al.*, 1985) โดยมีประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด (Djangmah, 1970) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดของตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง (Chen and Cheng, 1993) กุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค โดยเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ เกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

2.1 กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism)

กุ้งมีโครงสร้างแข็งภายนอก (exoskeleton structure) เป็นสารพวก chitin และ chitosan โดยบริเวณเนื้อเยื่อภายใต้โครงสร้างปกคลุมที่เรียกว่า เปลือก จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลังสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโต กุ้งก็จะสามารถกำจัดพวกปรสิตบริเวณผิวหนังตัวออกไปพร้อมกับเปลือกแข็งด้วย

2.2 กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

2.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular defence mechanism) การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) 3 ชนิด คือ hyaline cell, semi-granular และ large granular (Martin and Graves, 1985; Hose *et al.*, 1987) กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อ ภายในกระแสเลือด ต่อม้ำเหลือง (lymphoid organ) กล้ามเนื้อหัวใจ hepatopancreas และอวัยวะอื่น ๆ

กิจการ และคณะ (2543 จ) รายงานว่า เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด โดยใช้การมีหรือไม่มีกรานูล (granules) ในเซลล์เป็นหลัก คือ

1) hyaline cell หรือ hyaline hemocyte (hyalinocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบนกลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules ในปริมาณน้อยมากหรือไม่พบเลยและไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมโครเมตร ยาว 6.8-13.9 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) (กิจการ และคณะ, 2543 ก)หน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and Smith, 1986)

2) semi-granular cell หรือ semi-granular hemocyte (semi-granulocyte) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ เซลล์พบ SER และ RER ได้มาก มี cytoplasmic granules ขนาดเล็ก และจำนวนน้อย เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร และยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร ลักษณะของ cytoplasmic granules ภายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน

จากผิวหนังนอก (กิจการ และคณะ, 2543 ก) ทำหน้าที่โดยตรงในการห่อหุ้ม และทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell นี้ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกินได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) large granular cell หรือ large granular hemocyte (granulocyte) มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ คล้ายกับ semi-granular cell แต่ขนาดของเซลล์จะโตกว่า นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ เซลล์มี SER และ RER ปานกลางและพบ cytoplasmic granules มาก ขนาดของกรานูลในไซโทพลาซึมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543 ก) ซึ่งใหญ่กว่ากรานูลใน semi-granular cell ลักษณะการยืดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมโครเมตร ความยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร และความกว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ prophenoloxidase activating system รวมทั้งยังสามารถทำการห่อหุ้มและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation (Söderhäll and Cerenius, 1992)

ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรธนาไฉ, 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำจะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

การศึกษาเม็ดเลือดของกุ้งโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular technique) ร่วมกับเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันมาศึกษาโปรตีนในเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization (Keyser, 1999), enzyme activity (Söderhäll and Smith, 1983 a; Smith and Soderhall, 1983; Sequeira *et al.*, 1996), immunogold (Liang *et al.*, 1992), immunofluorescence (Johansson *et al.*, 1999) และ immunoprecipitation (Liang *et al.*, 1992) โปรตีนชนิด prophenoloxidase (proPO) และ peroxinectin สามารถพบได้ในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell ส่วนโปรตีนชนิด cell-surface superoxide dismutase และ α -macroglobulin พบมากในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell แต่พบน้อยในเม็ดเลือดชนิด

hyaline cell ส่วนโปรตีนชนิด transglutaminase พบได้ในเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ semi-granular cell แต่ไม่พบในเม็ดเลือดชนิด large granular cell เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย ปริมาณเม็ดเลือดภายในตัวกึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และจะมีปริมาณลดลงเมื่อเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนเม็ดเลือดที่ตายไปในปริมาณที่เหมาะสม

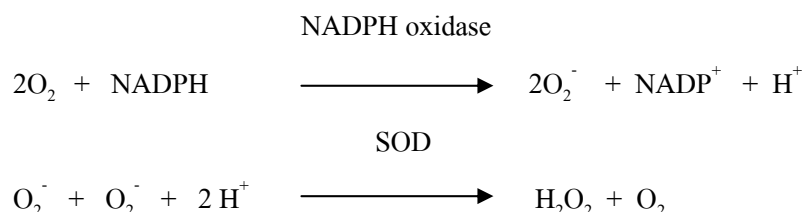
ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีกระบวนการหลัก ๆ 3 แบบ ได้แก่

1) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

เป็นกลไกพื้นฐานในการทำลายหรือกำจัดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย โดยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด hyaline cell เป็นหลัก และมีการทำงานร่วมกับ semi-granular cell บ้าง โดยกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ไม่จำเพาะ ซึ่งจะเริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไปหรือมีการโอบล้อมโดยการใช้ไซโทพลาซึมยืดออกเป็นเท้าเทียม เกิดเป็น phagosome ซึ่งจะสัมผัสกับ lysosome ที่อยู่ภายในเซลล์ ได้เป็น phago-lysosome ภายใน lysosome บรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย เรียกว่า acid hydrolases รวมถึงเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) ได้แก่ เอนไซม์ DNases, เอนไซม์ที่ทำลายสาร ribonucleic acid (RNA) ได้แก่ เอนไซม์ RNases, เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารโปรตีน ได้แก่ proteases, เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารจำพวกฟอสเฟต ได้แก่ phosphatases และเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพวกไขมัน ได้แก่ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ hydrolysis ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจำแนกได้เป็น 6 ชนิด ได้แก่ c-type, g-type, plant lysozyme, phage lysozyme, i-type, bacteria-lysozyme (Hikima *et al.*, 2003)

การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด และมีการยื่นไซโทพลาซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจน (O_2) เข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) ต่อจากนั้น superoxide

anion จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



superoxide anion อาจถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ และได้ออกซิเจน 1 โมเลกุล (singlet oxygen; $^1\text{O}_2$) เป็นผลผลิตร่วมกับ hydrogen peroxide นอกจากนี้ superoxide anion ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radicle (OH) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



จากปฏิกิริยาข้างต้น superoxide anion , hydrogen peroxide , ออกซิเจน 1 โมเลกุล และ hydroxyl radical มีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกเซลล์เม็ดเลือดนำเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีผู้รายงานไว้ในกึ่งกลางดำ (สมบัติ, 2542; Song and Hsieh, 1994; Sung and Song, 1996)

2) กระบวนการ nodule formation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) โดยจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็น nodule จะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย มักพบการสร้าง nodule ที่เหงือก และhepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสี melanin ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือด

ที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ semi-granular cell และ large granular cell (Johansson and Soderhall, 1989)

3) กระบวนการ encapsulation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น เชื้อรา หนองตัวกลม ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ เป็นต้น (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) จนเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถกำจัดได้ทัน นอกจากนี้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ encapsulation จะอาศัยองค์ประกอบในกระบวนการ prophenoloxidase activating system พร้อมกับการเกิดเม็ดสี melanin (Ratcliff *et al.*, 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเป็นชนิดเดียวกันกับการเกิดกระบวนการ nodule formation จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ง) ได้ทำการทดลองโดยใช้ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นสิ่งแปลกปลอมเพื่อติดตามและตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน โรคของกิ้งกูดดำ ด้วยวิธีนับเม็ดเลือดรวมและเนื้อเยื่อวิทยา จากการทดลองหลังจากฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกิ้ง 1 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง และผลการศึกษาเนื้อเยื่อพบว่า เหนือ ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับ หลังจากนั้น ชั่วโมงที่ 3-9 พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงและสุดท้ายมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความแตกต่างของโครงสร้างเม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเซลล์ไม่พบ granule ภายในไซโทพลาซึมมี vacuole ขนาดใหญ่ในไซโทพลาซึมและพบเศษเซลล์ (debris) และลักษณะของ myelin figure แสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอมและเกิด autophagic vacuole (กิจการ และคณะ, 2543 จ)

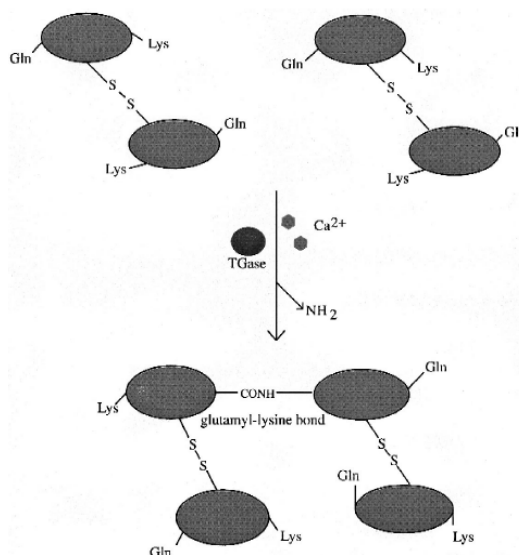
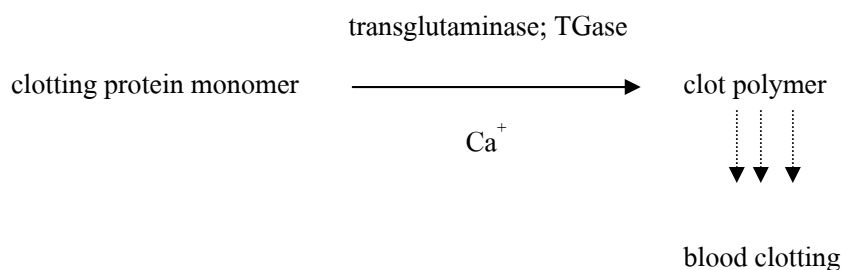
2.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

มีการทำงานต่อหรือพร้อมกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำและเข้าจับกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) มีน้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันตามความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเชื้อก่อโรค เช่น ถ้า PRPs จับกับโมเลกุลของเบต้ากลูแคน ซึ่งสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ (yeast) และ hyphae ของเชื้อรา จะมีชื่อเรียกว่า β -glucan binding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ในส่วนของเปปติโดกลัยแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก จะมีชื่อเรียกว่า peptidoglycan binding protein และไลโปโพลีแซคคารไนด์ สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จะมีชื่อเรียกว่า lipopolysaccharide binding protein (ชัยชาญ, 2545)

โดยโมเลกุลของสารเบต้ากลูแคน, ไลโปโพลีแซคคารไนด์ และเปปติโดกลัยแคนเรียกรวม ๆ ว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) เมื่อ PAMPs แต่ละชนิดเข้ามาในกระแสเลือดกิ้ง โมเลกุลของ PRPs จะเคลื่อนที่เข้าไปจับกับ PAMPs ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (protein complex) ได้แก่ β -1,3-glucan-binding protein complex (Sritunyalucksana *et al.*, 1999) , lipopolysaccharide -binding protein complex และ peptidoglycan -binding protein complex (ชัยชาญ, 2545) โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดให้เคลื่อนที่เข้ามา (migration) ซึ่งบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell มีส่วนรองรับแบบจำเพาะ (receptor) ซึ่งสามารถรองรับโมเลกุลเชิงซ้อน และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ degranulation ของเม็ดเลือด (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ซึ่งภายในกรานูลจะประกอบไปด้วยเอนไซม์และสารประกอบโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ transglutaminase (TGase), lectin, peroxinectin, protein released และเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยสารทั้งหมดที่หลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

1.) กระบวนการแข็งตัวของเลือด

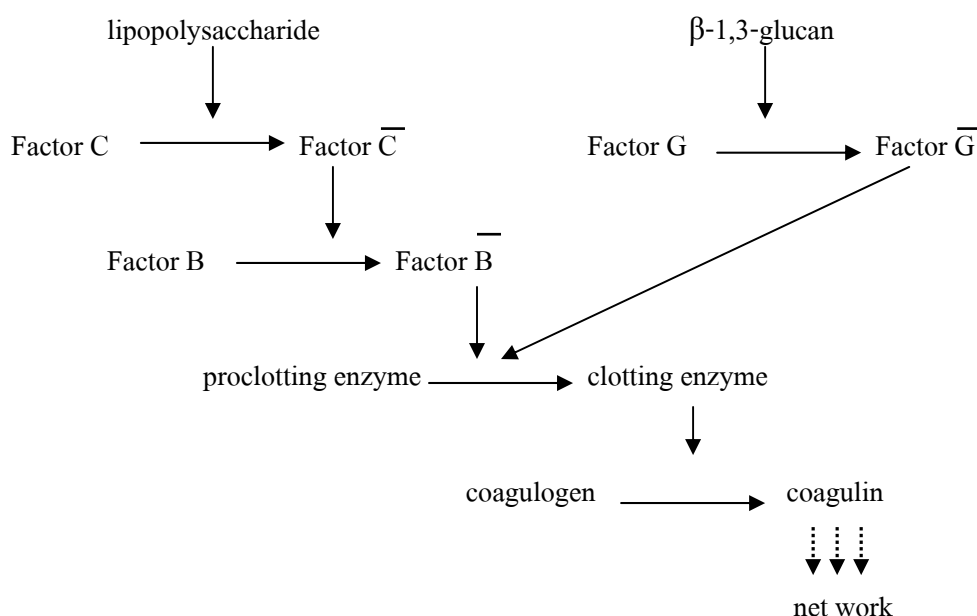
เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ transglutaminase จะไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่งไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดกึ่ง (วัชรียา, 2547) โดย transglutaminase จะทำงานร่วมกับ calcium ion (Ca^{+}) กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการจับตัวเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้มีเลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting) ดังแสดงในสมการต่อไปนี้



ภาพที่ 1 กระบวนการแข็งตัวของเลือด

ที่มา: Sritunyalucksana *et al.* (1999)

ในกระดองของปู (horseshoe crab) ชนิด *Tachypleus tridentatus* มีสารโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ ได้แก่ serineproteinase zymogen factors C, B, G และ proclotting enzyme ไหลเวียนอยู่ในกระดอง โดย factors C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ และ factors G จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ β -1,3-glucan (Nakamura *et al.*, 1989; Seki *et al.*, 1994) โดย proclotting enzyme กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ได้เป็นสาร coagulin ส่งผลให้เกิดการจับตัวเป็นร่างแห เกิดการแข็งตัวของเลือดและเลือดไม่สามารถไหลออกจากร่างกายได้ (Iwanaga, 1993) ดังสมการต่อไปนี้



Yeh *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดกิ้งกูด้า โดยแยก clottable protein จากน้ำเลือดโดยใช้เทคนิค sequential DEAE anion-exchange chromatography ซึ่งโปรตีนนี้จะเกิดการแข็งตัวเมื่อมีแคลเซียมไอออน และเอนไซม์ TGase ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งสามารถทนความร้อนได้ถึง 66 องศาเซลเซียส จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า clottable protein มีขนาด 380 kDa โดยการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ MALDI-TOF mass spectrometry และยังพบว่ามีโครงสร้างของ amino acid และขนาดของโปรตีนคล้ายกับที่พบในกิ้งกูดอื่น ๆ ทั้ง prawns, lobster และ crayfish ด้วย

Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดในกุ้ง crayfish พบว่า ในเม็ดเลือดทั้งชนิด semi-granular cell และ large granular cell รวมถึงเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อมีกิจกรรมที่เกิดการแข็งตัวของเลือดอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TGase แต่กิจกรรมดังกล่าวกลับไม่พบใน hepatopancreas และน้ำเลือด เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ nucleotide พบว่าลำดับเบสของเอนไซม์ TGase ของกุ้ง crayfish มีความคล้ายคลึงกันมากกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Huang *et al.* (2004) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ TGase ในกุ้งกุลาดำพบว่ามีความคล้ายกับกุ้ง crayfish สัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ และสามารถตรวจสอบพบได้ในทุกอวัยวะ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกมาในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อส่วน hematopoietic tissue อีกด้วย

2.) การหลังสาร lectin

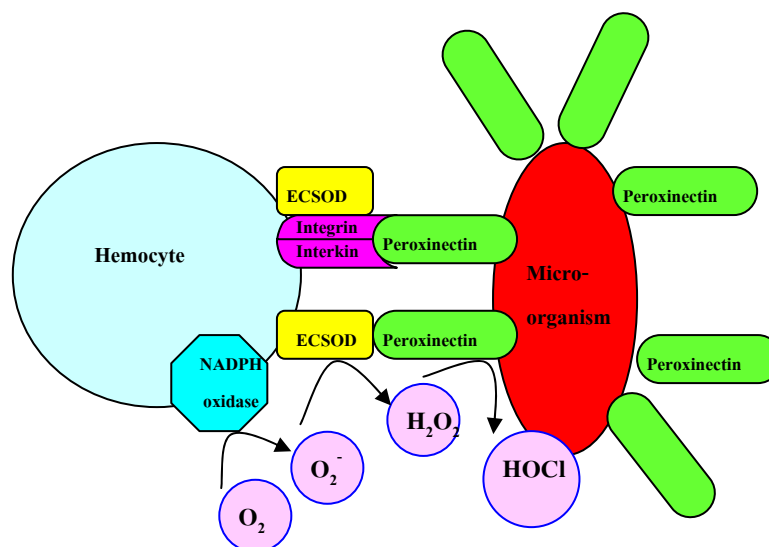
เป็นสารชนิดโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoproteins) ที่มีคุณสมบัติในการจับได้อย่างจำเพาะกับสารพวคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยเรียกว่า carbohydrate-recognition domain (CRD) มี 2 ชนิด คือ C-type lectins และ S-type lectins (Freire Marques and Barracco, 2000) โดย lectin มีลักษณะเป็น bivalent จึงสามารถเชื่อมต่อกับเซลล์แบคทีเรียได้ถึง 2 เซลล์ ทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์แบคทีเรียได้ รวมทั้งทำหน้าที่ opsonin ได้อีกด้วย (เสาวลักษณ์, 2550) สาร lectin สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Vasta *et al.*, 1994)

3.) การหลังสารโปรตีนพวก peroxinectin

เป็นสารที่คล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factors) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ช่วยในการประสานงาน (พชรวิ, 2549) ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสาร peroxinectin เป็นสารชนิดโปรตีนมีขนาดของโมเลกุลประมาณ 89.1 kDa (Liu *et al.*, 2004) จะทำหน้าที่เป็นสาร opsonin เคลือบบนผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่อยู่ในกระแสเลือด โดยจะกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้าและเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Smith and

Chisholm, 1992) nodule formation และ encapsulation โดยช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับเชื้อก่อโรค และช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดกระบวนการ degranulation มากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์และสารโปรตีนต่าง ๆ ภายในกรานูลถูกปล่อยออกมามากขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system

บนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งมีส่วนรองรับ (receptor) แบบจำเพาะกับสาร peroxinectin ที่เรียกว่า integrin, interkin และ extracellular superoxide dismutase (ECSOD) ทำหน้าที่เป็นส่วนรองรับของเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำให้เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและมีการหลั่งเอนไซม์ NADPH oxidase ออกสู่ผิวเซลล์เม็ดเลือด มีการใช้ออกซิเจนสูงมากภายนอกเซลล์ ได้ผลผลิตเป็น reactive oxygen intermediates (ROI) ชนิดต่าง ๆ ซึ่งแก่ superoxide anion, hydrogen peroxide และ hypochlorous acid (HOCl) ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค โดยเฉพาะ hypochlorous acid ซึ่งมีสภาพเป็นกรดรุนแรง ส่งผลให้ผนังเซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกออกได้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การทำงานของสารโปรตีนพวก peroxinectin
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Smith and Chisholm (1992)

4.) การหลั่งสาร โปรตีน (protein released)

เป็นสารโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial peptide) มีการหลั่งอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ของเซลล์เม็ดเลือดและมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อแบคทีเรีย โดยมีขนาดโมเลกุลโปรตีนประมาณ 6.5 kDa สารโปรตีนบางชนิดที่หลั่งออกมานั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมาก เช่น

$\alpha - 2$ macroglobulin (α -2M) หน้าที่ในการยับยั้งหรือทำให้พิษจากเชื้อก่อโรคเป็นกลาง (neutralization) รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase (เอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน) ของเชื้อก่อโรค และทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้าง proteinase ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system อีกด้วย (Aspan *et al.*, 1990; Dieguez-uribeondo and Cerenius, 1998)

lysosome C type หน้าที่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลายระบบ osmoregulation ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

penedin เป็นสารโปรตีนที่มีประจุบวก (cationic antibacterial peptide) หน้าที่เข้าไปเคลือบบนผนังเซลล์เชื้อก่อโรค ส่งผลให้ประจุจากเชื้อก่อโรคมีสถานะเป็นกลางและหมดความสามารถในการก่อโรค (Destoumieux *et al.*, 1997)

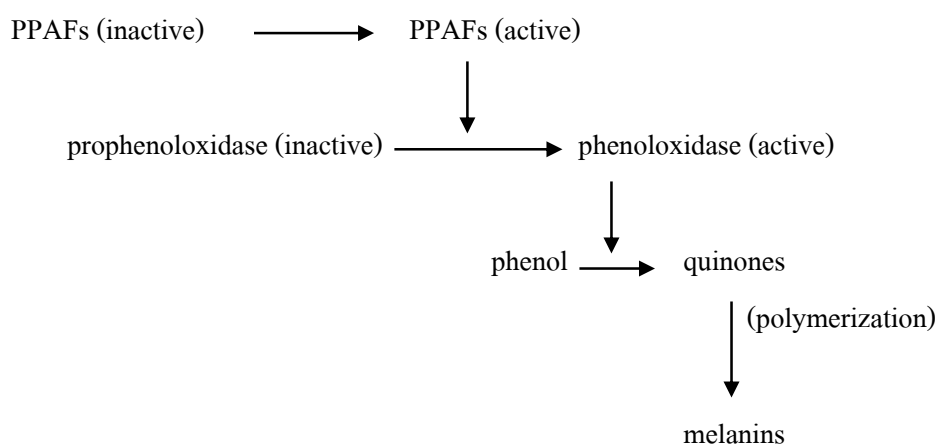
crustin หน้าที่เข้าไปเคลือบบนผนังเซลล์ทำให้เกิดการจับกันเป็น nodule เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย (Cuthbertson *et al.*, 2002)

peptide (Schnapp *et al.*, 1996) และ callinectin (Khoo *et al.*, 1999)

สารโปรตีนพวก protein released สามารถพบได้ทั้งส่วนของน้ำ ชีรุมและในสารละลายเม็ดเลือดที่แตก (hemocyte lysate supernatant)

5.) กระบวนการ prophenoloxidase activating system

เป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง เมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารพวก proenzyme และ substrates ต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยเอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่ยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive) จะต้องถูกกระตุ้นด้วยสารที่เรียกว่า serine proteinase homologues (SPHs) ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ร่วมกับเอนไซม์ prophenoloxidase activating factor/enzyme (PPAFs) (Söderhäll and Cerenius, 1998) และมีการทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน กระตุ้นให้เอนไซม์ prophenoloxidase สามารถทำงานได้ (active) (Hose *et al.*, 1987) โดยเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า เอนไซม์ phenoloxidase (PO) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยน tyrosinase ให้เป็น dihydroxylation และออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ซึ่งได้แก่ dihydroxyphenylalanine (DOPA) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) หลังจากนั้นควิโนนจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ dopachrome และเกิดกระบวนการ polymerization เกิดเป็นสาร melanin กระบวนการเกิดสาร melanin มีชื่อเรียกอีกว่า melanin formation หรือ melanization (ดั่งสมการ) โดยหน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992; Bachère *et al.*, 2004) และป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Söderhäll and Smith, 1986; Sung *et al.*, 1996) และทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances)



โดยเอนไซม์ prophenoloxidase อยู่ในกรานูลในไซโทพลาซึมของเม็ดเลือดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงในซีรัมของกุ้ง (Perrazzolo and Barracco, 1997) และมีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง (Sung *et al.*, 1996; Perazzolo and Barracco, 1997) จากการศึกษาของ Söderhäll and Smith (1983 b) ได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean หลายชนิด โดยใช้สารละลาย Percoll 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell มีค่าเอนไซม์ prophenoloxidase สูงถึง $1,249.51 \pm 313.36$ หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนใน hyaline cell มีค่าเอนไซม์ prophenoloxidase ต่ำกว่า คือ 198.95 ± 78.75 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ทวิศักดิ์ (2547) รายงานว่าปริมาณของเอนไซม์ prophenoloxidase ในกุ้งกุลาดำ อายุ 1-4 เดือน มีการเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase สูงที่สุด

Moullac *et al.* (1998) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ prophenoloxidase ในสัตว์กลุ่ม crustacean ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ช่วงระยะเวลาของการลอกคราบ (intermoult) และระยะก่อนการลอกคราบ (pre-moult) มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ prophenoloxidase

การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายกุ้ง มีการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยจะตอบสนองทั้งภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดและภูมิคุ้มกันที่น้ำเลือด ส่งผลให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับเชื้อก่อโรค โดยจำนวนเซลล์เม็ดเลือดจะลดลงทันทีในช่วงชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงที่สองและที่สาม ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอยู่ในระดับต่ำลงหลังจากชั่วโมงที่สี่ จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (กิจการ และคณะ, 2543 จ) นอกจากนี้พบว่าอวัยวะ ได้แก่ หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี และผลผลิตสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีสารสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการ prophenoloxidase activating system

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง คือ ต่อมน้ำเหลือง (Martin *et al.*, 1993) hemopoietic tissue ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิด โดยเซลล์เม็ดเลือดมีการกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ หัวใจ ทางเดินอาหาร เซลล์

เม็ดเลือดที่มักจะพบ คือ hyaline cell ซึ่งพบเศษเซลล์ และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และเกิด autophagic vacuoles (กิจการ และคณะ, 2543 จ)

Fontaine and Lightner (1975) ศึกษาเกี่ยวกับระบบการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บของกุ้งสกุล *Penaeus* พบว่าเมื่อกุ้งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม โดยมีการทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือเป็นแผลขึ้นปฏิกิริยาแรกที่กุ้งมีการตอบสนอง คือ มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดไปยังบริเวณที่เกิดบาดเจ็บ จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดก็จะเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมขึ้น ซึ่งเป็นการกำจัดเชื้อโรคในขั้นตอนแรก จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา encapsulation มี cellular infiltration จะเกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้น และมี collagen like fibers เกิดเป็นแผลถาวรและมีการสร้างเม็ดสี melanin จากกระบวนการ melanization

3. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

3.1 คุณภาพน้ำ

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียด มีการลดลงของการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ง่ายต่อการติดเชื้อ โดยคุณภาพน้ำที่สำคัญมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่

3.1.1 ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอชของน้ำ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากในรอบวันหรือมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเล็ดลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวมและความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (กิจการ และคณะ, 2543 จ)

3.1.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ในสถานะที่ออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำ จะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพฤติกรรมการดำรงชีวิต โดยกุ้งจะเคลื่อนที่ช้าลงเพื่อลดกิจกรรมการใช้ ออกซิเจนในร่างกาย และจะว่ายน้ำสู่ผิวน้ำเพื่อรับออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลงส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเล็ด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Seidman and Lawrence (1986) พบว่าที่ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำ

กว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไม (Martinez-Palacios *et al.*, 1996) มีอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัวลดลง

3.1.3 อุณหภูมิของน้ำ เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำจะมีผลต่อระดับภูมิคุ้มกัน พบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของ phenoloxidase และค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง กว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จากการศึกษาของ Yu (1993) เมื่ออุณหภูมิต่ำลงและมีการเลี้ยงกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมจะลดลง ซึ่งทำให้กุ้งมีอัตราการหายใจและน้ำหนักตัวลดลง โดยกุ้งที่เลี้ยงในตู้ทดลองที่มีอุณหภูมิก่อนข้างต่ำ และมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบวันมาก ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและมีผลต่อโปรตีนในซีรัมมากที่สุด

3.1.4 ความเค็มของน้ำ เนื่องจากความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำ โดยน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที มีค่า osmolality ใกล้เคียงกับในตัวกุ้ง เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมมีค่า isoosmotic point (IOP) เท่ากับน้ำความเค็ม 24.7 พีพีที จึงทำให้กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที ไม่ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ส่งผลให้พลังงานและสารอาหารที่ได้รับมาจากอาหาร สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไป กุ้งต้องนำพลังงานที่ได้มาใช้ในการปรับตัวเป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้เหลือพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีน้อยลง

Vargas-Albores *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus californiensis* ที่อาศัยอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิและความเค็มของน้ำสูงหรือต่ำกว่าปกติจะส่งผลให้ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าโปรตีนในน้ำเลือดลดลง

กิจการ และคณะ (2543 ข) ได้ทำการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่าในสภาพที่พีเอชของน้ำต่ำกว่าค่าปกติ (6.0) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase แต่มีผลให้ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมที่พีเอชปกติ (7.8) จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความ

ว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจนละลายน้ำปกติ (5.0-5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดต่ำกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง

Martin and Graves (1985) ได้รายงานว่าที่อุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลงและมีผลให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำลงด้วย

3.2 ชีวิตวิทยาบางประการของกุ้ง

กุ้งมีช่วงระยะเวลาของการลอกคราบและระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Moullac *et al.*, 1998) กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการลอกคราบของกุ้ง เนื่องจากน้ำจากตัวกุ้งจะมีการแพร่ออกและน้ำจากภายนอกจะมีการแพร่เข้าสู่ร่างกาย โดยกุ้งเมื่อเข้าสู่ระยะลอกคราบตัวกุ้งจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายเพื่อให้ร่างกายขยายตัวและลอกออกจากคราบเดิม เมื่อลอกคราบเสร็จตัวกุ้งจะมีการดึงแร่ธาตุกลับเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะแร่ธาตุแคลเซียม เพื่อใช้ในการกระบวนการสร้างเปลือกแข็ง ส่งผลให้กุ้งที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ แร่ธาตุในน้ำมีไม่เพียงพอในการสร้างเปลือกพร้อมกับมีน้ำแพร่เข้าสู่ตัวกุ้งตลอดเวลา ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอและตายขณะที่เปลือกยังนิ่มอยู่ และเมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำที่ความเค็มสูง ทำให้น้ำในร่างกายกุ้งมีการแพร่ออกตลอดเวลาแม้จะอยู่ในระยะก่อนลอกคราบซึ่งกุ้งจะต้องใช้พลังงานมากในการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้กุ้งลอกคราบไม่ได้และตายในที่สุดและ Santos and Nary (1987) ได้ทำการศึกษาในปู *Chasmagnathus granulata* ที่อาศัยบริเวณปากแม่น้ำ พบว่าความเค็มของน้ำส่งผลให้น้ำตาลในเลือดลดต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปลี่ยนจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พิพีติ ไปเป็นน้ำจืด

กิจการ และคณะ (2543 ง) ได้ทำการศึกษาก่อนการลอกคราบและระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำโดยแยกตามเพศ น้ำหนักและวงจรการลอกคราบ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงในระยะก่อนลอกคราบ (pre-molt, D-stage) และมีค่าต่ำสุดหลังลอกคราบ (post-molt; A, B-stage) เอนไซม์ phenoloxidase มีค่าสูงสุดในระยะระหว่างลอกคราบปกติ (intermolt, C-stage) ลดลงในระยะก่อนลอกคราบและมีค่าต่ำสุดหลังลอกคราบ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และปริมาณน้ำตาลในเลือดไม่ขึ้นกับเพศและขนาดของกุ้ง ส่วนระยะการลอกคราบของกุ้งจะมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนโดยกุ้งที่อยู่ในระยะก่อนลอกคราบ ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนสูงกว่ากุ้งในระยะที่คราบแข็ง และระยะหลังลอกคราบ กุ้งที่อยู่ในระยะหลังลอกคราบมีระบบภูมิคุ้มกันลดต่ำลง ส่งผลให้กุ้งเกิดการติดเชื้อได้มากกว่าระยะอื่น ๆ

Le et al. (1997) ได้ทำการศึกษาก่อนการลอกคราบและปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้ง *Penaeus stylirostris* ในระยะคราบแข็งจะต่ำกว่าระยะก่อนลอกคราบ และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase จะมีค่าลดลงในระหว่างการลอกคราบและมีค่าสูงขึ้นในระยะที่คราบแข็งดี

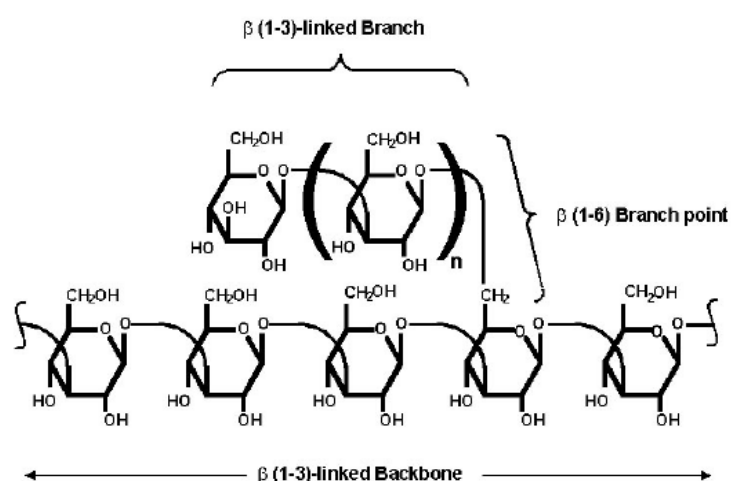
Yu (1993) ได้ทำการศึกษาก่อนการลอกคราบและปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้ง *Penaeus japonicus* ปกติมีค่าต่ำสุดในระยะคราบแข็งและจะมีค่าสูงสุดในระยะก่อนลอกคราบและปริมาณของเม็ดเลือดรวมจะลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลงและในสภาวะของการเลี้ยงที่หนาแน่นสูง

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งจะเปลี่ยนแปลงไปได้ในกรณีของการเกิดโรคติดเชื้อหรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในสภาวะที่น้ำมีการปนเปื้อนจากของเสียชุมชน (Smith et al., 1985)

4. เบต้ากลูแคน

สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ พืชน้ำพอกสาหร่าย เชื้อรา และแบคทีเรียบางชนิด (ตารางที่ 1) โดยมากนิยมสกัดจากยีสต์ (*S. cerevisiae*) ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยกลูแคน 30-35 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน (mannan) 30 เปอร์เซ็นต์

เบต้ากลูแคนมีโครงสร้างที่สำคัญ คือ เป็นสารโพลีแซคคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glycoside linkage ตรงโมเลกุลของธาตุออกซิเจนที่ธาตุน้ำตาลตำแหน่ง C1 กับ hydroxyl ที่ธาตุน้ำตาลตำแหน่ง C3 ของอีกชุดหนึ่ง ได้เป็น β -1,3 เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวทำหน้าที่เป็นแกนกลาง และมีการแตกแขนงออกด้วยสายเชื่อมของโมเลกุลกลูโคสที่ต่อดด้วยพันธะ β -1,6 กับเบต้ากลูแคนสายหลัก ซึ่งจะมีขนาดสั้นยาวแตกต่างกันออกไป



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเบต้ากลูแคน (Poly-[1-6]-beta -D-Glucopyranosyl-[1-3]-beta D-Glucopyranose) (Dijkgraaf *et al.*, 2002)

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของเบต้ากลูแคน

Component	Grain	Yeast	Mushroom	Bacteria
เปอร์เซ็นต์				
Dietary Fiber	15.9	30	22.5	86
เปอร์เซ็นต์				
β -glucan	6-8	30-60	21-25	85-99
Structure	1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4	13 $\rightarrow$ 16	13 $\rightarrow$ 16	13
Isolated from	Oat	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Phellinus linteus</i>	<i>Agrobacterium</i> spp.
	Barley Rye	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Coriolus versicolor</i>	
			<i>Ganodema lucidum</i>	
			<i>Agaricus blazeimurill</i>	
Isolated Part	Surface of grain	Cell wall of the yeast	Mycellium fruit body	Polysaccharide

ที่มา: Manners *et al.* (1973)

การศึกษาประโยชน์ของเบต้ากลูแคนครั้งแรกเริ่มขึ้นในทศวรรษที่ 40 เมื่อ Pillemer and Ecker (1940) ศึกษา zymosan ที่เตรียมได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแต่ในขณะนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นองค์ประกอบส่วนใดของ zymosan ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ ต่อมาในทศวรรษที่ 50 Riggi and Di Luzio (1961) ได้ทำการวิจัยต่อเนื่องและทำให้ทราบว่าสารเบต้ากลูแคนใน zymosan สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำได้

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เบต้ากลูแคนในกุ้งทะเล มีดังนี้

Sung *et al.* (1996) ศึกษาการใช้เบต้ากลูแคนในกุ้งกุลาดำ โดยแช่กุ้งในสารละลายเบต้ากลูแคนที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาแช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ความเข้มข้น 5×10^7 CFU/มิลลิลิตร นาน 12 ชั่วโมง พบว่ากุ้งในชุดทดลองสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียได้นาน 18 วัน ในขณะที่กุ้งในชุดควบคุมสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียได้เพียง 2 วัน

Vargas-Albores *et al.* (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อรา คือ ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์และสารเบต้ากลูแคน สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ ได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม, nodule formation, encapsulation และการแข็งตัวของเลือดสูงขึ้น โดยไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์และเบต้ากลูแคนจะกระตุ้น PRPs ในน้ำเลือดให้เกิดการเชื่อมต่อของไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์และ β -1,3 glucan กับ lipopolysaccharide-binding protein และ β -1,3 glucan binding protein เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไปกระตุ้นที่ membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารต่าง ๆ ออกมาในระบบภูมิคุ้มกัน (Knaap, 1993)

Chang *et al.* (2000) พบว่าการใช้เบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์ *S. commune* ผสมอาหารในอัตรา 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและเกิดเซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้ามาได้สูงกว่าชุดที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคน โดยการเสริมเบต้ากลูแคนสามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้สูงสุดที่ 24 วัน ภายหลังการเริ่มให้อาหาร

Chang *et al.* (2003) ศึกษาการต้านทานเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) ของกุ้งกุลาดำ พบว่าการใช้เบต้ากลูแคน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 20 วัน สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวได้ดีกว่าการใช้เบต้ากลูแคนระดับ 0, 1, 2 และ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

Chang *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของสารเบต้ากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ชนิด *S. commune* แก่กุ้งกุลาดำในระยะ juvenile (น้ำหนัก 6.5 ± 0.4 กรัม) โดยการผสมอาหารที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หลังจากนั้นทำการฉีดเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) แล้วสุ่มเก็บเลือดกุ้งในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 เพื่อตรวจวัด total haemocyte count (THC), phagocytosis, phenoloxidase (PO), superoxide anion (O_2^-) และ superoxide dismutase (SOD) บันทึกอัตราการรอดตายของกุ้ง จากการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในระดับต่ำกว่า 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่งผลให้กุ้งตายทั้งหมดในวันที่ 12 ส่วนกุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนในระดับ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ามีอัตราการรอดตายสูงสุดในวันที่ 9 และเมื่อทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค PCR ในกุ้งกุลาดำระยะ juvenile ที่ได้รับอาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนในระดับที่ 2, 10 และ 20

กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเท่ากับ 55, 65 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ยังพบว่าภายหลังจากหยุคให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนและนิโคตินิกแอซิดไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว พบว่าค่า THC, PO, O₂⁻ และ SOD จะลดลงอย่างรวดเร็ว

Suphantharika *et al.* (2003) พบว่าการใช้เบต้ากลูแคนจาก Spent brewer's yeast สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกิ้งกูดดำมีการเกิดกระบวนการ phenoloxidase activity ในหลอดทดลอง ได้สูงกว่าชุดควบคุมและการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารในอัตรา 0.2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก กิ้งกูดติดต่อกันเป็นเวลา 3 วันสามารถกระตุ้นให้กิ้งกูดมีการเกิดกระบวนการ phenoloxidase activity ได้

Supamattaya *et al.* (2000) ได้ทดลองเลี้ยงกิ้งกูดดำ 3 ขนาด น้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม โดยให้อาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (ผลิตภัณฑ์ เบต้ากลูแคน: MacroGard® ซึ่งได้จาก ยีสต์ชนิด *S. cerevisiae*) 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50 และ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในกิ้งกูดทดลองทั้ง 3 ขนาด เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ของกิ้งกูดที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่ากิ้งกูดมีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณสูงขึ้น โดยกิ้งกูดที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม การผลิต superoxide anion และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดของกิ้งกูดดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกิ้งกูดที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ชุดการทดลองอื่นและชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กิจการ และคณะ (2543 ค) ศึกษาผลของเบต้ากลูแคนต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกิ้งกูดดำ โดยทดลองในกิ้งกูดน้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม โดยให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.5 และ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ของกิ้งกูดที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ในกิ้งกูดขนาดเล็ก และ 5 สัปดาห์ในกิ้งกูดขนาดใหญ่ พบว่ากิ้งกูดมีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในปริมาณที่สูงขึ้น โดยกิ้งกูดขนาดเล็กที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 0, 0.25, 0.50 และ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 50, 68, 69 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกิ้งกูดใหญ่มีอัตราการรอด 33, 33, 60 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณเม็ดเลือดรวม การผลิต superoxide anion ของกิ้งกูดที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในระดับต่าง ๆ พบว่าได้ค่าสูงสุดจากชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

พรเลิศ และคณะ (2541) ทำการศึกษาโดยใช้สารเบต้า-1, 3-กลูแคน ผสมอาหารให้กิ้งกูดำกินติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน พบว่ากิ้งกูดำที่ได้รับสารเบต้า-1,3-กลูแคน ผสมในอาหารในอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้น มีปริมาณของเอนไซม์ prophenoloxidas เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างกับกิ้งกูดำในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารเบต้า-1,3-กลูแคน

มฤดี (2543) ได้ทำการศึกษาการใช้สารเบต้ากลูแคนในการเลี้ยงกิ้งกูดำในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เพื่อสกัดส่วนของสารเบต้ากลูแคน โดยทำการเลี้ยงยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* ในอาหาร YEPD เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.0 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำให้เซลล์ยีสต์แตกเพื่อสกัดส่วนของเบต้ากลูแคน สกัดผนังเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ให้สารเบต้ากลูแคน 20 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์และมีน้ำตาลรวมเท่ากับ 129 มิลลิกรัมต่อกรัม นำสารที่สกัดได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 0.02 กรัมต่อมิลลิลิตร ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ ขนาด 1 x 11 เซนติเมตร ที่บรรจุ Sephadex G-100 มีปริมาณน้ำตาลรวมสูงสุดเท่ากับ 2.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ Thin-Chromatograph พบว่าสารที่สกัดได้มี Rf เท่ากับสารเบต้ากลูแคนมาตรฐาน ทำการทดลองโดยนำสารเบต้ากลูแคนที่ได้ไปผสมอาหารโดยมีอาหารทดลอง 4 สูตรดังนี้ คือ สูตรที่ 1 เป็นอาหารชุดควบคุม สูตรที่ 2 เป็นอาหารที่ผสมผนังเซลล์ยีสต์ โดยใช้ผนังเซลล์ยีสต์เท่ากับ 8.4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 3 เป็นอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (crude glucan) 1.7 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 4 เป็นอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (pure glucan) 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากิ้งกูดำที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 4 ที่ทำการผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้ผลการทดลองดีที่สุด โดยมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด และเมื่อทำการทดลองความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* กิ้งกูดำมีความต้านทานต่อเชื้อได้ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ได้แก่ กลูโคส (glucose) ซึ่งง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดของกิ้งกูดำและเข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดำได้รวดเร็ว แตกต่างจากสารเบต้ากลูแคนที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และการใช้ผนังเซลล์ยีสต์ผสมในอาหารซึ่งที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ประกอบอยู่ ดังนั้นการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดจะเป็นไปได้ช้ากว่าสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Manners *et al.*, 1973) ส่วนกิ้งกูดำในชุดควบคุมจะมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกิ้งกูดำที่ได้รับเบต้ากลูแคน

วัชรียา (2549) ได้ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 ชนิด ได้แก่ เบต้ากลูแคน และ เปปติโดกลัยแคน รวมทั้งแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ พบว่าการใช้สารเบต้ากลูแคนในปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และการใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ความเข้มข้น 10^{10} - 10^{11} CFU/กรัม) 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเพิ่มค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase การผลิต superoxide anion ความว่องไวในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ และความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคจากระบบไหลเวียนได้ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ ใช้เป็นระยะเวลา 5 วัน ใน 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 1 เดือน ส่งผลให้องค์ประกอบต่างๆ ทางด้านภูมิคุ้มกันสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารเบต้ากลูแคน ได้ระยะเวลานานประมาณ 6-7 สัปดาห์

Itami *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยให้อาหารที่ผสมด้วยสารเบต้ากลูแคนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน และที่ระดับความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วัน ส่งผลให้กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้งมีค่าสูงขึ้นและมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมด้วย

Scholz *et al.* (1999) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่

อาหารสูตรที่ 1 อาหารผสมยีสต์ *S. cerevisiae* 1 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรที่ 2 อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จาก *S. cerevisiae* 1 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรที่ 3 อาหารผสมยีสต์ *Phaffia rhodozyma* 1 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรที่ 4 อาหารผสม experimental yeast (HPPR 1) 1 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรที่ 5 อาหารปกติ (ชุดควบคุม)

โดยให้อาหารเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตในกุ้งที่ได้รับอาหารชนิดต่าง ๆ แต่อัตราการรอดของกุ้งที่เลี้ยงด้วย *S. cerevisiae*, *P. rhodozyma* และ experimental yeast มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยเบต้ากลูแคนอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P=0.006$) และสูงกว่าชุดควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.006$) ส่วนการศึกษาทางด้านน้ำหนักรวม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยยีสต์ (*P. rhodozyma*) มีน้ำหนักดีกว่าชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคนชนิดเดียว และความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดโดยการแช่กุ้งในสารละลายเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ BP05 หลังจากการแช่ 27 ชั่วโมง กุ้งที่ได้รับอาหารผสม *S. cerevisiae*,

P. rhodozyma, experimental yeast และชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ กุ้งที่ไม่ได้แช่เชื้อ ส่วนการศึกษากระบวนการ prophenoloxidase activity ในแต่ละชุดแตกต่างกัน โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *P. rhodozyma* มีค่าต่ำกว่าชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคนชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.003$)

Campa-Córdova *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาผลของเบต้ากลูแคนต่อระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในกุ้งขาวแวนนาไม โดยนำกุ้งในระยะ Juvenile แช่ในสารละลาย เบต้ากลูแคนที่ผสมกับสารละลาย sulfate polysaccharide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง สามารถตรวจวัดระดับการทำงานของ SOD ในเม็ดเลือด และที่ 24 ชั่วโมง สามารถตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase ในกล้ามเนื้อของกุ้งที่แช่ในสารละลายทั้ง 2 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นในระดับ 1.5 และ 1.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้แช่สารละลายเบต้ากลูแคนและเมื่อทำการทดสอบโดยการฉีดสารละลายเบต้ากลูแคนทั้ง 2 ชนิดแก่กุ้ง พบว่าค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงหลังจากฉีด สารละลายแล้ว 24 ชั่วโมง แต่ที่ 48-120 ชั่วโมง ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและโปรตีนในเม็ดเลือดจะ เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการให้เบต้ากลูแคนที่ผสมกับสารละลาย sulfate polysaccharide ตามความเข้มข้นและวิธีดังกล่าวสามารถเพิ่มกระตุ้นให้กุ้งมีการสร้างเอนไซม์ superoxide dismutase ได้สูงขึ้น โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะมีหน้าสำคัญในการเป็น antioxidant และป้องกันการเกิด oxidative stress ซึ่งจะช่วยให้เนื้อเยื่อไม่ถูกทำลายจากพวกอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย

ฉัทชนัน (2549) ได้ศึกษาการใช้สารเบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว แวนนาไม โดยประเมินจากองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และ ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่ากุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนความเข้มข้น 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคน 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม การศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมพบว่ากุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 4 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่าชุดที่ให้ 2 และ 3 สัปดาห์ และระดับภูมิคุ้มกันยังคงมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมประมาณ 4 สัปดาห์ หลังจากหยุดให้ สารเบต้ากลูแคน และเมื่อให้สารเบต้ากลูแคนอีกครั้งในระดับความเข้มข้นเท่าเดิม พบว่ากุ้งมีระดับ ภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ดังนั้นการให้กุ้งได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 เดือน

หยุดให้ 1 เดือน จากนั้นจึงให้อีกครั้งที่ความเข้มข้นและระยะเวลาเท่าเดิม จะมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งให้สูงขึ้นในช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง

ในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำโดยใช้ความรู้ระดับโมเลกุลและเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาศึกษาโดย จารวรรณ (2550) ได้ทำการศึกษาการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหาร 3 ระดับ คือ 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำขนาด 12-14 กรัม จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ anti-microbial peptide, β -glucan binding protein, crustin, heat shock protein 70, lysozyme, peroxinectin, penaeidin, prophenoloxidase, serin proteinase inhibitor และ transglutaminase ด้วยวิธี Conventional RT-PCR พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่มีการแสดงออกมากในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก หัวใจ และลำไส้ส่วนท้าย โดยการเสริมเบต้ากลูแคนไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนและสามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน เพิ่มปริมาณเม็ดเลือด กระตุ้นการหลั่งสารหรือเอนไซม์สำคัญในการทำลายเชื้อโรคบางชนิด รวมถึงกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ดักจับสิ่งแปลกปลอมในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. โรคแบคทีเรียเรืองแสง

โรคเรืองแสงเกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำเค็มและน้ำกร่อย (พรเลิศ และคณะ, 2537) เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีการแพร่ระบาดได้เป็นบริเวณกว้างทั่วทุกมุมโลก (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998) เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม microflora พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อยครั้ง (Sindermann, 1990) เป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ซึ่งแบคทีเรียจะเข้าทำอันตรายเมื่อกุ้งเครียดและอ่อนแอก่อให้เกิดโรคแบบ secondary infection ทำให้กุ้งป่วยและตายในที่สุด โดยเชื้อชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารพวก chitin ในเปลือกของสัตว์พวก crustacean แล้วแพร่กระจายภายในร่างกาย ถ้ากุ้งแข็งแรงจะสามารถกำจัดแบคทีเรียนี้ได้หรือกลายเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) เชื้อ *V. harveyi* สามารถปรับตัวให้ทนต่ออุณหภูมิและความเค็มช่วงกว้างได้ (Baumann *et al.*, 1984; Jiravanichpaisan *et al.*, 1994; Suwanto *et al.*, 1998) โดยช่วงความเค็มและอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่าง 0-40 พีพีที และ 25-35 องศาเซลเซียส (ชลด, 2534; สุภฎา และคณะ, 2543) จึงเป็นเหตุให้ช่วงฤดูร้อนมีปริมาณเชื้อมากกว่าในฤดูฝนหรือฤดูหนาว (Buchanan and Gibbons, 1974)

5.1 ลักษณะของแบคทีเรีย

เชื้อ *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ มีขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้ flagella มี lateral flagella เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (สุกญา และคณะ, 2543) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ luciferase โดยสารตั้งต้นเป็น long chain aldehyde (tetradecanal) สารดังกล่าวได้มาจากการสังเคราะห์ของกรดไขมัน ระหว่างปฏิกิริยาการออกซิโดซ์ของ aldehyde และการรีดิวซ์ของ flavin (FMNH₂) โดยเอนไซม์ luciferase จะทำให้เกิดการเรืองแสงของแบคทีเรียขึ้น สามารถเรืองแสงได้ในที่มืด เชื้อ *V. harveyi* สามารถสร้างสารพิษชนิด endotoxin ที่ร้ายแรงมากอยู่ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์และละลายปนไปกับน้ำเลือด (ชอดยั้ง, 2540) แบคทีเรียในสกุลนี้มีความต้องการโซเดียมไอออน ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเค็ม sea water agar (SWA) และมีสภาพพิเอชเท่ากับ 9 อาหารเฉพาะของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS agar) พบโคโลนีของเชื้อเป็นสีเขียว ความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* ไม่ขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม แต่ขึ้นอยู่กับ plasmid หรือ lysogenic bacteriophage โดยมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกันโดยผ่านทาง mobile element ซึ่งได้แก่ plasmid ในกระบวนการเจริญเติบโต (Pizzutto and Hirst, 1995) โดยส่วนของ bacteriophage ช่วยเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ (Ruangpan et al., 1999) เชื้อ *V. harveyi* ชนิด (isolate) ที่มีการเรืองแสงมีการคัดต่อสารปฏิชีวนะสูงกว่าชนิดที่ไม่เรืองแสง (Abraham et al., 1997)

5.2 พฤติกรรมภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

กุ้งที่ติดเชื้อเริ่มแสดงอาการเชื่องซึม ว่ายน้ำเกยขอบบ่อ เรืองแสงในที่มืด และเริ่มมีการตายมากขึ้นตามระยะเวลาการติดเชื้อ ลักษณะเด่นภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ คือ ตัวหวมกุ้งมีสีเข้ม มีลำตัวสีแดง (จริพร และคณะ, 2546) บางตัวพบลักษณะตัวขาวขุ่น ว่ายน้ำไม่สะดวก เหงือกมีสีแดงหรือน้ำตาล มีจุดสีดำบนเปลือกและยางค์กร่อน กุ้งที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงจะพบอัตราการตายสูง โดยเฉพาะระยะโพสลาร์วา (postlarva) ในโรงเพาะฟักและกุ้งที่มีขนาดเล็กในบ่อเลี้ยง (juvenile) (Lightner, 1988; Graindorge and Flegel, 1999) กุ้งที่ป่วยจะมีลักษณะตัวเรืองแสงมองเห็นชัดในที่มืด กุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบบริเวณขอบบ่อ (ชโล, 2534)

5.3 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

จากศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด กุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่ากุ้งปกติมาก เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้ง เม็ดเลือดกุ้งจะเข้ามาล้อมรอบเพื่อจับและกำจัดออกนอกตัว ส่งผลให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง และเมื่อแบคทีเรียเข้าในกระแสเลือด แบคทีเรียจะใช้เลือดซึ่งมีโปรตีนและสารอาหารต่าง ๆ เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ และในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ต่าง ๆ (ยอดยิ่ง, 2541) ส่วน Luo (1996) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Penaeus chinensis* ที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้นและปริมาณของโปรตีนในซีรัมลดลงเล็กน้อย

กิจการ (2543 ข) รายงานว่าการติดเชื้อแบคทีเรียส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งจะลดลงทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และความว่องไวของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

6.4 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ในช่วงแรกของการติดเชื้อ เกิด การฝ่อ (atrophy) tubular lumen ของ hepatopancreas (จรีพร และคณะ, 2546) และต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ขึ้น เซลล์ในส่วนของ hepatopancreas และต่อมน้ำเหลืองตาย ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ อาหารที่สะสมไว้ใน hepatopancreas ลดลง พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวในท่อ hepatopancreas และถ้าไส้ hepatopancreas ถูกทำลาย พบเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับเซลล์ที่ตายชัดเจน กุ้งที่ติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ hepatopancreas ต่อมน้ำเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ตายเป็นบริเวณกว้างมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับมากขึ้น กุ้งทยอยตาย กุ้งที่ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ของ hepatopancreas และต่อมน้ำเหลืองเกือบทั้งหมดตายเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis กุ้งไม่กินอาหารอ่อนแอและตายในที่สุด สำหรับ systemic vibriosis จะพบการรวมตัวกันของเม็ดเลือดเป็นชุดกระจายอยู่ทั่วไป (generalized hemocytic nodules) ในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อ (Jiravanichpaisan *et al.*, 1994)

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ส่งผลให้กระบวนการต่าง ๆ ในร่างกายเปลี่ยนแปลง เพราะการอักเสบของเหงือก แอ่งเลือด อาจทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจน ความสามารถในการจับออกซิเจนของเม็ดเลือดลดลง มีผลให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอในการเลี้ยงเซลล์ หรือในกระบวนการหายใจของเซลล์ ส่วนการอักเสบและตายของเซลล์ต่าง ๆ ที่เห็นได้ชัด คือ เซลล์ hepatopaneas และต่อมน้ำเหลือง จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของตัวกุ้งลดลง กินอาหารลดลง อ่อนแอ มีการแทรกซ้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย

Lee *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *V. harveyi* พบว่าเชืชนิดนี้สามารถผลิตสารย่อยสลายเม็ดเลือด (hemolysin) ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลง เมื่อกุ้งได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับเชื้อโรค ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง และเมื่อนำกุ้งป่วยมาแยกเชื้อจาก hepatopaneas หรือจากน้ำเลือด จะพบเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก กุ้งป่วยจะมีกล้ามเนื้อบวม เลือดแข็งตัวช้า (วรณัญญ์, 2545) ในกุ้งที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังอวัยวะส่วน hepatopaneas มีขนาดเล็กลง (ชลอ, 2534)

ชัยชาญ (2545) ได้ทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่กล้ามเนื้อกุ้ง พบว่าที่ 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป จำนวนเซลล์เม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีจำนวนไม่แตกต่างจากกุ้งปกติ

Martin *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Sicyonia ingentis* พบว่าปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 24 ชั่วโมง

5.5 การระบาดของโรคเรืองแสง

การระบาดจะพบมากในพื้นที่ที่มีการปล่อยกุ้งอย่างหนาแน่น มีการให้อาหารมาก ทำให้ภายในบ่อมีปัญหาเรื่องปริมาณอินทรีย์สารมาก พื้นบ่อสกปรก มีสาหร่ายบริเวณพื้นบ่อเคลือบตามแนวห่านอาหาร ในบ่อที่ปริมาณแพลงก์ตอนมีการตายบ่อย ๆ เนื่องจากฟิเอซของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันสูง เชื้อสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว กุ้งที่ติดเชื้อจะได้รับความเสียหายมาก (ชลอ, 2534) ในขณะที่ Lavill_Pitogo *et al.* (1990) รายงานว่า กุ้งจะเกิดโรคนี้ได้ทุกช่วงอายุ โดยความเสี่ยงของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับความเครียดที่กุ้งได้รับ

5.6 การป้องกันโรคเรื้อรัง

การระบาดของโรคเรื้อรังนั้นมักเกิดในช่วงที่อากาศร้อนจัด ทำให้น้ำมีความเค็มสูงกว่าปกติ สามารถป้องกันการระบาดของโรคโดยผู้เลี้ยงกุ้งควรหลีกเลี่ยงการเลี้ยงกุ้งในช่วงเวลาที่น้ำมีความเค็มสูงมาก ส่วนการเลี้ยงกุ้งในน้ำที่มีความเค็มต่ำหรือสามารถนำน้ำจืดมาเติมในบ่อให้ความเค็มน้ำในบ่อลดลงจะช่วยลดความรุนแรงของโรคนี้ได้ ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ ควรให้อาหารในปริมาณที่พอเหมาะไม่ให้มีอาหารเหลือ เพื่อเป็นการลดปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในน้ำลง การเปลี่ยนถ่ายน้ำจะช่วยลดปริมาณอาหารที่เหลือรวมทั้งปริมาณสารอินทรีย์ที่สะสมในบ่อได้

การป้องกันการเกิดโรคที่ดีที่สุด คือ การควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อกุ้งและการดูแลรักษาพื้นบ่อให้สะอาด โดยมีเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอและการวางตำแหน่งที่สามารถรวมตะกอนบริเวณ กลางบ่อได้ มีการจัดการโปรแกรมการให้อาหารที่เหมาะสม จะทำให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรง โอกาสที่กุ้งติดเชื้อก็จะน้อย (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

การศึกษานี้ใช้ผลิตภัณฑ์ DV AQUA จากบริษัท Diamond V ประเทศสหรัฐอเมริกา ลักษณะของ DV AQUA เป็นผงละเอียด คล้ายผลึก สีน้ำตาลอ่อน มีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ ยีสต์ (*S. cerevisiae*) ซึ่งผ่านกระบวนการหมัก 2 ครั้ง รวมทั้งส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ (Diamond V, 2008) (ตารางที่ 2)

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยมี 3 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 9 ซ้ำ (replication)

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ชุดของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ชุดของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ DV AQUA

Proximate Analysis:	เปอร์เซ็นต์	Energy:	per lb	per kg
Crude Protein, min.	15.0	TDN	68	
Crude Fat, min.	1.5	NEm	0.72 Mcal	1.59 Mcal
Crude Fiber, max.	22.0	NEg	0.49 Mcal	18 Mcal
Ash, max.	8.0	DE	1.26 Mcal	2.78 Mcal
Moisture, Max.	11	ME	1.36 Mcal	3.00 Mcal
Amino Acids:	เปอร์เซ็นต์	Vitamins	per lb	per kg
Arginine	0.64	Biotin	0.21 mg	0.46 mg
Cystine	0.32	Choline	472 mg	1041 mg
Glycine	0.90	Folic Acid	0.79 mg	1.74 mg
Histidine	0.46	Niacin	37 mg	82 mg
Isoleucine	0.46	Pantothenic Acid	15 mg	33 mg
Leucine	1.09	Pyridoxine	4.81 mg	10.61 mg
Lysine (total)	0.70	Riboflavin	4.94 mg	10.89 mg
Methionine	0.30	Thiamin	3.43 mg	7.57 mg
Phenylalanine	0.76	Vitamin A	177 IU	390 IU
Proline	1.13	Beta Carotene	2961 IU	6530 IU
Threonine	0.61	Vitamin B ₁₂	0.002 mg	0.004 mg
Tyrosine	0.50	Vitamin E	4.0 IU	8.8 IU
Tryptophan	0.20			
Valine	0.78			
Carbohydrates	เปอร์เซ็นต์	Minerals	per lb	per kg
Starch	5.2	Calcium (Ca)	0.47	
Fructose	0.4	Chloride (Cl)	0.36	
Glucose	n.d.	Magnesium (Mg)	0.40	
Lactose	n.d.	Potassium (K)	2.21	
Maltose	1.4	Sodium (Na)	0.18	
Sucrose	n.d.	Sulfur (S)	0.59	
ADF	14.5	Cobalt (Co)	n.d. mg	n.d. mg
NDF	29.1	Copper (Cu)	6 mg	13 mg
		Iron (Fe)	151 mg	334 mg
		Manganese (Mn)	21 mg	46 mg
		Selenium (Se)	0.35 mg	0.77 mg
		Zinc (Zn)	31 mg	69 mg
Other	เปอร์เซ็นต์			
Mono-unsaturated FA	27	Bulk Density:	35-38 lbs/ft ³	
Poly-unsaturated FA	54		568-617 kg/m ³	
Saturated FA	19	Particle size:	300 micron	
Trans FA	n.d.	Packaging :	bags – 25 kg	
Xanthophyll	< 1 mg/lb	Total –	825 kg, 1000 kg & 2000 lb bulk	
Linoleic acid	*	Shelf Life :	24 months from date of manufacture	

หมายเหตุ n.d. คือ not detection (ไม่สามารถวิเคราะห์ได้)

ที่มา: Diamond V, 2008

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 8.97 ± 0.85 กรัม จำนวน 1,500 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 3 ถัง ในน้ำความเค็ม 20 - 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม ให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โดยให้ 4 เวลา ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 19.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ และควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 4 วัน

เมื่อครบ 14 วัน นำกุ้งขาวแวนนาไมมาคัดเลือกกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีสุขภาพแข็งแรง มาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร จำนวน 27 ถัง แบ่งเป็นชุดการทดลองละ 9 ถัง โดย 6 ถังใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการรอดตาย ส่วนอีก 3 ถัง ใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยจะใส่กุ้งจำนวนถึงละ 25 ตัว ความเค็มของน้ำในถัง ประมาณ 20-25 พีพีที ควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater ดูดตะกอน และระบายของเสียและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 4 วัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดของอาหารควบคุม เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ผสม DV AQUA ในอัตราส่วน 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ DV AQUA 1.25 กรัม ผสมลงในอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ผสม DV AQUA ในอัตราส่วน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ DV AQUA 2.50 กรัม ผสมลงในอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม

การเตรียมอาหารทดลองผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยทำการเคลือบบนอาหารสำเร็จรูปปกติ และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก ส่วนชุดการทดลองที่ 1 จะทำการเคลือบอาหารสำเร็จรูปปกติด้วยน้ำมันปลาหมึกในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 จากนั้นจึงให้แห้ง ก่อนจะนำไปให้กุ้งที่ทดลอง 4 เวลา ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 19.00 น. ในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน ปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้งตามวิธีของ ชลอ และพรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 50 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกวัน

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

สุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งและบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ในวันที่ 0, 20, 35 และสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ระหว่างทำการทดลองมีการเก็บน้ำจากถังทดลองมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ และมีการระบายตะกอนของเสียออกอย่างสม่ำเสมอ พร้อมทั้งเติมน้ำที่ผ่านการพักและปรับความเค็มใกล้เคียงกับในถังทดลองเข้าไปทดแทน โดยมีการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ ดังนี้

5.1 พีเอช วัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชรุ่น Ecoscan pH 5

5.2 อุณหภูมิ วัดโดยใช้เครื่อง YSI DO 200-4M

5.3 ความเค็ม วัดโดยใช้เครื่อง YSI 30/10 FT

5.4 ปริมาณแอมโมเนียรวม ใช้วิธี phenol-hypochlorite method, ปริมาณไนโตรที่ปริมาณไนเตรท และความเป็นด่างใช้วิธี titration (APHA *et al.*, 1995)

5.5 ความโปร่งแสงของน้ำ วัดโดยใช้ Secchi disc

6. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลอง ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 3 ตัว โดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25G ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) โดยเก็บตัวอย่างกุ้งเลือดทุก ๆ ที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน โดยระหว่างที่ทำการทดลองมีการให้อาหารผสม DV AQUA นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity) และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (superoxide dismutase activity) ตามวิธีดังนี้

6.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

6.1.1 คูดเลือดจากแองเกล็ด โดยในหลอดชนิดยابرจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

6.1.2 ใช้ micropipette คูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

6.1.3 คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็น จำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยหาค่าได้จาก

$$\begin{aligned}\text{ปริมาตรของ Hemacytometer} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูง} \\ &= 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 0.1 \text{ มิลลิเมตร} \\ &= 0.1 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร}\end{aligned}$$

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้}$$

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \times 10^4 \times \text{ค่า dilution}$$

6.2 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543 จ)

6.2.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (เนื่องจากเชื้อที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สามารถที่จะนำไปละลายในน้ำเกลือได้ง่ายกว่าเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร TCBS จึงนิยมเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA)

6.2.2 เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่เป็น colony เดียวละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินไป สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้น ๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08 - 0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้

6.2.3 เจาะเลือดจากกุ้งจากแองเกล็ด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยคูดเลือดกุ้ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดชนิดยามีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

6.2.4 นำมาแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดกุ้ง โดยหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm. นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสด้านบนมาใช้

6.2.5 นำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในระดับ 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

6.2.6 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2 มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรัม ในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6.2.7 นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละหลอด โดยใช้ น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าของการเจือจาง ซีรัม ที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

6.3 กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง ตามวิธีของ Itami *et al.* (1994) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

6.3.1 เจาะเลือดจากแองเงอเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (เลือดกึ่ง : anticoagulant) 1:2 โดยดูดเลือดกึ่ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดนิตยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

6.3.2 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.3.3 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

6.3.4 ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และ ใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.3.5 นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตร และสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเม็ดเลือดกึ่งใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร

6.3.6 นำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เลี้ยงบน cover glass โดย spread ทิ้งไว้ 20 นาที

6.3.7 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6.3.8 หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.3.9 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

6.3.10 หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

6.3.11 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

6.3.12 ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

6.3.13 ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

6.3.14 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

6.3.15 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

6.3.16 ปิดสไลด์ด้วย permount

นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป คำนวณค่าได้จาก

$$\text{ร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดกระบวนการ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% phagocytosis)

6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกึ่งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543 น)

6.4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

6.4.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm. เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4.3 นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลาย K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4

6.4.4 ทำให้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

6.4.5 นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4.6 แยกส่วนใสด้านบนซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Söderhäll and Hall (1984) มีวิธีการดังต่อไปนี้

1.) นำ HLS ที่เตรียมได้ 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ ใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส)

2.) เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3.) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารป้องกันเลือดแข็งตัวสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับทริปซิน L-dihydroxyphenylalanine และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

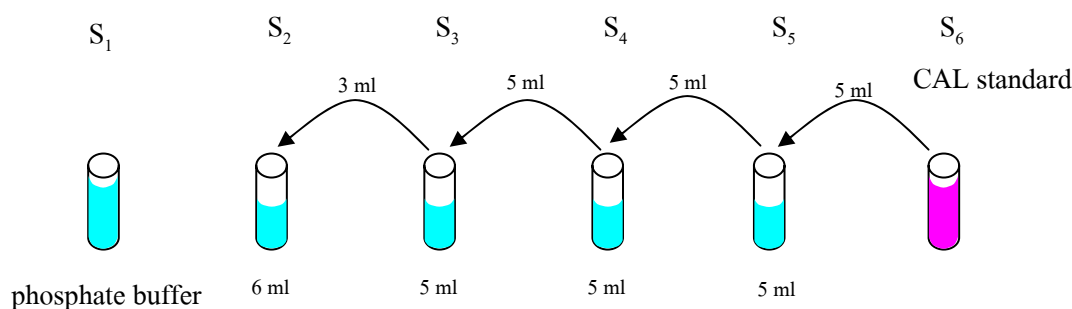
4.) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยคำนวณหาค่าดังนี้

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta \text{ OD}_{490} / \text{นาที/มิลลิกรัม โปรตีน}$$

6.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

ทำการศึกษาโดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD[®] superoxide dismutase โดยเตรียมชุดมาตรฐานใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

6.5.1 เตรียมสารมาตรฐาน S_1 - S_6 จากสารละลาย CAL standard และ สารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซนต์ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD[®] superoxide dismutas

6.5.2 นำสารละลายมาตรฐาน S_1 - S_6 เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A_2 ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

- 1.) เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซนต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร
- 2.) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.) นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซนต์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ
- 4.) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 5.) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง (ทำซ้ำข้อ 3-4) นำสารละลายละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง

6.) ละลายตะกอนเม็ดยาด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

7.) นำสารละลายเม็ดยาที่เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร

8.) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A_2 ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

9.) นำค่า A_1 และ A_2 ที่ได้มาคำนวณหาค่า เปอร์เซ็นต์ inhibition โดยคำนวณหาค่า ดังนี้

$$\Delta A / \text{min of standard or sample } (B_n) = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(B_n * 100)}{B_{S1}}$$

10.) นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของสารมาตรฐาน S_1 - S_6 มาสร้างกราฟ log ฐาน 10 เพื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของตัวอย่างเลือดกุ้งมาหาค่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในหน่วยเอนไซม์ superoxide dismutase units ต่อมิลลิลิตร (SOD units/ml)

7. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

นำกุ้งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยงเป็นเวลา 50 วันมาทำการศึกษา แบ่งออกเป็น 3 ชุด คือ ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งที่ให้อาหารควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งที่ให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 3 กุ้งที่ให้อาหารผสม DV AQUA ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

7.1 ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 3 วัน เลี้ยงกุ้งทดลองชุดการทดลองละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อาหารตลอดเวลา ดูตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

7.2 ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ประมาณ 0.034 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.2×10^6 CFU/มิลลิลิตร

7.3 นีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ในกึ่งชุดการทดลองทุกตัว โดยนิตเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุมซึ่งใส่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ จำนวน 1 ตัว ใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ นิตเข้าทางกล้ามเนื้อในปริมาณและตำแหน่งเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 (เพื่อเปรียบเทียบระหว่างทำการทดลองว่ากุ้งในทุกชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการนิต)ให้อาหารสำเร็จรูปปกติที่ไม่มีการผสม DV AQUA แก่กุ้งในทุกชุดการทดลองหลังจากการนิตเชื้อ

7.4 จัดบันทึกการตายของกุ้งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกุ้งที่แสดงอาการป่วยและไกล่ตาย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งที่แสดงอาการป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

7.5 นำตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและไกล่ตาย ตรวจยืนยันผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ โดยการเก็บตัวอย่างกุ้งมานิมน้ำยา Davidson's fixative เข้าบริเวณ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ แช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative นานประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากนั้น นำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป ตามวิธีของ Bell and Lightner (1984)

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ชุด ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน หลังจากการเลี้ยง ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งจะวิเคราะห์ที่เวลา 0, 20, 35 และ 50 วัน หลังจากการเลี้ยง ส่วนอัตราการรอดตายของกุ้งเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* นั้นจะวิเคราะห์ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากการนิตเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในตัวกุ้ง โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

2. การศึกษาผลของ DV AQUA ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

1. การวางแผนการทดลอง

ทำการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน ตั้งอยู่ที่อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี มีพื้นที่ประมาณ 200 ไร่ จำนวนบ่อเลี้ยง ทั้งหมด 20 บ่อ เป็นบ่อขนาด 6 ไร่ โดยใช้บ่อสำหรับการทดลองครั้งนี้จำนวน 8 บ่อ แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม (อาหารกุ้งขาวแวนนาไมปกติ) 4 บ่อ และบ่อทดลอง (อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์) อีก 4 บ่อ มีการป้องกันพาหะของโรคเข้าไปในบ่อ โดยพลาสติกล้อมในแต่ละบ่อและจึงเชือกป้องกันนกทุกบ่อ ความเค็มของน้ำอยู่ที่ระหว่าง 13-16 พีพีที

2. การเตรียมอาหารกุ้งผสมผลิตภัณฑ์ DV AQUA

ทำการผสมผลิตภัณฑ์ DV AQUA ลงในอาหารเม็ดสำเร็จรูปอัตราส่วน 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเท่ากับ DV AQUA 2,500 กรัม ผสมลงในอาหารกุ้ง 1,000 กิโลกรัม โดยผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปจากโรงงานของบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ และเริ่มให้อาหารผสม DV AQUA หลังจากกุ้งอายุครบ 30 วัน จนกระทั่งจับ

3. การเตรียมบ่อและการเตรียมน้ำ

หลังจากการเลี้ยงในรอบที่ผ่านมาจะมีการตากบ่อนาน 2 สัปดาห์ ใช้วัสดุปูนตามความเหมาะสม เพื่อปรับสภาพพีเอชของดิน ก่อนจะสูบน้ำจากบ่อพักน้ำเข้าสู่บ่อเลี้ยง ฆ่าสัตว์จำพวกกุ้งและปู ซึ่งอาจจะเป็นพาหะของเชื้อไวรัสด้วยไตรโคฟอนท์ในอัตรา 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้น 1 วัน จึงใส่กากขี้ ในอัตรา 20-25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าปลา เปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลา ในระหว่างการเตรียมน้ำ พักน้ำไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำให้มีความเหมาะสม ก่อนปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยง

4. การปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในบ่อ

นำลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาว่า 10 (พี 10) จากฟาร์มเอกชนที่ผ่านการตรวจโรค ไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV) ไวรัสหัวเหลือง (Yellow Head Virus; YHV) ไวรัสทอรา (Taura Syndrome Virus; TSV) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ว่าปลอดโรคก่อนปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อในอัตราความหนาแน่น 160,000 ตัวต่อไร่

5. การเลี้ยงและการให้อาหาร

ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปตลอดระยะเวลาการเลี้ยง โดยให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ในเวลา 6.00 น. 10.00 น. 15.00 น. และ 21.00 น. ตามลำดับ ซึ่งขนาดของเม็ดอาหารที่ให้จะให้ตามเบอร์ของอาหารที่สัมพันธ์กับอายุและขนาดของกุ้ง โดยเริ่มให้อาหารครั้งแรกในปริมาณ 2 กิโลกรัมต่อลูกกุ้ง 100,000 ตัว แล้วเพิ่มอาหารวันละ 100 – 200 กรัมต่อลูกกุ้ง 100,000 ตัวต่อวัน จนเมื่อกุ้งอายุ 30 วัน จะมีการปรับปริมาณอาหารที่ให้โดยการตรวจเช็คขอย ตามโปรแกรมการให้อาหารของชลอ และพรเลิส (2547)

6. การศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและอัตราการแลกเนื้อ

สุ่มตัวอย่างกุ้งโดยใช้แหทุก 14 วัน เริ่มสุ่มครั้งแรกหลังจากปล่อยกุ้งลงเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตเป็นความยาว โดยวัดความยาวทั้งหมดของกุ้ง (total length) และทำการวัดการเจริญเติบโตเป็นน้ำหนัก โดยสุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งแต่ละตัวและหาค่าเฉลี่ยรวมของแต่ละตัว การคำนวณสามารถทำได้ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเป็นน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยปัจจุบัน} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยครั้งก่อน}}{\text{ระยะเวลา (กรัมต่อวัน)}}$$

หลังจากจับกุ้ง บันทึกผลผลิตที่ได้ทั้งหมด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณผลผลิต (กิโลกรัมต่อไร่) อัตรารอดตายหลังจากจับ (เปอร์เซ็นต์) และอัตราการแลกเนื้อ ดังนี้

$$\text{ปริมาณผลผลิต (กิโลกรัมต่อไร่)} = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งที่จับได้ทั้งหมด (กิโลกรัม)}}{\text{พื้นที่บ่อทั้งหมด (ไร่)}}$$

$$\text{อัตราการรอดตายหลังจับ} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่จับได้ (ตัวต่อบ่อ)} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งที่ปล่อยทั้งหมด (ตัวต่อบ่อ)}}$$

$$\text{อัตราแลกเนื้อ} = \frac{\text{อาหารทั้งหมดที่ใช้ไป (กิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งทั้งหมดที่จับได้ในบ่อ (กิโลกรัมต่อบ่อ)}}$$

ค่าที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางด้านสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-Test เปรียบเทียบระหว่างกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม

7. การศึกษาคุณภาพน้ำบางประการ

ในระหว่างการทดลองเก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละบ่อทุก ๆ 14 วัน เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอช ความเป็นด่าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ โดยการวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และค่าพีเอช จะวิเคราะห์ระหว่างการเก็บตัวอย่าง ส่วนค่าความเป็นด่าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ จะเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการขนส่งมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะวิเคราะห์ 3 ซ้ำ โดยมีการวิเคราะห์ตามขั้นตอนและวิธีการ ซึ่งได้ระบุไว้ใน การทดลองที่ 1

8. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 90 วัน ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง โดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือดปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ตามขั้นตอนและวิธีการ ซึ่งได้ระบุไว้ในบททดลองที่ 1

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน ณ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี

2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤษภาคม 2551 – พฤศจิกายน 2551

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในการพิจารณานำสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มาใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต เสริมสร้างความแข็งแรงและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกุ้งในฟาร์มเลี้ยงกุ้งของไทยอีกวิธีหนึ่ง

แหล่งทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท Diamond V จำกัด

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการเลี้ยง แสดงไว้ในตารางที่ 3 และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมแสดงไว้ในตารางที่ 4

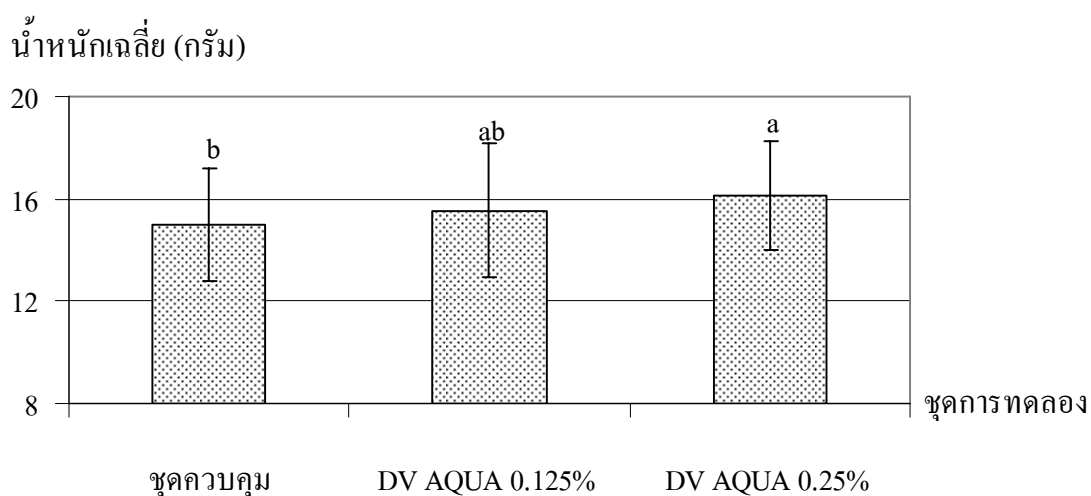
ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
	ชุดควบคุม	DV AQUA 0.125%	DV AQUA 0.25%
0	8.97 ± 0.85^a	9.00 ± 0.83^a	8.93 ± 0.83^a
20	10.87 ± 1.36^a	11.47 ± 1.14^a	11.53 ± 1.01^a
35	12.14 ± 1.38^b	13.00 ± 1.34^{ab}	13.47 ± 1.28^a
50	14.98 ± 2.20^b	15.56 ± 2.64^{ab}	16.11 ± 2.14^a

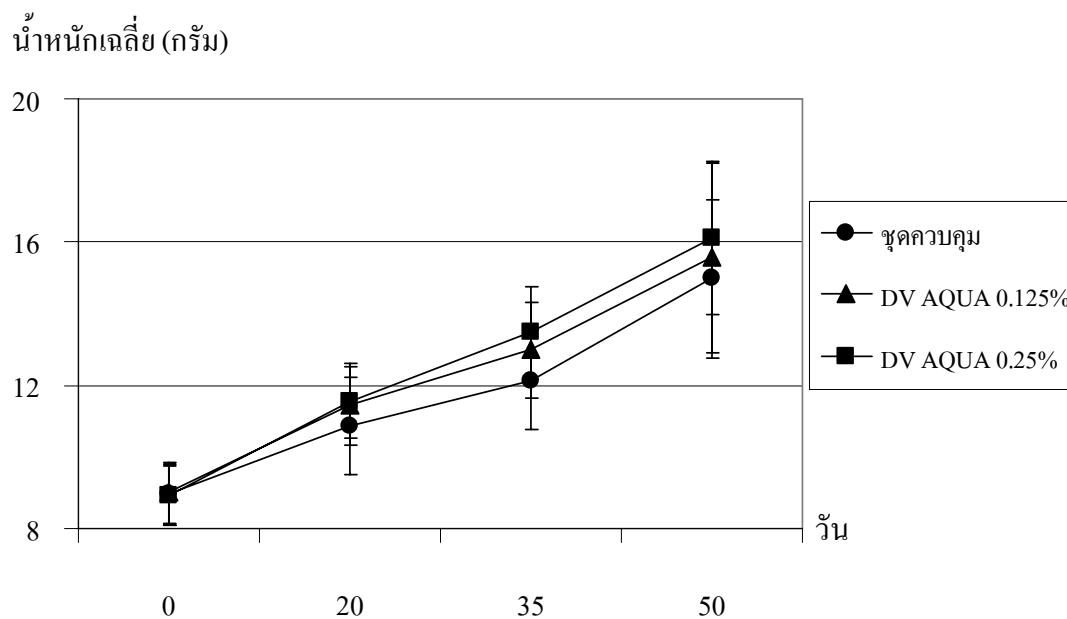
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยให้อาหารผสม DV AQUA ในการเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 35 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 13.47 ± 1.28 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 12.14 ± 1.38 กรัม แต่ไม่แตกต่างทาง

สถิติกับชุดการทดลองที่ได้รับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้น้ำหนักเฉลี่ย 13.00 ± 1.34 กรัม และหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 16.11 ± 2.14 กรัม สูงกว่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.56 ± 2.64 กรัม และแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งชุดควบคุมที่มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยเพียง 14.98 ± 2.20 กรัม (ภาพที่ 5 และ 6)



ภาพที่ 5 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน



ภาพที่ 6 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะ 0, 20, 35 และ 50 วัน



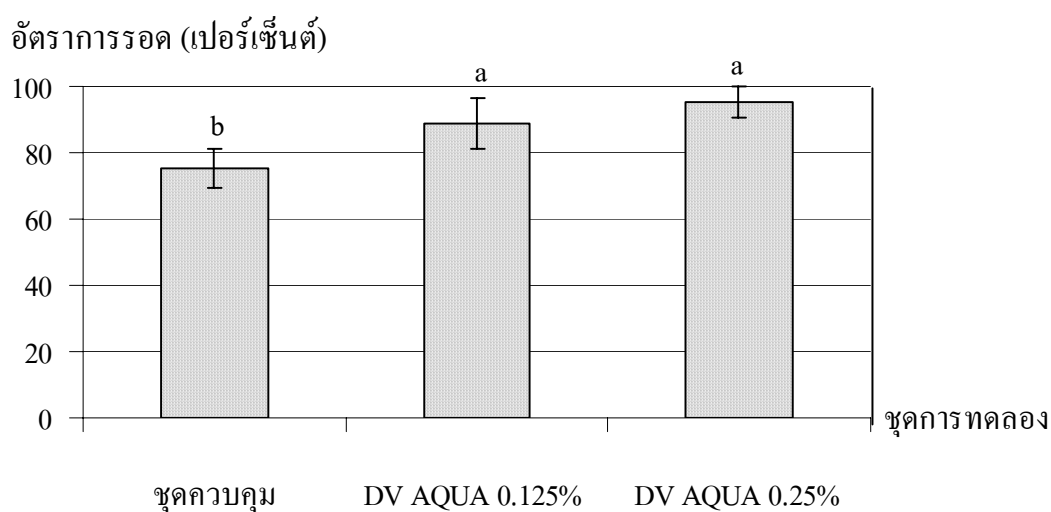
ภาพที่ 7 กุ้งที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (A) และ DV AQUA 0.125 เปอร์เซ็นต์ (B) เทียบกับชุดควบคุม (C)

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 99.33 ± 1.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 98.67 ± 2.07 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 92.67 ± 3.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 95.33 ± 4.68 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 88.67 ± 7.76 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามอัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งทั้งสองชุดการทดลองนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเพียง 75.33 ± 5.89 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 8-9) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Burgents *et al.* (2004) พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ให้อาหารผสมด้วย XP yeast culture® และอาหารที่ผสมยีสต์ *S. cerevisiae*, ยีสต์ *P. rhodozyma*, experimental yeast ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับในการทดลองที่มีรายงานส่วนใหญ่ พบว่าการใช้สารเบต้ากลูแคนในการผสมอาหารมีผลเพียงเพิ่มอัตราการรอดตายแก่กุ้ง แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (Supamattaya *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 1999; Burgents *et al.*, 2004) แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ DV AQUA ที่ใช้ในการศึกษามีกรดอะมิโน ได้แก่ arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine และ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นที่กุ้งต้องได้รับจากอาหาร (ชนิกา, 2546; Davis, 2000; Flicker, 2002) คาร์โบไฮเดรต รวมทั้งแร่ธาตุ เช่น calcium, magnesium, potassium และ chloride (เวียง, 2543) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่กุ้งต้องการในปริมาณมากและจำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ช่วยในการเจริญเติบโต ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอและให้พลังงานในการดำรงชีวิตของกุ้ง ดังนั้นกุ้งที่ได้รับสาร DV AQUA จะนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต ส่งผลให้กุ้งมีน้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้น กุ้งแข็งแรงขึ้น สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เมื่อกุ้งลอกคราบ พบว่าเปลือกสามารถแข็งตัวได้ในเวลาอันสั้น และสามารถหลบหลีกการถูกกินจากกุ้งตัวอื่นที่เลี้ยงอยู่ร่วมกันได้ จึงทำให้มีอัตราการรอดตายที่สูง และมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าชุดควบคุม

ตารางที่ 4 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 50 วัน

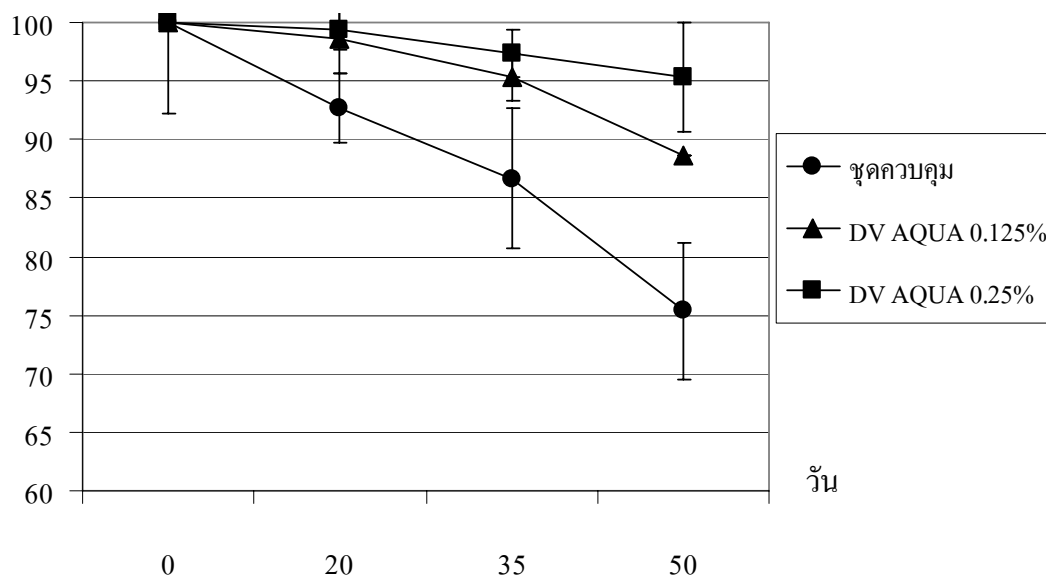
เวลาเลี้ยง (วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)		
	ชุดควบคุม	DV AQUA 0.125%	DV AQUA 0.25%
0	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
20	92.67 ± 3.00 ^b	98.67 ± 2.07 ^a	99.33 ± 1.63 ^a
35	86.67 ± 6.02 ^b	95.33 ± 3.01 ^a	97.33 ± 2.07 ^a
50	75.33 ± 5.89 ^b	88.67 ± 7.76 ^a	95.33 ± 4.68 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 8 เปอร์เซนต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน

อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 9 เปอร์เซนต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ระยะ 0, 20, 35 และ 50 วัน

1.2 การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ในระหว่างการทดลองมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 28 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater รักษาระดับพีเอชของน้ำที่ 7.8 – 8.0 และความเค็มของน้ำประมาณ 25 พีพีที

1.) การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

หลังจากให้อาหารผสม DV AQUA เป็นระยะเวลา 40 วัน พบว่ากุ้งที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ $48.42 \pm 2.81 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สูงกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA

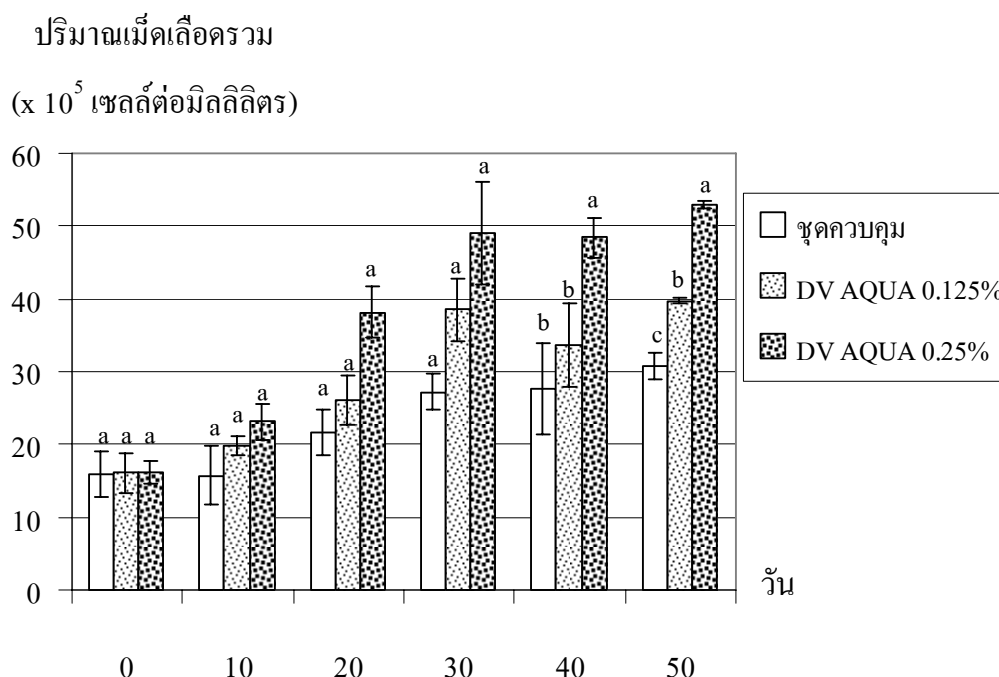
ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย เท่ากับ $33.63 \pm 5.74 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ $27.54 \pm 6.24 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ $57.92 \pm 6.07 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ $54.71 \pm 4.07 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง ที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ $35.79 \pm 10.25 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5 และภาพที่ 10) ทั้งนี้เนื่องจาก DV AQUA มีองค์ประกอบหลัก คือ เบต้ากลูแคนที่ได้จากการหมักยีสต์ชนิด *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ (กิจการ และคณะ, 2543 ก; นัทชนัน, 2549; วชิรยา, 2549; Sung *et al.*, 1996; Burgents *et al.*, 2004) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของนัทชนัน (2549) พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้น 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนเป็นเวลาเพียงแค่ 2 และ 3 สัปดาห์ และหลังจากหยุดให้เบต้ากลูแคน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมยังคงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์ เนื่องจากเบต้ากลูแคนเป็นสารโพลีแซคคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส (Dijkgraaf *et al.*, 2002) สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด โดยเบต้ากลูแคนทำหน้าที่เป็น pathogen associated molecular pattern (PAMPs) (Sritunyalucksana *et al.*, 2000) ไปกระตุ้นสารโปรตีนในตัวกุ้งที่ชื่อว่า β -glucan binding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดและทางเดินอาหาร ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า β -1,3-glucan-binding protein complex (Sritunyalucksana *et al.*, 2002) กระตุ้นที่ membrane receptor ที่จำเพาะของเม็ดเลือด (Vargas-Albores *et al.*, 1998) ส่งผลให้มีการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันทั้งที่อาศัยเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Supamattaya *et al.* (2000) ซึ่งพบว่ากุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมมีค่าสูงที่สุด โดยปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรณวไล, 2551) เมื่อเซลล์เม็ดเลือดมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ ได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมให้เพิ่มสูงขึ้น (Vargas-Albores *et al.*, 1998) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันใน

น้ำเลือด ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ phenoloxidase (ทวิศักดิ์, 2547) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (สมบัติ, 2542) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ทำให้กุ้งสามารถต่อต้านกับเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

THC ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิเมตร)	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV AQUA	
		0.125%	0.25%
0 วัน	15.87 ± 3.18^a	16.11 ± 2.73^a	16.23 ± 1.55^a
10 วัน	15.75 ± 3.95^a	19.75 ± 1.32^a	23.13 ± 2.41^a
20 วัน	21.73 ± 3.15^a	26.13 ± 3.38^a	38.21 ± 3.49^a
30 วัน	27.25 ± 2.55^a	38.50 ± 4.21^a	49.00 ± 7.04^a
40 วัน	27.54 ± 6.24^b	33.63 ± 5.74^b	48.42 ± 2.81^a
50 วัน	35.79 ± 10.25^c	54.71 ± 4.07^b	57.92 ± 6.07^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 10 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกึ่งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

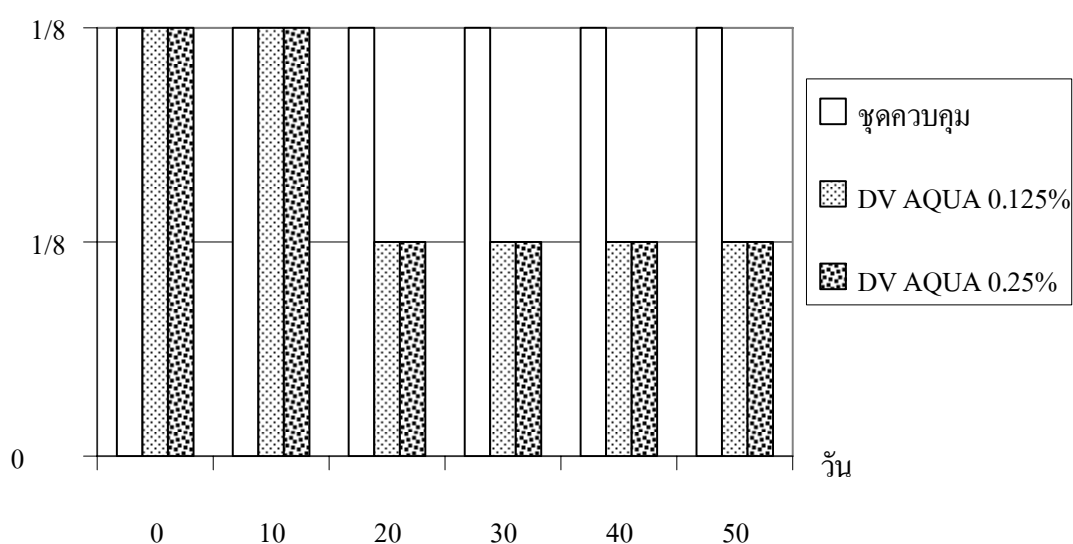
2.) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่ง

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งของกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่ามีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 1 : 8 ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม แต่เมื่อเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 20 วัน กึ่งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 1 : 16 แตกต่างกับชุดควบคุมซึ่งมีอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ คือ 1 : 8 โดยค่าอัตราส่วนการเจือจางดังกล่าวจะไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงกึ่งเป็นเวลา 50 วัน (ตารางที่ 8 และภาพที่ 11) แสดงว่ากึ่งที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น มีกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งสูงกว่ากึ่งชุดควบคุม โดยกึ่งที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA มีความพร้อมที่จะตอบสนองต่อเชื้อโรคได้ดีกว่าชุดควบคุม

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังได้รับอาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

กิจกรรมการทำลาย แบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV AQUA	
		0.125%	0.25%
0 วัน	1 : 8	1 : 8	1 : 8
10 วัน	1 : 8	1 : 8	1 : 8
20 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
30 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
40 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
50 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16

ความเข้มข้นของซีรัม



ภาพที่ 11 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

3.) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง

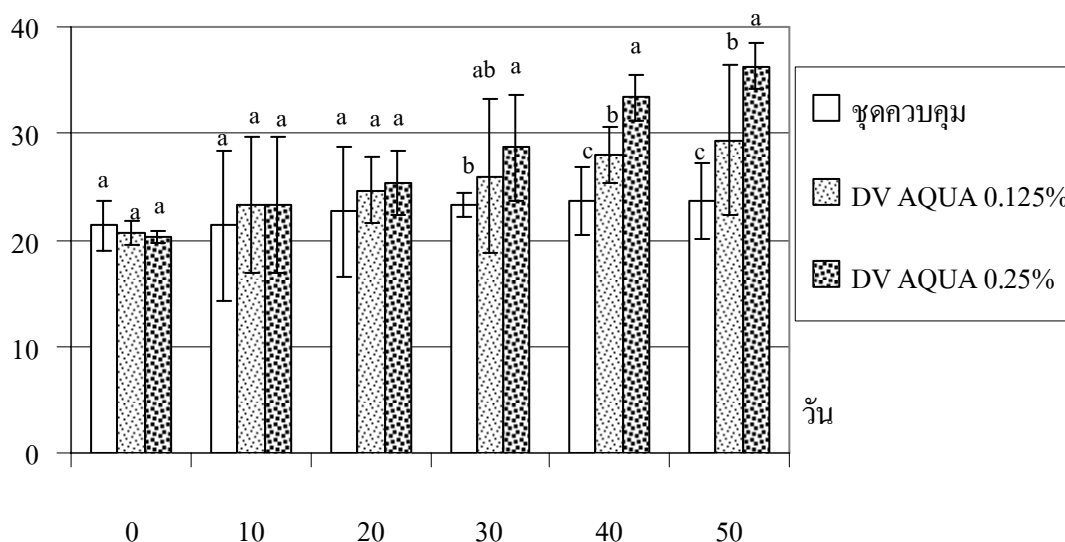
การตรวจสอบกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งเวลา 20 วัน หลังจากการเลี้ยงพบว่าเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ต่อกัน แต่หลังจากเลี้ยงกุ้งจนถึงระยะเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งสูงสุด เท่ากับ 28.67 ± 5.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่า เท่ากับ 26.00 ± 7.21 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งมีค่า เท่ากับ 23.33 ± 1.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากให้อาหารผสม DV AQUA เป็นระยะเวลา 40 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งสูงสุด โดยมีค่า เท่ากับ 36.33 ± 2.08 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง เท่ากับ 29.33 ± 7.02 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุม ซึ่งให้อาหารปกติพบเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งต่ำที่สุด เท่ากับ 23.67 ± 3.51 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA (ตารางที่ 9 และภาพที่ 12) จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chang *et al.* (2000) พบว่าการใช้เบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์ *S. commune* ผสมอาหารอัตราส่วน 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและเซลล์เม็ดเลือดมีการเคลื่อนที่เข้ามาสูงกว่าชุดควบคุมและสอดคล้องกับการศึกษาของพรเลิศ และคณะ (2541) พบว่าเบต้า-1, 3-กลูแคนสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำมีการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้นกว่าชุดควบคุมถึง 5-7 เท่า (นันทริกา, 2538) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Itami *et al.* (1994) พบว่ากุ้ง *P. japonicus* ที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.005 เปอร์เซ็นต์ มีค่าร้อยละของกิจกรรมการกำจัดสิ่งแปลกปลอมสูงขึ้น และสามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่ากุ้งชุดควบคุม

ตารางที่ 9 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้ง ที่เกิดการกลืนกิน สิ่งแปลกปลอม	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV AQUA	
		0.125%	0.25%
0 วัน	21.33 ± 2.31 ^a	20.67 ± 1.15 ^a	20.33 ± 0.58 ^a
10 วัน	21.33 ± 7.02 ^a	23.33 ± 6.43 ^a	23.33 ± 6.43 ^a
20 วัน	22.67 ± 6.11 ^a	24.67 ± 3.06 ^a	25.33 ± 3.06 ^a
30 วัน	23.33 ± 1.15 ^b	26.00 ± 7.21 ^{ab}	28.67 ± 5.03 ^a
40 วัน	23.67 ± 3.21 ^c	28.00 ± 2.65 ^b	33.33 ± 2.08 ^a
50 วัน	23.67 ± 3.51 ^c	29.33 ± 7.02 ^b	36.33 ± 2.08 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม
(เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 12 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

4.) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

จากการศึกษาพบว่าหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 20 วัน กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 386.92 ± 15.35 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน สูงกว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 334.26 ± 27.75 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน และค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งชุดควบคุม เท่ากับ 289.33 ± 27.75 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน

เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 30 และ 40 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุด เท่ากับ 389.14 ± 24.48 และ 381.75 ± 15.87 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 30 และ 40 วัน มีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 333.47 ± 35.39 และ 351.75 ± 32.07 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน แต่กุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากกุ้งชุดควบคุมที่ระยะเวลา 30 และ 40 วัน ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 285.85 ± 24.98 และ 293.17 ± 29.92 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ และหลังจากให้อาหารผสมกับ DV AQUA เป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงกว่าในชุดการทดลองอื่น ๆ คือ มีค่าเท่ากับ 384.20 ± 14.40 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 358.06 ± 29.90 และ 304.50 ± 18.86 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 13) โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของนักชวน (2549) พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ส่งผลให้มีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ได้รับเบต้ากลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและชุดควบคุมและสอดคล้องกับการศึกษาของพรเลิศ และคณะ (2541) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-1,3-กลูแคนผสมในอาหารอัตราส่วน

10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase ให้สูงขึ้น และแตกต่างจากชุดควบคุม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Suphantharika *et al.* (2003) ซึ่งพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้ากลูแคนจาก Spent brewer's yeast สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดกระบวนการ phenoloxidase activity ในหลอดทดลองได้สูงกว่าชุดควบคุม โดยการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการเกิดกระบวนการ phenoloxidase activity ได้

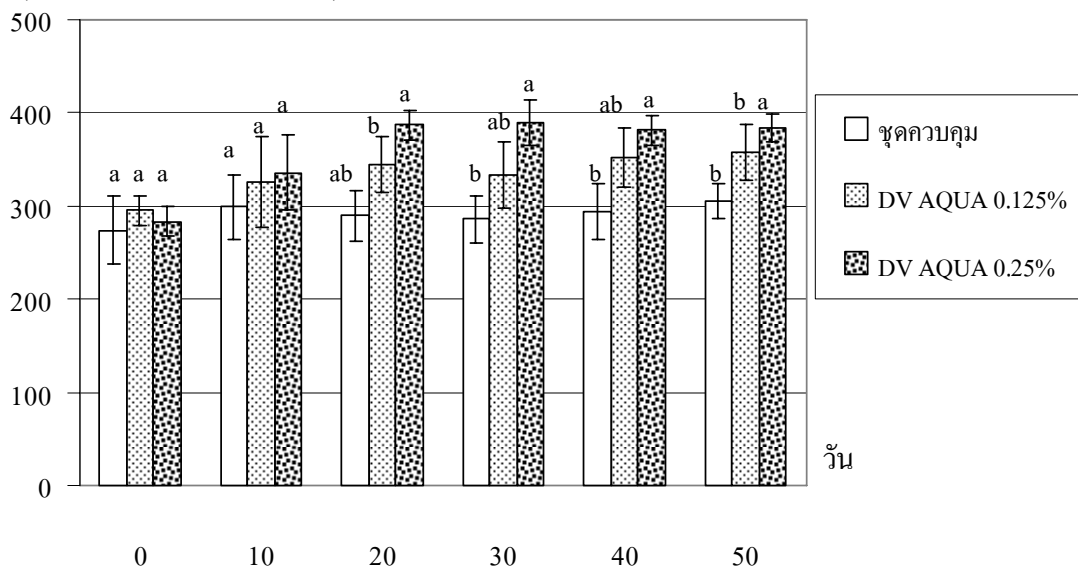
ตารางที่ 10 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

Phenoloxidase activity หน่วย/นาทีกิลลิกรัมโปรตีน	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV AQUA	
		0.125%	0.25%
0 วัน	274.20 ± 36.12 ^a	295.13 ± 16.61 ^a	283.62 ± 15.80 ^a
10 วัน	299.08 ± 34.50 ^a	325.73 ± 48.87 ^a	335.60 ± 40.47 ^a
20 วัน	289.33 ± 27.75 ^{ab}	344.26 ± 27.75 ^b	386.92 ± 15.35 ^a
30 วัน	285.85 ± 24.98 ^b	333.47 ± 35.39 ^{ab}	389.14 ± 24.48 ^a
40 วัน	293.17 ± 29.92 ^b	351.75 ± 32.07 ^{ab}	381.75 ± 15.87 ^a
50 วัน	304.50 ± 18.86 ^b	358.06 ± 29.90 ^b	384.20 ± 14.40 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

(หน่วย/นาที่/มิลลิกรัม โปรตีน)



ภาพที่ 13 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที่/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

5.) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 35.80 ± 1.12 หน่วย SOD/ มิลลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 33.88 ± 4.71 หน่วย SOD/ มิลลิตร และ 27.62 ± 1.42 หน่วย SOD/ มิลลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงกุ้งได้ที่ระยะเวลา 40 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เริ่มมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงขึ้นและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม โดยค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 42.27 ± 1.97 หน่วย SOD/ มิลลิตร ในขณะที่กุ้ง

ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 37.93 ± 4.65 และ 31.28 ± 10.52 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 14) การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase มีความสัมพันธ์กับกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดแดง โดยเอนไซม์ superoxide dismutase จะถูกสร้างขึ้นในขั้นตอนการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์เมื่อมีการยื่นไซโทพลาซึมเข้าล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) โดยผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Campa-Córdova *et al.* (2002) ซึ่งพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมมีการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ในเซลล์เม็ดเลือดหลังจากแช่กุ้งในสารละลายเบต้ากลูแคน

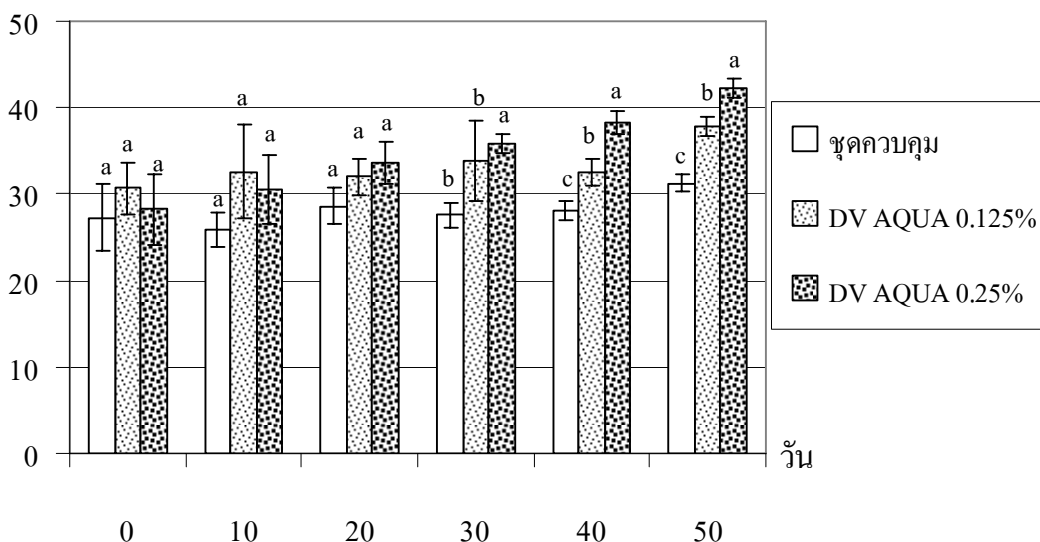
ตารางที่ 11 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase หน่วย SOD/ มิลลิลิตร	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV AQUA	
		0.125%	0.25%
0 วัน	27.30 ± 3.80^a	30.65 ± 2.99^a	28.24 ± 4.07^a
10 วัน	25.90 ± 2.08^a	32.60 ± 5.37^a	30.58 ± 3.95^a
20 วัน	28.59 ± 2.11^a	32.02 ± 2.05^a	33.65 ± 2.39^a
30 วัน	27.62 ± 1.42^b	33.88 ± 4.71^b	35.80 ± 1.12^a
40 วัน	28.12 ± 1.12^c	32.49 ± 1.55^b	38.29 ± 1.32^a
50 วัน	31.28 ± 10.52^c	37.93 ± 4.65^b	42.27 ± 1.97^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase

(หน่วย SOD/ มิลลิลิตร)



ภาพที่ 14 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกันในกลุ่มกุ้งขาวแวนนาไมจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ DV AQUA ที่ได้รับจากการผสมอาหารและระยะเวลาที่กุ้งได้รับอาหารผสม DV AQUA โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 วัน มีกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง และปริมาณการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ถ้าเลือกใช้ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งได้แก่ 0.125 เปอร์เซ็นต์ จะต้องใช้ระยะเวลายาวนานกว่าอย่างน้อยประมาณ 40 วัน จึงส่งผลให้กุ้งมีกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด และปริมาณการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมได้ โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ นัทชนัน (2549) โดยให้เบต้ากลูแคน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่ระยะเวลาแตกต่างกันแก่กุ้งขาวแวนนาไม พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 4 สัปดาห์ (28 วัน) มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนเพียงแค่ 2 และ 3 สัปดาห์และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยัง

สอดคล้องกับการศึกษาของ Supamattaya *et al.* (2000) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับสารเบต้ากลูแคน อัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวม การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดสูงขึ้นหลังจากได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทดลองเป็น 11 สัปดาห์ พบว่ากุ้งที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนทุกชุดการทดลองจะมีค่ากิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม และสอดคล้องกับการศึกษาของ Itami *et al.* (1994) พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.005 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 และ 10 วัน ตามลำดับ ส่งผลให้กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดมีค่าสูงขึ้นและสามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่ากุ้งชุดควบคุม

6.) การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

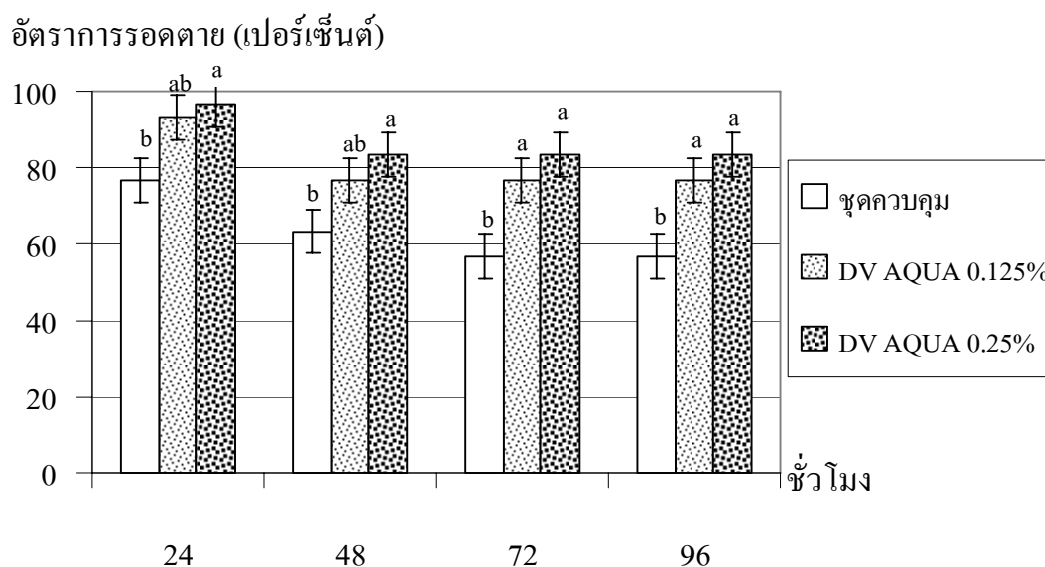
หลังจากให้อาหารผสมกับ DV AQUA แก่กุ้งขาวแวนนาไม ทั้ง 3 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 50 วันแล้วทำให้กุ้งทั้งหมดติดเชื้อ โดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.2×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้านหลังตัวกุ้ง ฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละชุดการทดลอง (ภาพที่ 16) บันทึกอัตราการรอดตายเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.125 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกัน แต่กุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่ช่วง 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 96 ชั่วโมง กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงสุด เท่ากับ 83.33 ± 5.77 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม มีอัตราการรอดตาย เท่ากับ 76.67 ± 5.77 และ 56.67 ± 5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12 และภาพที่ 15) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของจาวรธรรม และคณะ (2550) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนอัตรา 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งกินเป็นเวลา 14 วัน ทำให้กุ้งสามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้สูงกว่ากุ้งชุดทดลอง และชุดที่ได้รับเบต้ากลูแคนในอัตรา 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ จัทรนัน (2549) ซึ่งพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเบต้ากลูแคนผสมในอาหารในอัตรา 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สามารถต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และกุ้งมีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อ

ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในปริมาณที่สูงขึ้น โดยกุ้งจะตายในช่วง 1-3 วันแรกหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 12 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 8.2×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

ร้อยละของอัตรา การรอดตาย	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV Aqua	
		0.125%	0.25%
24 ชั่วโมง	76.67 ± 5.77^b	93.33 ± 5.77^{ab}	96.67 ± 5.77^a
48 ชั่วโมง	63.33 ± 5.77^b	76.67 ± 5.77^{ab}	83.33 ± 5.77^a
72 ชั่วโมง	56.67 ± 5.77^b	76.67 ± 5.77^a	83.33 ± 5.77^a
96 ชั่วโมง	56.67 ± 5.77^b	76.67 ± 5.77^a	83.33 ± 5.77^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 15 เปอร์เซนต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร DV AQUA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

การศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จะพบกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกุ้งป่วยมีสีเข้มขึ้นกว่าปกติ และไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ ไม่ว่ายน้ำ พบแผลสีดำบนเปลือกกุ้งที่ป่วย เช่นเดียวกับรายงานของ ชลอ (2534) ซึ่งรายงานลักษณะของกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงว่ามีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยกุ้งดังกล่าวจะมีลักษณะทางพยาธิสภาพ โดย hepatopancreas และลำไส้ถูกทำลายอย่างรุนแรงพบเซลล์ตายและมีการอักเสบ มีการตอบสนองโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ อาหารที่สะสมไว้ใน hepatopancreas ลดน้อยลง และตายในที่สุด ส่วนกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA จะแสดงการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน โดยสังเกตเห็นการเกิด melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อบริเวณที่ทำการฉีดเชื้อลงไป (ภาพที่ 17) และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อที่เกิด melanin สีดำแทรกอยู่มาศึกษาทางด้านพยาธิสภาพ พบการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดล้อมรอบเซลล์เนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (ภาพที่ 18)

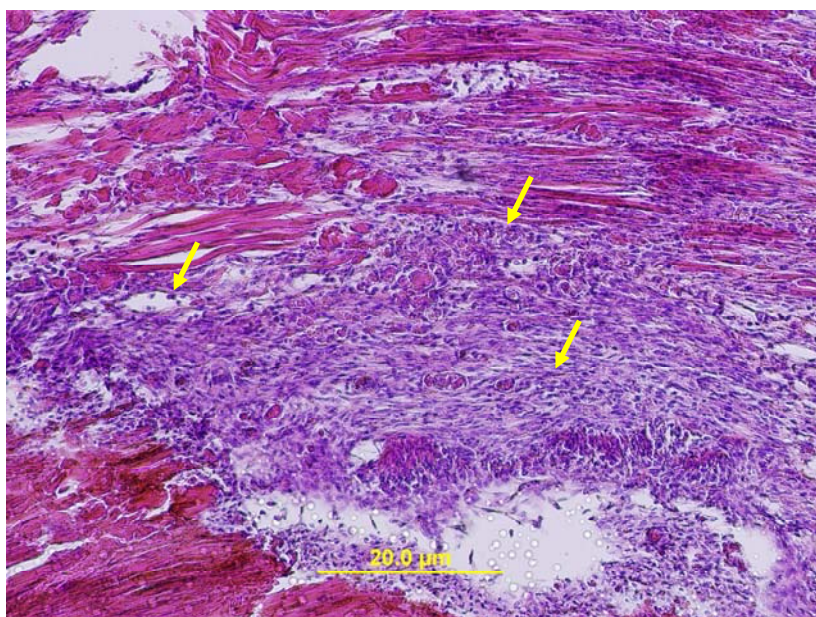
สอดคล้องกับการศึกษาของ Söderhäll and Smith (1986) ได้รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่ร่างกาย จะพบกุ้งมีการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันอย่างรวดเร็ว โดยการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดทั้งภูมิคุ้มกันแบบที่อาศัยเซลล์ ได้แก่ การเกิดกระบวนการ nodule formation เซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมรอบเชื้อเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และมีการกำจัดเชื้อโดยใช้กระบวนการกลืนกินเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ และไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดกระบวนการ degranulation และมีการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ซึ่งสังเกตได้จากการเกิด melanin เช่นเดียวกับที่พบในกุ้งทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ในครั้งนี้ด้วย (ภาพที่ 17) โดย melanin ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากกระบวนการ prophenoloxidase activating system เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและทำให้เชื้อหมดความสามารถในการก่อโรค (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Fontaine and Lightner (1975) พบว่าเมื่อกุ้งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม ปฏิกิริยาแรกที่กุ้งมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม คือ เซลล์เม็ดเลือดจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บและเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมขึ้น หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา nodule formation และ encapsulation สังเกตได้จากจะพบเซลล์เม็ดเลือดมาล้อมรอบบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บ และจะมี cellular infiltration และ encapsulation เกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้น และมี collagen like fibers เกิดเป็นแผลถาวรขึ้น



ภาพที่ 16 การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว



ภาพที่ 17 ลักษณะของเม็ดสี melanin ที่ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริเวณที่ถูกระงับที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว



ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อบริเวณด้านหลังลำตัว บริเวณที่ถูกศรชี้ คือ เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อ
แบคทีเรีย (H&E, bar = 20 μm)

ผลการศึกษการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 50 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 13 โดยทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม การนำไฟฟ้า ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ พบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกชุดการทดลองอยู่ในระดับที่เหมาะสมตามรายงานของชลอ และพรเลิศ (2547)

ตารางที่ 13 แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ของกุ้งขาวแวนนาไม
ที่ได้รับ DV AQUA ในระดับต่างกัน

คุณสมบัติของน้ำ	ชุดการทดลอง					
	ชุดควบคุม		DV AQUA 0.125%		DV AQUA 0.25%	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิน้ำ						
(องศาเซลเซียส) เข้า	28.4-30.3	29.4±0.7 ^a	28.6-29.3	28.9±0.2 ^a	28.9-30.9	29.6±0.7 ^a
บ่าย	30.4-33.3	31.8±1.1 ^a	27.2-31.3	29.5±1.4 ^a	29.1-31.5	30.4±0.8 ^a
พีเอช						
เข้า	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a
บ่าย	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a
ออกซิเจนละลายน้ำ						
(มิลลิกรัมต่อลิตร) เข้า	7.2-8.8	7.9±0.5 ^a	7.0-8.9	7.7±1.3 ^a	6.9-8.9	7.9±0.5 ^a
บ่าย	7.1-8.9	8.0±0.6 ^a	7.1-8.8	8.2±0.4 ^a	7.1-8.9	8.1±0.5 ^a
ความเค็ม (พีพีที)	25.1-26.9	25.9±0.5 ^a	25.0-26.2	25.3±0.5 ^a	25.1-26.0	25.7±0.3 ^a
การนำไฟฟ้า						
(มิลลิซิเมนต์ต่อ						
เซนติเมตร)	40.8-47.6	42.1±2.0 ^a	38.9-41.1	39.8±0.7 ^a	39.2-42.4	40.9±1.2 ^a
ความเป็นค่ารวม						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	84.7-147.3	97.8±28.0 ^a	88.7-128.7	99.9±13.4 ^a	93.3-126.7	86.56±15.0 ^a
ความกระด้างรวม						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	4081.2-5939.7	5010.5±1558.5 ^a	4356.0-5849.2	5103.0±1193.2 ^a	4279.5-5928.7	5104.1±1349.2 ^a
แอมโมเนียรวม						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.2-0.8	0.5±0.2 ^a	0.3-0.8	0.5±0.2 ^a	0.3-0.8	0.5±0.2 ^a
ไนไตรท์						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.01-0.03	0.02±0.01 ^a	0.01-0.03	0.02±0.01 ^a	0.01-0.03	0.02±0.01 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2. การศึกษาผลของ DV AQUA ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นเท่ากัน คือ 1,000,000 ตัวต่อบ่อ หรือประมาณ 160,000 ตัวต่อไร่ ในบ่อขนาด 6 ไร่ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 บ่อ คือ ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารควบคุม คืออาหารสำเร็จรูปปกติ และชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง เท่ากับ DV AQUA 2,500 กรัม ผสมลงในอาหารกุ้ง 1,000 กิโลกรัม โดยเริ่มให้อาหารผสม DV AQUA เมื่อกุ้งมีอายุ 30 วัน หลังจากจับกุ้งมีการเปรียบเทียบผลผลิต อัตราการรอดตาย และอัตราการแลกเนื้อและการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลาการเลี้ยงของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง แสดงไว้ในตารางที่ 14

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลผลิตเฉลี่ย เท่ากับ $2,375.13 \pm 313.26$ กิโลกรัมต่อไร่ และอัตราการรอดตายเฉลี่ย 82.08 ± 12.18 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งได้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง $2,202.84 \pm 206.78$ กิโลกรัมต่อไร่ และมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเพียง 73.31 ± 6.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย และน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในชุดควบคุม พบว่ามีค่า เท่ากับ 0.27 ± 0.03 กรัมต่อตัวต่อวัน และ 18.02 ± 0.32 กรัม ตามลำดับ สูงกว่าชุดทดลองซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย เท่ากับ 0.2 ± 0.07 กรัมต่อตัวต่อวัน และน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้ง เท่ากับ 17.40 ± 0.51 กรัม ในขณะที่ค่าอัตราการแลกเนื้อในชุดควบคุมมีค่าอัตราการแลกเนื้อเฉลี่ย เท่ากับ 1.75 ± 0.1 สูงกว่าอัตราแลกเนื้อของกุ้งในชุดทดลอง ซึ่งมีอัตราแลกเนื้อเพียง 1.64 ± 0.04 เท่านั้น ถึงแม้ว่าตัวเลขผลการผลิตของกุ้งในชุดควบคุมและชุดทดลองจากการศึกษาในครั้งนี้จะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติต่อกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณผลผลิตรวมที่ได้จะเห็นได้ว่ากุ้งในชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ให้ผลผลิตรวมเฉลี่ยที่สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม และเมื่อพิจารณาถึงขนาดเฉลี่ยของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง ซึ่งไม่ต่างกันทำให้ราคาขายของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นกุ้งในชุดทดลองซึ่งมีปริมาณมากกว่าชุดควบคุมจึงให้ผลตอบแทนที่ดีกว่ากุ้งในชุดควบคุมด้วย

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อดทดลองที่มีการให้อาหารผสม DV AQUA ในระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์และบ่อควบคุม

บ่อ	ขนาด บ่อ (ไร่)	อัตราความ หนาแน่น (ตัว)	ระยะเวลาที่เลี้ยง (วัน)	ผลผลิตรวม (กิโลกรัม)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	อัตราการ เจริญเติบโต (กรัม/ตัว/วัน)	อัตราการ แลกเนื้อ	อัตราการ รอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
บ่อดทดลอง (อาหารสำเร็จรูปผสม DV AQUA 0.25 เปอร์เซ็นต์)									
1	6	1,000,000	108	15,015.00	2,502.50	17.54	0.27	1.57	85.59
2	6	1,000,000	110	11,443.00	1,907.17	17.86	0.12	1.65	64.08
3	6	1,000,000	111	15,419.00	2,569.83	17.54	0.18	1.67	87.89
4	6	1,000,000	109	15,126.00	2,521.00	16.67	0.24	1.66	90.76
เฉลี่ย	6	1,000,000	110	$14,250.75 \pm 1,879.58^a$	$2,375.13 \pm 313.26^a$	17.40 ± 0.51^a	0.2 ± 0.07^a	1.64 ± 0.04^a	82.08 ± 12.18^a
บ่อควบคุม (อาหารสำเร็จรูปปกติ)									
1	6	1,000,000	105	12,774.32	2,129.05	18.18	0.30	1.64	70.26
2	6	1,000,000	100	12,240.00	2,040.00	17.54	0.28	1.72	69.77
3	6	1,000,000	110	12,818.00	2,136.33	18.18	0.25	1.86	70.50
4	6	1,000,000	112	15,035.87	2,505.98	18.18	0.24	1.61	82.70
เฉลี่ย	6	1,000,000	107	$13,217.05 \pm 1,240.70^a$	$2,202.84 \pm 206.78^a$	18.02 ± 0.32^a	0.27 ± 0.03^a	1.75 ± 0.1^a	73.31 ± 6.27^a

หมายเหตุ 1 ไร่ เท่ากับ 1,600 ตารางเมตร

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับ และค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยง

สำหรับผลการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งชุดควบคุม โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase แสดงไว้ในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 60 วัน และกุ้งชุดควบคุม

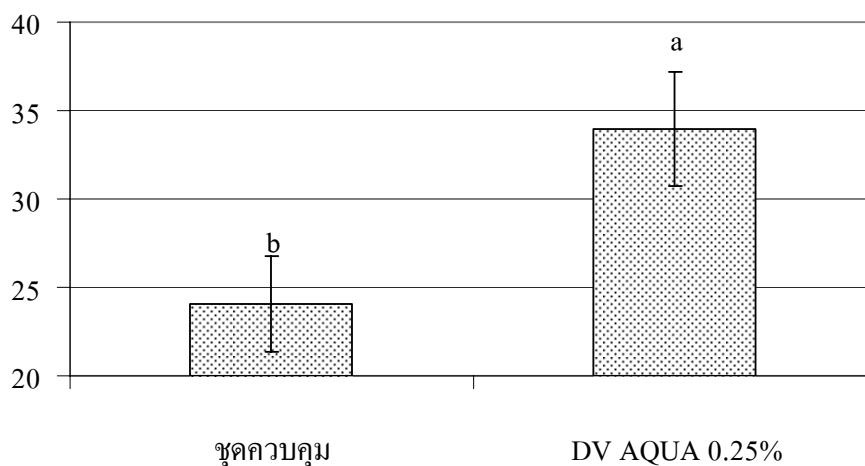
พารามิเตอร์	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ได้รับสาร DV AQUA 0.25 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	24.09 ± 2.73^b	33.95 ± 3.23^a
ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม	41.34 ± 4.36^b	61.63 ± 5.94^a
Phenoloxidase activity (หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)	356.28 ± 21.91^b	423.75 ± 32.67^a
กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง	1: 8	1:16
การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร)	40.30 ± 9.83^b	49.62 ± 9.52^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.) การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจนกระทั่งอายุได้ประมาณประมาณ 90 วัน ให้อาหารผสม DV AQUA เป็นเวลา 60 วัน พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง เท่ากับ $33.95 \pm 3.23 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ $24.09 \pm 2.73 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 19)

ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^7$ cell/ml)

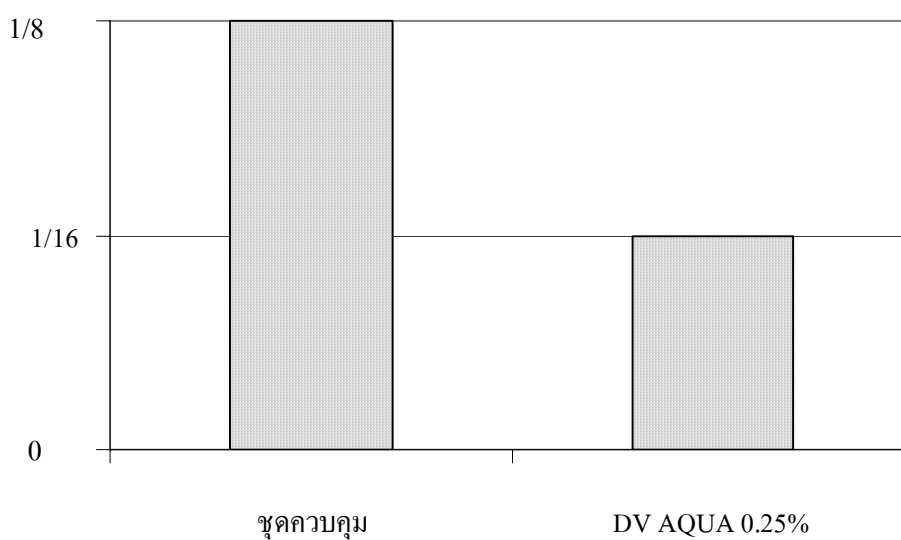


ภาพที่ 19 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

2.) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน คือ 1 : 16 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 : 8 (ตารางที่ 15 และภาพที่ 20)

ความเข้มข้นของซีรัม

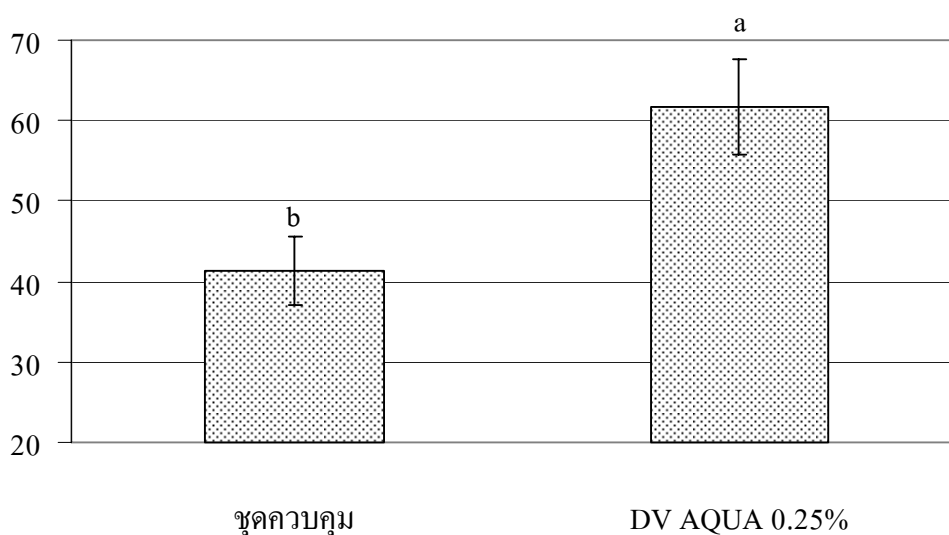


ภาพที่ 20 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

3.) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง

กึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง 61.63 ± 5.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม (41.34 ± 4.36 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 15 และภาพที่ 21)

ปริมาณเม็ดเลือดของกึ่งในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม
(เปอร์เซ็นต์)

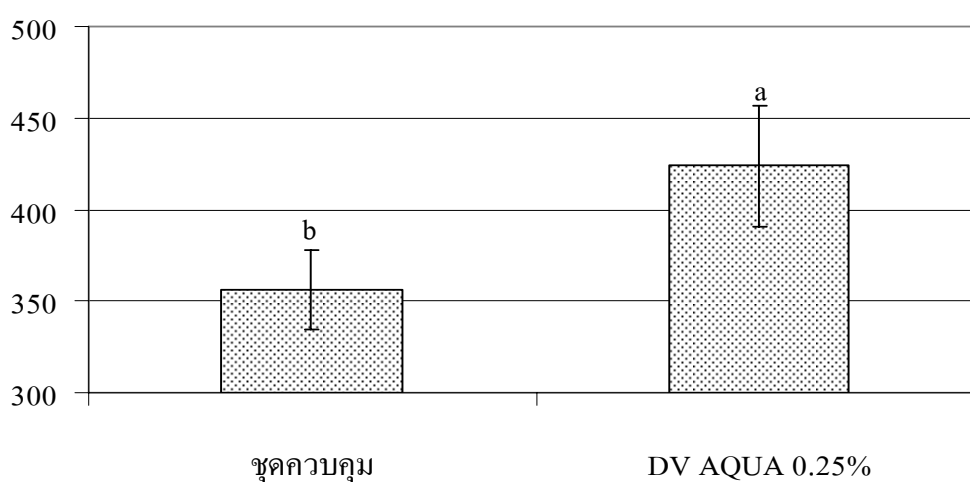


ภาพที่ 21 ร้อยละของเม็ดเลือดของกึ่งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกึ่งขาวแวนนาไมเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

4.) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 423.75 ± 32.67 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน สูงกว่ากลุ่มควบคุม (356.28 ± 21.91 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 15 และภาพที่ 22)

ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase
(หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน)

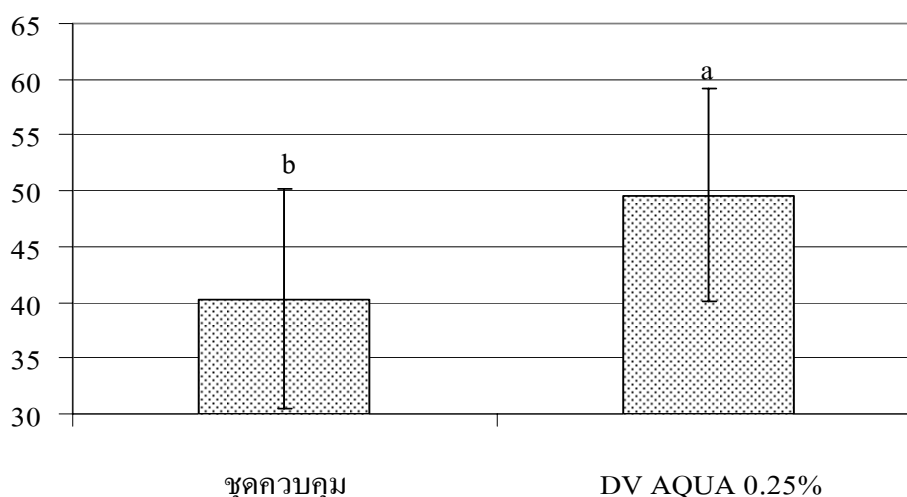


ภาพที่ 22 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไม เทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

5.) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 49.62 ± 9.52 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร สูงกว่าชุดควบคุม (40.30 ± 9.83 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 15 และภาพที่ 23)

ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase
(หน่วย SOD/ มิลลิลิตร)



ภาพที่ 23 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน

จากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยงเห็นได้ชัดเจนว่ากุ้งในชุดทดลองที่ให้อาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในทุกพารามิเตอร์ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase activity กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ทำให้กุ้งในชุดทดลองมีความแข็งแรง มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม และสามารถให้ผลผลิตรวมที่สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม

สำหรับค่าคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงนั้น แสดงในตารางที่ 16 จะเห็นได้ว่าค่าคุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในฟาร์มของทั้ง 2 ชุดการทดลองนั้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม สอดคล้องกับรายงานของชลอ และพรเลิศ (2547)

ตารางที่ 16 คุณสมบัติของน้ำในบ่อทดลองที่ให้อาหารผสม DV AQUA และบ่อควบคุม

คุณสมบัติของน้ำ		บ่อทดลองที่ให้อาหารผสม			
		DV AQUA		บ่อควบคุม	
		พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
ความโปร่งแสง (เซนติเมตร)		7.0-15.0	9.4±2.3 ^a	7.0-12.0	9.47±1.41 ^a
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	-เช้า	28.5-31.3	29.7±1.0 ^a	28.2-31.0	29.6±1.00 ^a
	-บ่าย	31.0-33.5	32.0±0.69 ^a	30.3-33.5	32.0±0.73 ^a
พีเอช	-เช้า	7.6-7.9	7.8±0.1 ^a	7.6-7.8	7.73±0.06 ^a
	-บ่าย	8.2-8.5	8.37±0.1 ^a	8.2-8.6	8.38±0.06 ^a
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	-เช้า	4.8-5.4	5.1±0.2 ^a	4.8-5.3	5.03±0.14 ^a
	-บ่าย	7.1-9.7	8.6±0.6 ^b	7.0-9.9	8.2±0.7 ^a
ความเค็ม (พีพีที)		13.1-16.0	14.3±0.9 ^a	12.0-16.7	14.4±1.54 ^a
การนำไฟฟ้า (มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)		20.3-24.8	22.7±1.4 ^a	20.42-26.85	22.9±1.9 ^a
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		126.0-224.0	187.2±28.9 ^a	145.3-223.3	186.9±41.5 ^a
ความกระด้าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)		2861.3-3889.0	3222.0±350.2 ^a	2704.0-3966.7	3248.8±407.8 ^a
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.02-0.81	0.27±0.18 ^a	0.01-0.78	0.30±0.21 ^a
ไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.00-0.09	0.04±0.02 ^a	0.01-0.08	0.04±0.02 ^a
ไนเตรท (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5.00-10.00	9.11±1.93 ^a	5.0-10.0	8.89±2.10 ^a
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.00-0.00	0.00±0.00 ^b	0.00-1.86	0.74±0.67 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการทดลองให้อาหารผสมสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แก่กุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยและอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งและการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของกิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งและกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับ DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. จากการทดลองพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 50 วัน มีอัตราการรอดตายหลังจากได้รับการฉีดเชื้อ *V. harveyi* สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. ผลการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมในบ่อทดลองที่ให้อาหารผสมสาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 วัน มีผลผลิตเฉลี่ย และอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงกว่าแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม สำหรับการศึกษาค้นคว้าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสาร DV AQUA มีค่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในทุกพารามิเตอร์ สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกันในกึ่งขาวแวนนาไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสาร DV AQUA ที่ได้รับ และระยะเวลาที่ได้รับอาหารผสมสาร DV AQUA โดยกึ่งที่ได้รับอาหารผสม DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 30 วัน มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าเลือกใช้สาร DV AQUA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งได้แก่ 0.125 เปอร์เซ็นต์ จะต้องใช้ระยะเวลายาวนานมากกว่า โดยต้องให้อาหารเป็นระยะเวลาอย่างน้อยประมาณ 40 วัน จะส่งผลให้กึ่งมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมได้

ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับแนวทางในการนำเอาสาร DV AQUA มาใช้ในการเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของลูกกึ่ง ตั้งแต่ในระยะวัยอ่อนจนกระทั่งถึงระยะวัยรุ่น เนื่องจากลูกกึ่งวัยอ่อนในโรงเพาะฟักมักประสบปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียเรื้อรังแสง ทำให้อัตราการรอดตายของลูกกึ่งต่ำ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทัฬหี และ Rudolf Hoffmann. 2543 ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาคำ. ว. สงขลา
 นครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.

_____, จีพร เรืองศรี, สุภา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อ
 ระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาคำ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับ
 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 605-613.

_____, จีพร เรืองศรี, สุภา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: VI. ผลของโรคติดเชื้อต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาคำ.
 ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

_____, จีพร เรืองศรี, สุภา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาคำบนพื้นฐานของเพศ
 และวงจรการลอกคราบ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับ
 พิเศษ): 623-632.

_____, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตินา ตันติกิตติ และ Rudlf Hoffmann. 2543 จ. ภูมิคุ้มกันโรค
 ในกุ้งกุลาคำ : II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาคำ. ว.
 สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

_____, อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกสรจันทร์. 2543 ฉ. ระบบ
 ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาคำ: I. เทคนิคในการศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบ
 เลือดในกุ้งกุลาคำ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ):
 567-580.

จิรพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, สุณีย์ หวันเหลี่ยม, อนิศา สงนุ้ย, สุพัตรา อรุณรัตน์, นพรัตน์ แทน
มาก, จิราพร เพชรรัตน์ และ กิจการ สุขมาตย์. 2546. การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ
Vibrio harveyi จากตอนใต้ของไทยในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี 26 (ฉบับที่ 1): 43-54.

จารุวรรณ ชินกร. 2550. ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ
ระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ
(*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉัทชนัน ศรีไพศาล. 2549. การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว
(*Litopenaeus vannamei* Boone). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนิกา คงสวัสดิ์. 2546. ผลของการใช้ยีสต์สกัดทดแทนปลาป่นบางส่วนในอาหารต่อการเติบโตของ
กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชลอ ลีมสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. สำนักเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ.

_____ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.
สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติ
พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิม
พระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โรคในกุ้ง
กุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2547. องค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ
(*Penaeus monodon* Fabricius) ที่ระยะต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทริกา ชันซื่อ. 2538. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Shrimp Immune System). ประมวลเรื่องการ
ประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 22. สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรม
ราชูปถัมภ์.

ประจวบ หล้าอุบล. 2543. เสวนาวิชาการ เรื่องกุ้ง, น. 1-66. ใน หัวข้อ อดีต-อนาคตกุ้งไทย.
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปัทมาภรณ์ เหล่าเกียรติโสภณ. 2547. การศึกษาชนิดและปริมาณแพลงก์ตอน คุณภาพน้ำและ
องค์ประกอบอาหารในกระเพาะอาหาร ในการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*
Boone, 1931) ที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พชรวดี เลาหะมงคลรักษ์. 2549. การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณวไล จันทรปาน. 2551. การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนา
ไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารผสม AQUANIN PLUS (Beta-Cyclodextrin
Cyateamine Hydrochloride). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรเลิศ จันทร์รัชกุล, เจ เอฟ เทอร์นบอด และ ชลอ ลิมสุวรรณ. 2537. คู่มือการเลี้ยงและป้องกัน
โรคกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, เกษตรกลางบางเขน, กรุงเทพฯ.

_____, นกคณ สุกระกาญจน์ และ สัมพันธ์ ปานจรรย์. 2541. ผลของ β -1, 3- Glucan ต่อการ
ตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immune response) ของกุ้งกุลาดำ. น. 43-52. ใน การประชุม
วิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนนาไม (Practical
Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม่กาศิน,
สมุทรปราการ.

มฤดี สิริพันธ์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ : I. การสกัดสาร ปี้น้ำ
กลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ว.
สงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 ฉบับพิเศษ: 653-662.

มาลินี วิชชาวูธ และ สมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรม
ประมง. วารสารการประมง 58 (2): 170-171.

ยอดยิ่ง เทพรานนท์. 2540. วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งอื่น ๆ ในสกุล *Penaeus*. บางแคการ
พิมพ์, กรุงเทพฯ.

_____. 2541. วัคซีนสำหรับกุ้งกุลาดำและกุ้งอื่น ๆ ในสกุล *Penaeus*: หลักการ รายละเอียดของ
วัคซีนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและกำจัดโรคและผลของการใช้วัคซีนกับกุ้งกุลาดำ.
เอกสารวิชาการ, ทดลองและวิจัย, ศูนย์วิจัยกุ้งกุลาดำ มหาชัย.

วรรณัฐ อนันตศิลป์. 2545. การศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactobacillus* ในการควบคุมการเจริญ
ของเชื้อ *Vibrio* spp. และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล. 2547. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง, น. 48-64. ใน การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
เรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2549. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. วิทยานิพนธ์
ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2543. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาเพาะเลี้ยง
สัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย. 2552. อุตสาหกรรมกุ้งปี 52 ตั้งเป้าลดกำลังการผลิต. AQUA
BIZ. ฉบับที่ 17 ประจำเดือน มกราคม: 12-15.

สมบัติ รักประธานพร. 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุกัญญา ศิริรัฐนิคม, จรีพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, อภิญา ส่องประดิษฐ์, นเรศ ช่วยยุค, วีรพงษ์ เทพอักษร และ กิจการ สุขมาตย์. 2543. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อไวรัสโรเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) ในน้ำทะเล. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 697-706.

เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง. 2550. การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abraham, T.J., R. Manley, R. Palaniappan and K. Dhevendaran. 1997. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. **J. Aquacul. Tropics**. 12: 1-8.

APHA, AWWA and AWCA. 1995. **Standard Methods for the Examination Water and Wastewater**. 20th ed. United Book Press, Maryland.

Aspan, A., M. Hall and K. Soderhall. 1990. The effect of endogeneous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. **Insect Biochem**. 20: 485-492.

Bachère, E., D. Destoumieux and P. Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptide of shrimp: a comparison with other effect of innate immunity. **Aquaculture** 191: 71-88.

Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J.D. Lorget, J. Garnier and B. Romestand. 2004.

Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaei shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.** 198: 149-68.

Baumann, P., A.L. Furniss and J.V. Lee. 1984. Section 5 facultatively anaerobic gram-negative rods. Genus I *Vibrio pacini* 1954, 411 pp. In N.R. Krieg and J.G. Holt, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore; Williams and Wilkins.

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1984. IHHNV virus: Infectivity and Pathogenicity studies in *Penaeus styliostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 38: 185-194.

Bray, W.A., A.L. Lawrence and J.R. Leung-Trujillo. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. **Aquaculture** 122: 133-146.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Burgents, J.E., K.G. Burnett and L.E. Burnett. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of yeast culture food supplement. **Aquaculture** 231: 1-8.

Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernandez-Saavedra, R.D. Philippin and F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucans and sulphated polysaccharide. **Fish Shellfish Immunol** 12: 353-366.

Castille, J.R. and A.L. Lawrence. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentration in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 68A: 75-80.

- Chang, C.F., H.Y. Chen, M.S. Su and I.C. Liao. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** 10: 505-514.
- _____, M.S. Su, H.Y. Chen and I.C. Liao. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 297-310.
- Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.
- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics** 54: 442-445.
- Davis, D.A. 2000. Replacement of fishmeal in practical diet for the Pacific white shrimp. **Int. Aqua Feed.** 3: 35-37.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A.V. Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.** 272: 28398-28406.
- Devaraja, T.N., S.K. Otta, G. Shubha, K. Indrani, P. Tauro and K. Iddya. 1998. Immunostimulation of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacterin and yeast glucan. pp. 167-170. In T.W. Flegel, eds. **Advances in Shrimp Biotechnology, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November 1988**, Chiang Mai, Thailand.

- Diamond V. 2008. **DV AQUA The Jealthy Advantade**. Available Source :
<http://www.diamondv.com/aqua/shrimp.htm>, 28 march 2008.
- Dieguez-uribeondo, J. and J. Cerenius. 1998. The inhibition of extracellular proteinase from *Aphanomyces* spp. By three different proteinase inhibitors from crayfish blood. **Mycol. Res.** 120: 820-824.
- Dijkgraaf, G.J.P., H. Li and H. Bussey. 2002. Cell wall β -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 179-213. In S. De Baets, E.J. Vandamme and A. Steinbüchel, eds. **Biopolymers Polysaccharides II. Polysaccharides from Eukaryotes**. Wiley-VCH, Weinheim.
- Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). **Comp. Biochem. Physiol.** 32: 709-731.
- Eldred, B. and R.F. Hutton. 1960. On the grading and identification of domestic commercial shrimps (Family Penaeidae) with a tentative world list of commercial penaeids. **Quart. J. Flor. Acad. Sci.** 23(2): 89-118.
- Flicker, J. 2002. Fish meal : High protein does not stand for high quality. **Feed Int.** 23: 13-16.
- Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4 – 19.
- Freire Marques, M.R. and M.A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture** 191: 23–44.
- Graindorge, V.A.D., V. and T.W. Flegel. 1999. **Diagnosis of Shrimp Disease with Emphasis on the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon***. Multimedia Asia.

- Hikima, S., J.I. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. **Gene**. 316: 187-195.
- Hose, J.E., G.E. Matin, V.A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.
- Huang, C.C., K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll and Y.L. Song. 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 279-294.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). *In* **Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992**. The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.
- Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. **Curr. Opin. Immunol.** 5: 74-82.
- Jiravanichpaisan, P., B.L. Lee and K. Soderhall. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunology** 211: 213-236.
- _____, T. Miyazaki and C. Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **J. Aquat. Anim. Health**. 6: 27-35.
- Johansson, M.W., T. Holmblad, P.O. Thornqvist, M. Cammarata, N. Parrinello and K. Soderhall. 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell adhesive peroxidase in crayfish. **J. Cell Sci.** 112: 917-925.

- Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cell. **Insect. Biochem.** 19: 183-190.
- Keyser, P. 1999. **Crustacean Immunity: Characterization of Some Crayfish Blood Proteins.** Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.
- Khoo, L., D.W. Robinette and E.J. Noga. 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Mar. Biotechnol.** 1: 44-51.
- Klein, J. 1982. **Immunology: The Science of Self-nonsel Discrimination.** USA: A Wiley interscience publication.
- Knaap, W.V.D. 1993. **Defense in Invertebrate in Biotol (Biotechnology by open learning).** Butterworth-Heinemann Ltd. Linnae House, Jordan Hill, Oxford.
- Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology** 80: 393-412.
- Landbau, V.V. 2002. **Naturalland Standards for Organic Aquaculture.** Grafelfing, Germany.
- Lavilla-Pitogo, C.R., L.J. Albright and M.G. Paner. 1998. Will microbial manipulation sustain the ecological balance in shrimp (*Penaeus monodon*) hatcheries. pp. 185-192. In T.W. Flegel ed. **Advances in Shrimp Biotechnology, Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November**, Chiang Mai, Thailand.
- _____, M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and R. De la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.

- Le, M.G., G.M. Le, D. Ansquer, S. Froissard and P. Levy. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. **Fish Shellfish Immunol.** 7: 227-234.
- Lee, K.K., F.R. Chen and P.C. Lui. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** 5(5): 385-387.
- Liang, Z., P. Lindblad, A. Beauvais, M.W. Johansson, J.P. Latge', M. Hall, L. Cerenius and K. Soderhall. 1992. Crayfish alpha-macroglobulin and 76 kD protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kD protein. **J. Insect Physiol.** 38: 987-995.
- Lightner, D.V. 1988. Disease of cultured penaeid shrimp and prawns, pp. 8-127. In C.S. Sinderman and D.V. Lightner (eds) **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture**, Elsevier, Amsterdam.
- Liu, C.-H., W. Cheng, C.-M. Kuo, J.-C. Chen. 2004. Molecular cloning and characterization of a cell adhesion molecule, Peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 13-26.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Luo, R. 1996. Study on the contents of serum protein and glucose in the hemolymph of the shrimp *Penaeus chinensis*. *Oceanol. Limnol.* **Sin Haiyang Yu Huzhao.** 27: 476-480.
- Manners, D.J., A.J. Masson and J.C. Patterson. 1973. The structure of Beta-(1,3)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochem. J.** 135: 19-30.
- Martin, G.G. and L.B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocyte. **J. Morphol.** 185: 339-349.

- Martin, G.G., D. Poole, C. Poole, J.E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Inver. Pathol.** 62: 308-315.
- Martinez-Palacios, C.A., L.G. Ross and V.L. Jimenez. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*. Boone, 1931. **J. Aquacult. Trop.** 11(1): 59-65.
- Moullac, G.L., C. Soye, D. Saulnier, D. Ansquer, J. Avarre and P. Levy. 1998. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish Shellfish Immunol.** 8: 621 - 629.
- Nakamura, T., T. Morita and S. Iwanaga. 1989. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. Isolation and characterization. **Eur. J. Biochem.** 154: 511-21.
- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxiase activating system of the shrimp *penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Pérez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeid and Sergestoid Shrimp and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Families and General.** Memories du Museum Nation D'Histoire Naturelle, Paris, France.
- Pillemer, L. and E.E. Ecker. 1940. Anticomplementary factor in fresh yeast. **J. Biol. Chem.** 137: 139-142.
- Pizzutto M. and R.G. Hirast. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveii* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M 13 DNA fingerprinting. **Dis Aquat. Org.** 21: 61-68.

- Purivirojkul, W., N. Areechon and P. Srisapoom. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 181-187.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology**. 97: 183 - 350.
- Riggi, S.J. and N.R. Di Luzio. 1961. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. **Am. J. Physiol.** 200: 297-300.
- Ruangpan, L., Y. Danayadol, S. Direkbusarakom, S. Sriuraitana and T.W. Flegel. 1999. Bacteriophage implicated in mortality of cultivated *Penaeus monodon* exhibiting tea-browngill syndrome (TBGS). **Dis. Aquat. Org.** 35: 195-201.
- Santos, E.A. and L.E.M. Nary. 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.** 87A(4): 1033-1035.
- Schnapp, D., G.D. Kemp and V.J. Smith. 1996. Purification and characterization of a prolinerich antibacterial peptide, with Sequence similarity to battenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 240: 532-539.
- Scholz, U., G. Garcia Diaz, D. Ricque, L.E. Cruz Suarez, F. Vargas Albores and J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Litopenaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture** 176: 271-283.
- Seidman, E.R. and A.L. Lawrence. 1986. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. **J. World Maricult. Soc.** 16: 333-346.

- Seki, N., T. Mata, T. Oda, D. Iwaki, K.I. Kma, T. Miyata and S. Iwanaga. 1994. Horseshoe crab (1, 3)- β -D-glucan-sensitive coagulation factor G. **J. Biol. Chem.** 269: 1370-1374.
- Sequeira, T., D. Tavares and M. Arala-Chaves. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 97-104.
- Sindermann, C.J. 1990. **Principaldisease of Marine Fish and Shellfish, 2 ed.** Academic Press.
- Smith, L.L., P.G. Lee, A.L. Lawrence and K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three size of *Penaeus vannamei* Boone: effect of dietary protein and protein source. **Aquaculture** 46: 85-96.
- Smith, V.J. and K. Soderhall. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. **Cell Tissue Res.** 233: 295-303.
- _____ and J.R.S. Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunol.** 2 (1): 1-31.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev.* **J. Fish. Dis.** 2: 3-23.
- _____ and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10: 23-28.
- _____ and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.

- Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983 a. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 229–239.
- _____ and V.J. Smith. 1983 b. The prophenoloxidase activating system a complement-like pathway in arthropod, pp. 160 - 167. In J. Asit and D.W. Roberts (eds.). **Infection Processes of Fungi**. Rockefeller Foundation, New York.
- _____ and V.J. Smith. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition in arthropod, pp. 251-258. In A. P. Gupta, ed. **Hemolytic and Humoral Immune Response in Arthropod**. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- _____, L. Cerenius and M.W. Johansson. 1996. **The prophenoloxidase activating system in Invertebrates**. pp. 229-253. In New directions in invertebrate immunology. SOS publications, Fair Harven.
- Song, Y.L. and Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 201-209.
- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23(3): 179 - 186.
- _____, S. Y. Lee and K. Söderhäll. 2002. A β -1, 3-gluacn binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 237-245.
- Sung, H.H. and Y.L. Song. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 145: 41-45.

- Sung, H.H., Y.L. Yung and Y.L. Song. 1996. Enhancement of microcidal activity in the black tiger shrimp prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16(2): 278 – 284.
- Supamattaya, K., J. Pongmaneerat and T. Klowklieng. 2000. The effect of β -glucan (MacroGard®) on growth performance, immune response and disease resistance in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 22: 677-688.
- Supantharika, M., P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technol.** 88 (1): 55-60.
- Suwanto, A., M. Yahana, E. Herawaty and S.L. Angka. 1998. Genetic of luminous *Vibrio* isolated from shrimp larvae. pp. 217-224. In T.W. Flegel ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**, Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11-14 November, Chiang Mai, Thailand.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.
- _____, P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark and F. Magallon-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp, *Penaeus californis* Holmes, phenoloxidase system. **Aquaculture** 29(8): 549-553.
- Vasta, G. R., H. Ahmed, N.E. Fink, M.T. Elola, A.G. Marsh, A. Snowden and E. W. Odom. 1994. Animal lectin as self/non-self recognition molecules. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 712: 55-73.

- Wang, Y.C., P.S. Chang and H.Y. Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 414-418.
- Wassenberg, T.J. and B.J. Hill. 1987. Natural diet of the tiger prewns *Penaeus esculentus* and *P. semisulcatus*. **Aus. J. Mar. Fresh. Res.** 38: 169-182.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable protein of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 121: 169-176.
- Yu, J. 1993. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Ocean-Oniv. Qingdao-Qingdao-Haiyang-Dao-xeu-Xuedao.** 23(1): 107-114.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. ส่วนผสม K-199 (อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด) (กิจการ และคณะ, 2543 น) จำนวน 100 มิลลิลิตร

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน 50 มิลลิลิตร

Salt mixture 10 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 มิลลิลิตร

CaCl₂ · 2H₂O 10 มิลลิลิตร

L-glutamine 1 มิลลิลิตร

Hepes 0.238 กรัม

L-cystein 5 กรัม

De-ionized water ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายสาร (ทุกตัวที่ใช้เตรียมสารเคมี)

วิธีการเตรียมสารเคมีแต่ละตัว คือ

1.1 M-199 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ใช้ได้ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) โดยวิธีเตรียมคือใช้ M-199 1 ซองกับ NaHCO₃ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.2 Salt mixture ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.4 กรัม

MgCl · 6 H₂O 3.3 กรัม

MgSO₄ · 7 H₂O 3.0 กรัม

NaH₂PO₄ · 2 H₂O 0.05 กรัม

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 11 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.9 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

L-glutamine 0.015 กรัม ผสมกับน้ำ De-ionized water 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.6 Hepes จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cystein จำนวน 5 กรัม

วิธีการเตรียม K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร โดย นำสารละลายจากข้อ 1.1- 1.7 ผสมกันตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ De-ionized water ปรับพีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้พีเอชอยู่ในช่วง 7.3-7.6 กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรใน Laminar flow

2. Shrimp saline

โซเดียมคลอไรด์	28.4 กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.25 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.7 กรัม
Glucose (Dextrose)	1.0 กรัม
Hepes	2.38 กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำ De-ionized water 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตรในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และอบให้แห้ง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker's yeast

0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์

shrimp saline

นำ Baker's yeast ละลายใน 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง yeast ด้วย shrimp saline ที่ 3,000 rpm. 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง shrimp saline : yeast เท่ากับ 1 : 1 หลังจากนั้นละลายด้วย shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

KH_2PO_4 1.3609 กรัม

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5. การเตรียมสารในชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD[®] Superoxide dismutase

5.1) สารละลาย Reagent 1 (R_{1a}) ทำการเติมสารละลาย R_{1b} ลงในขวดสาร R_{1a} ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

5.2) สารละลาย Reagent 2 (R_2) ทำหน้าที่เป็น Xanthine oxidase (enzyme) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.3) สารละลายมาตรฐาน CAL standard (S_0) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร