ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง — **สาขา**

ชีววิทยาประมง — **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของ PROMUTASE™ 200 ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกัน แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of PROMUTASE™ 200 on Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นามผู้วิจัย นางสาวปริยดานุ์ จารุคม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของ PROMUTASE™ 200 ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of PROMUTASE™ 200 on Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นางสาวปริยดานุ์ จารุคม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริยดานุ์ จารุคม 2553: ผลของ PROMUTASE™ 200 ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกัน แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. 80 หน้า

การศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ระยะโพสลาร์วา 12 ในห้องปฏิบัติการ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ชุดการทดลองที่ไม่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 (ชุดควบคุม) ได้รับ PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ จำนวนชุดละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 12 จำนวน 50 ตัว ลงเลี้ยงในถังขนาด 500 ลิตร ให้อาหารปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวต่อวันวันละ 4 มื้อเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว 2.40 ± 0.13 กรัม สูงกว่ากุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (2.15±0.23กรัม) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (2.29 ± 0.19 กรัม) อัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า 92.00 ± 2.83 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมและกุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 76.50 ± 5.51 และ 81.00 ± 2.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ผลการศึกษาอัตราการรอดตายของกุ้งเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่ากุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตาย 90.00±10.00 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (50.00±10.00 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 80.00±10.00 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการโดยการผสมในอาหาร แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ชุดควบคุมและได้รับ PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ จำนวนชุดละ 7 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้งขาวแวนนาไม 30 ตัว (8-10 กรัม) เลี้ยงกุ้งในถังขนาด 500 ลิตร ให้อาหารปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวต่อวันวันละ 4 มื้อเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว 19.67±0.50 กรัม สูงกว่าชุดควบคุมและชุดที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม 16.67±0.50 และ 17.56±0.88 กรัม ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีอัตราการรอดตายสูงที่สุด (92.67±1.15 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้ง พบว่ากุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวม, กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด, การผลิต superoxide anion และมีอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* สูงกว่ากุ้งที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้สาร PROMUTASE™ 200 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 20 วัน สามารถช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอด และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแวนนาไมได้

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pariyada Jarukhom 2010: Effects of PROMUTASE™ 200 on Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 80 pages.

A study on the effects of PROMUTASE™ 200 on growth and survival rate in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was conducted under laboratory conditions. Postlarvae 12 (PL12) were stocked into 12 500-liter fiberglass tanks at the density of 50 PL/tank. Salinity during the 60-day rearing period was 25 ppt and temperature was maintained at 28±1°C. Tests were carried out in three treatments (with four replicates/treatment). Each replicate consisted of 50 shrimp in 500-liter tanks. Shrimp were fed four times daily at the satiation rate for 60 days with pelleted feed containing graded levels of PROMUTASE™ 200 (0, 100 and 200 mg/kg of the feed). After 60 days of dietary administration, shrimp fed with PROMUTASE™ 200 at 200 mg/kg had an average body weight (2.40 ± 0.13 g) significantly higher ($P<0.05$) than the control group (2.15±0.23 g). No statistical difference was found between the average body weight of shrimp in the group that fed with PROMUTASE™ 200 at 100 mg/kg (2.29 ± 0.19 g). Percentage survival rate of shrimp fed with PROMUTASE™ 200 at 200 mg/kg (92.00 ± 2.83 %) was significantly higher ($P<0.05$) than PROMUTASE™ 200 at 100 mg/kg and the control groups (81.00 ± 2.58 and 76.50 ± 5.51%). After challenged with virulent strain of *Vibrio harveyi*, shrimp fed with PROMUTASE™ 200 at 200 mg/kg had percentage survival rate (90.00±10.00 %) significantly higher ($P<0.05$) than the control group (50.00±10.00). No statistical difference was found between percentage survival of shrimp in the control group and the group that fed with PROMUTASE™ 200 at 100 mg/kg (50.00±10.00 and 80.00±10.00 %). A study on the effects of PROMUTASE™ 200 on growth, survival rate and immune response in Pacific white shrimp was conducted under laboratory conditions. Determination of the growth-promoting and immunostimulant effects of PROMUTASE™ 200 administration in the diet, tests were carried out in three treatments (with seven replicates/treatment). Each replicate consisted of 30 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 PROMUTASE™ 200 at 0, 100 and 200 mg/kg of the feed. After 50 days of dietary administration, shrimp fed with PROMUTASE™ 200 at 200 mg/kg had the highest survival rate (92.67±1.15%) and average body weight (19.67±0.50 g) significantly higher ($P<0.05$) than the control group (16.67±0.50 g) and 100 mg/kg group (17.56±0.88 g). The immune characteristics of Pacific white shrimp (with three replicates/treatment) in this study revealed that shrimp which fed on diets containing PROMUTASE™ 200 at 200 mg/kg had significantly higher ($P<0.05$) total hemocyte (THC), percentage phagocytosis, bactericidal activity, superoxide dismutase activity and survival rate after injection with *V. harveyi* than PROMUTASE™ 200 at 100 mg/kg and control groups. The present study indicated that oral administration of PROMUTASE™ 200 at 200 mg/kg of feed at least 20 days could increase growth, survival rate and immune response of *L. vannamei*.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษาแนะนำในด้านการทดลอง และการตรวจแก้ไขข้อมูลต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณบริษัท เซฟปิค ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆ ปริญญาเอกและเพื่อนๆ ปริญญาโททุกคน ที่ช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการเก็บข้อมูลระหว่างวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งการดูแลความเรียบร้อยในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง และผู้ใกล้ชิดทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษาและเป็นกำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ปริยดานุ์ จารุคม

มกราคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	41
ผล	41
วิจารณ์	64
สรุปและข้อเสนอแนะ	66
สรุป	66
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ PROMUTASE™ 200	23
2	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน	41
3	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 3.17×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	44
4	แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ PROMUTASE™ 200 ในระดับต่างกัน	46
5	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน	47
6	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 50 วัน	49
7	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	52
8	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	53
9	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	55
10	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	59
12	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 7.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	61
13	คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ PROMUTASE™ 200 ในระดับต่างกัน	62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการแข็งตัวของเลือด	16
2	แสดงลักษณะของผลิตภัณฑ์ PROMUTASE™ 200	24
3	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD@ superoxide dismutase	36
4	น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน	42
5	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน	43
6	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*	44
7	การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว	45
8	น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน	48
9	น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะ 0, 20, 35 และ 50 วัน	48
10	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน	50
11	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ระยะ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	50
12	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	52

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	54
14	ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	56
15	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	58
16	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน	59
17	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*	61

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของ PROMUTASE™ 200 ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกัน แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of PROMUTASE™ 200 on Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

คำนำ

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) หรือที่เกษตรกรไทยนิยมเรียกกันว่ากุ้งขาวแวนนาไมมีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาและเป็นกุ้งชนิดที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ (Rosenberry, 1993) หลังจากกุ้งชนิดนี้นำเข้าไปเลี้ยงในประเทศไต้หวันต่อมาการเลี้ยงกุ้งขาวชนิดนี้ได้ขยายตัวไปยังประเทศจีน ไทย อินโดนีเซีย เวียดนาม และฟิลิปปินส์ ทำให้ผลผลิตจากการเลี้ยงกุ้งขาวเพิ่มมากขึ้นแทนที่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (ชลอ และพรเลิศ, 2547) เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมส่วนใหญ่จะมีอัตราการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นทำให้ในระหว่างการเลี้ยงมักจะเกิดปัญหากุ้งป่วยเป็นโรค ซึ่งโรคที่พบในการเพาะเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส (Saulnier *et al*., 2000; Soowannayan *et al*., 2003; Liu *et al*., 2004)

สำหรับโรคที่มีสาเหตุมาจากไวรัส เช่น โรคดวงขาว(white spot syndrome virus) โรคไวรัสหัวเหลือง (yellow-head virus) และโรคทอร่า (Taura syndrome virus) ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคได้แต่ปัญหากุ้งป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียเกษตรกรจะใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษาซึ่งบางครั้งจะทำให้มีปัญหายาตกค้างส่งผลกระทบต่อการส่งออกและผลต่อเนื่องที่เกิดคือทำให้ราคากุ้งลดลงจึงมีการศึกษาหาทางที่จะลดการใช้ยาปฏิชีวนะโดยการใช้การเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์น้ำโดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายอย่างเช่น เบต้ากลูแคน (β-glucan) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide : LPS) และเปปติโดกลัยแคน (peptidoglycan : PG) (พรเลิศ และ คณะ, 2541; ฉัทชนัน, 2549; พชรวดี, 2549; วัชริยา, 2549) ซึ่งจะทำให้กุ้งมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้นและลดการใช้ยาปฏิชีวนะได้ทำให้การส่งออกกุ้งของประเทศไทยไม่อยู่ในสภาวะที่เสี่ยงเนื่องจากผลผลิตกุ้งมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เพื่อการส่งออก (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

PROMUTASE™ 200 ถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัท BIONOV จำกัด ประเทศฝรั่งเศสสกัดได้จากผลของแคนตาลูปซึ่งอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ถึงแม้ว่าในร่างกายของกุ้งมีเอนไซม์ (SOD) อยู่แล้ว (Brouwer *et al*., 2003) แต่การเพิ่มเอนไซม์ (SOD) ไปโดยตรงนั้นน่าจะมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้รวดเร็วและดีกว่าการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการทราบผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมและความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้กุ้งที่อนุบาลในโรงเพาะฟักและในบ่อเลี้ยงเป็นโรคจำนวนมากซึ่งถ้าผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการได้ผลดี สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในระดับฟาร์มต่อไปได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ที่ผสมในอาหารในระดับต่างกัน ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ที่ผสมในอาหารในระดับต่างกัน ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ที่ ผสมในอาหารในระดับต่างกัน ต่อความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) มีชื่อสามัญว่า Pacific white shrimp, West Coast white shrimp, White leg shrimp (FAO name) (Poss, 1998)

รูปแบบการเลี้ยง

ประเทศเอกวาดอร์เป็นประเทศที่มีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมาก (Hirono and Leslie, 1992) นอกจากนี้ยังเลี้ยงมากในประเทศเม็กซิโก บราซิล โคลอมเบีย เปรู เวเนซูเอลา เบลิซ คอสตาริกา เอลซัลวาดอร์ กัวเตมาลา ฮอนดูรัส ปานามา สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐโดมินิกันและเปอร์โตริโก (Lester, 1992) การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีรูปแบบการเลี้ยง 3 แบบ ได้แก่

1. ระบบการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (extensive culture) ส่วนใหญ่จะพบมากในทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ บ่อเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ ประมาณ 30-50 ไร่นำลูกกุ้งที่รวบรวมมาจากธรรมชาติปล่อยในอัตราความหนาแน่นต่ำประมาณ10-15 ตัวต่อตารางเมตร กุ้งจะกินอาหารธรรมชาติในบ่อเท่านั้นไม่มีการให้อาหารในระหว่างการเลี้ยงและไม่มีเครื่องให้อากาศ ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงมีการถ่ายเปลี่ยนน้ำตามความเหมาะสมการเลี้ยงแบบนี้จะให้ผลผลิตต่ำแต่จะมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำด้วย

2. ระบบการเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive culture) การเลี้ยงแบบนี้พบมากในทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ บ่อเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่เช่นเดียวกับแบบแรก การเลี้ยงกุ้งโดยนำลูกกุ้งมาจากธรรมชาติหรือโรงเพาะฟักจากพ่อแม่พันธุ์ที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ มีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูงขึ้นระหว่าง 20-40 ตัวต่อตารางเมตร เปลี่ยนถ่ายน้ำมากขึ้น 10 - 30 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ให้อาหารที่มีโปรตีน 25-35 เปอร์เซ็นต์ บางฟาร์มไม่มีเครื่องให้อากาศ แต่ฟาร์มส่วนใหญ่จะมีเครื่องให้อากาศแต่มีจำนวนไม่มากประมาณ 15 แรงม้าต่อเฮกแตร์ ผลผลิตระดับปานกลางไม่สูงมากนัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive culture) ส่วนมากบ่อเลี้ยงจะขนาดเล็กลงประมาณ 3-6 ไร่ นิยมเลี้ยงกันในประเทศไทย อินโดนีเซียและจีน มีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูงระหว่าง 60-150 ตัวต่อตารงเมตร ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงมาจากโรงเพาะฟักและพ่อแม่พันธุ์ที่มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์มาแล้วจากการเลี้ยง ให้อาหารที่มีโปรตีนสูง มีการใช้เครื่องให้อากาศอย่างเต็มที่และการจัดการในระหว่างการเลี้ยงโดยใช้ความรู้และวิชาการต่างๆ เต็มรูปแบบ ให้ผลผลิตสูงมาก

ชลอ และ พรเลิศ (2547) แบ่งการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตามความเค็มของน้ำได้ 2 รูปแบบ คือ

1.การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำที่มีความเค็มต่ำ ในพื้นที่ภาคกลาง สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีแรก นำน้ำเค็มจากนาเกลือมีความเค็มระหว่าง 100-200 พีพีที มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วเลี้ยงระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะมีการกั้นคอกก่อน เพื่ออนุบาลลูกกุ้ง โดยที่น้ำในคอกจะมีความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้น 3-4 วันก็เปิดคอกออกมา วิธีที่สอง จะมีการปรับความเค็มมาแล้วจากโรงเพาะฟักให้ใกล้เคียงกับน้ำในบ่อเลี้ยง เกษตรกรจะเตรียมน้ำให้มีความเค็มประมาณ 3-5 พีพีทีทั้งบ่อแล้วนำลูกกุ้งมาปล่อยโดยตรงโดยที่ไม่มีการกั้นคอก การปล่อยลูกกุ้งโดยตรงในบ่อ ในลักษณะนี้คือ น้ำมีความเค็มเหมาะสมทั้งบ่อทำให้อัตรารอดสูงกว่า การปล่อยในคอกที่น้ำภายในบ่อเป็นน้ำจืด เมื่อกุ้งมีขนาดโตพอที่จะจับขายได้จะใช้อวนตาห่างจับกุ้งที่มีขนาดใหญ่ออกขายก่อน ส่วนกุ้งขนาดเล็กจะลอดตาอวน หลังจากจับกุ้งออกบางส่วนจะมีการเติมน้ำเค็มซึ่งจะทำให้กุ้งที่เหลือมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และจะมีขนาดใหญ่เมื่อถึงเวลาที่จับขายครั้งต่อไป นอกจากนั้นกุ้งขาวแวนนาไมอาจจะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความเค็มต่ำมาก เกือบเป็นน้ำจืด (ภิญโญ, 2545)

2. การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ โดยใช้น้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีทีขึ้นไป ส่วนมากพบบริเวณริมฝั่งทะเลทางภาคตะวันออกเช่นในจังหวัดจันทบุรีและตราด ส่วนทางภาคตั้งฝั่งทะเลอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน ส่วนมากจะมีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นมากกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ กุ้งมีอัตรารอดสูง ผลผลิตดีกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำที่มีความเค็มต่ำเนื่องจากต้องมีการถ่ายน้ำในปริมาณมาก ในช่วงท้ายของการเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณภาพน้ำกับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง หมายถึง คุณสมบัติทางชีวเคมีและกายภาพของน้ำ เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างหรือพีเอช ความโปร่งแสง ความเค็ม การนำไฟฟ้า ความเป็นด่าง ความกระด้าง ปริมาณแอมโมเนีย และปริมาณไนไตรท์ เป็นต้น (วรวิทย์, 2531) คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งเนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ถ้ามีการจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ไม่ดีจะส่งผลต่อการกินอาหารของกุ้ง เกิดโรคต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้นและมีอัตราการรอดตายต่ำ (Boyd and Fast, 1992)

1. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen, DO)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีความสำคัญในการเลี้ยงกุ้งเนื่องจากผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะมีค่าต่ำสุดช่วงเช้ามืด เนื่องจากถูกใช้ไปในการหายใจของสิ่งมีชีวิตในบ่อ และกระบวนการย่อยสลายของเสียโดยแบคทีเรีย แต่จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อแพลงก์ตอนเริ่มมีการสังเคราะห์แสง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะมีค่าสูงที่สุดในช่วงบ่ายความสามารถในการละลายของออกซิเจนจะแปรผกผันกับอุณหภูมิและความเค็ม ในน้ำที่มีความเค็มและอุณหภูมิเพิ่มมากขึ้นความสามารถในการละลายของออกซิเจนจะลดลง (พุทธ และ ดุสิต,2534) การตอบสนองของกุ้งต่อสิ่งแวดล้อมที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกันออกไป กุ้งที่อยู่ในน้ำที่มีออกซิเจนมากเพียงพอจะแข็งแรงเจริญเติบโตดี แต่ถ้ากุ้งอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีออกซิเจนน้อยกุ้งจะเครียด อ่อนแอทำให้ป่วยเป็นโรคง่าย ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งต้องมีมากกว่า 4มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้กุ้งเจริญเติบโตดี และสารอินทรีย์สลายตัวได้เร็ว เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่เคลื่อนที่และว่ายน้ำตลอดเวลา ดังนั้นหากปริมาณออกซิเจนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้กุ้งลอยขึ้นผิวน้ำ กล้ามเนื้อขาวขุ่นและตายในที่สุด (พุทธ และ ดุสิต, 2534; ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการย่อยอาหาร ดังนั้นหากมีปริมาณออกซิเจนต่ำทำให้กุ้งกินอาหารได้น้อยลง (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2546) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำสามารถเป็นเครื่องบ่งชี้คุณภาพน้ำของน้ำในแหล่งน้ำได้ด้วย (สิทธิชัย, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อุณหภูมิของน้ำ (water temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญเนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็น อุณหภูมิของร่างกายจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งมีผลต่อการกินอาหาร การย่อยอาหารและกระบวนการทำงานต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์น้ำ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะแปรผันตามความเข้มแสง ฤดูกาล สภาพภูมิประเทศ กระแสลม ความลึกและสภาพแวดล้อมทั่วไปถ้าอุณหภูมิของน้ำเหมาะสม(28-30 องศาเซลเซียส)กุ้งจะกินอาหารและเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่ออุณหภูมิของน้ำต่ำจะทำให้การทำงานของระบบต่าง ๆ ของสัตว์น้ำต่ำลงโดยเฉพาะการกินอาหารจะลดลง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547; สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2546; Ponce-Palafox *et al*., 1997; Wyban *et al*., 1995) ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาเปลี่ยนแปลงตามขนาดกุ้ง คือ กุ้งขนาดเล็ก (น้ำหนักน้อยกว่า 5 กรัม) เจริญเติบโตได้ดีเมื่ออุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกุ้งขนาดใหญ่ (น้ำหนักมากกว่า 15กรัม) ประมาณ 27 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะลดลงส่งผลทำให้สารพิษประเภทต่าง ๆ เช่น ยากำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักมีความรุนแรงมากขึ้น และมีส่วนช่วยเร่งให้มีการดูดซึมและการแพร่กระจายของสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้เร็ว และจะทำให้แอมโมเนียในรูปที่เป็นพิษ (un-ionized ammonia) เพิ่มมากขึ้น (Boyd, 1982)

3. ความเป็นกรดด่าง หรือ พีเอช (pH)

ความเป็นกรดด่างหรือพีเอช หมายถึง ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนในน้ำ พีเอชจะมีค่าอยู่ระหว่าง 0-14 ถ้าพีเอชของน้ำมีค่าเท่ากับ 7 แสดงว่าน้ำอยู่ในสภาพเป็นกลาง แต่ถ้าพีเอชต่ำกว่า 7 แสดงว่าน้ำอยู่สภาพเป็นกรดหรือพีเอชมากกว่า 7 แสดงว่าอยู่ในสภาพเป็นด่าง พีเอชของน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 โดยพีเอชต่ำสุดในตอนเช้าไม่ควรจะต่ำกว่า 7.5 และช่วงบ่ายไม่ควรจะสูงกว่า 8.5 และค่าความแตกต่างของพีเอชในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในบ่อเลี้ยงกุ้งมีหลายปัจจัย เช่น คุณสมบัติของดิน ค่าความเป็นด่าง การผลิตการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำซึ่งส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับปริมาณแพลงก์ตอนพืช (ชลอ, 2543; ชลอ และ พรเลิศ, 2547) พีเอชของน้ำจะมีค่าต่ำในช่วงเช้าตรู่ เนื่องจากปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำมีปริมาณสูง จากการหายใจของสิ่งมีชีวิตในบ่อและจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายในบ่อ และพีเอชจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อแพลงก์ตอนเริ่มมีการสังเคราะห์แสง เนื่องจากปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำถูกแพลงก์ตอนนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง หากพี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอชน้อยกว่า 4 มีผลเป็นกรดทำให้กุ้งจะตายและถ้ามากกว่า 11 มีผลเป็นด่างกุ้งจะตายเช่นกัน นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อการแสดงออกของความเป็นพิษของคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น (Kungvankij *et al.,* 1986; Boyd and Tucker, 1998)

4. ความโปร่งแสง (transparency)

เป็นการวัดระยะความลึกของน้ำที่สามารถมองเห็นวัตถุโดยเป็นแผ่นวงกลม (Secchi disc) ที่หย่อนลงไปในน้ำจนถึงความลึกที่มองไม่เห็นวัตถุดังกล่าวและเริ่มมองเห็นใหม่อีกครั้ง ความลึกนี้เรียกว่า Secchi disc depth สามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งน้ำเมื่อใช้ร่วมกับข้อมูลอื่น ๆ (ศิริเพ็ญ, 2543) ความโปร่งแสงที่เหมาะสม ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมควรอยู่ระหว่าง 25-50 เซนติเมตร ความเข้มของสีน้ำสามารถช่วยป้องกันกุ้งตกใจและลดความเครียดของกุ้งได้ (Brock and Main, 1994)

5. ความเค็ม (salinity)

ความเค็ม หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของอิออนที่ละลายในน้ำ อิออนที่สำคัญประกอบด้วย Na^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cl^{-} และ SO_4^{2-} มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรหรือส่วนในพันส่วน (part per thousand: ppt) หรือย่อเป็น พีพีที ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำและมีผลต่อการควบคุมปริมาณน้ำในร่างกายของสัตว์น้ำ ถ้าความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2-3 นาที สัตว์น้ำไม่สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ทำให้สัตว์น้ำตายได้ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของแรงดันออสโมติกภายในตัวสัตว์กับน้ำภายนอก (Lawson, 1995; Boyd and Tucker, 1998) กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่สามารถอาศัยได้ในความเค็มช่วงกว้างประมาณ 1-40 พีพีที (Bray *et al*., 1994) แต่ระดับที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกุ้งแตกต่างกันไป โดยลูกกุ้งระยะโพสลาร์วา มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่ระดับความเค็มประมาณ 33-40 พีพีที ลูกกุ้งขาวแวนนาไมในระยะโพสลาร์วาที่สูงขึ้นสามารถทนต่อการปรับลดความเค็มต่ำได้ (Ponce-Palafox *et al*., 1997; McGraw *et al*., 2002) อัตราการรอดตายของกุ้งขาวเพิ่มขึ้นตามระดับความเค็มน้ำที่สูงขึ้น โดยกุ้งที่เลี้ยงในน้ำระดับความเค็มต่ำ หลังจากลอกคราบจะไม่สามารถสร้างเปลือกให้แข็ง กุ้งมีลำตัวอ่อนนิ่ม เนื่องจากมีแร่ธาตุภายในตัวกุ้งและในน้ำอย่างจำกัด บางตัวก็จะถูกกุ้งตัวที่แข็งแรงกว่ากินเป็นอาหาร และเนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมมีนิสัยที่กินกันเอง (cannibalism) (วิทยา, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การนำไฟฟ้า (electrical conductivity หรือ EC)

การนำไฟฟ้าเป็นความสามารถของน้ำที่จะให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่าน ประสิทธิภาพในการนำไฟฟ้าของน้ำขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นและชนิดของอิออนที่อยู่ในน้ำ ตลอดจนอุณหภูมิขณะที่ทำการวัดในน้ำ (สิทธิชัย, 2549) สามารถวัดได้โดยค่าการนำไฟฟ้าในดินและวัดจากความหนาแน่นโดยใช้ hydrometer ค่าการนำไฟฟ้าที่น้อยกว่า 1 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตรจะไม่มีความเค็ม ส่วนค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 9 จะมีความเค็มสูง ค่าการนำไฟฟ้ามีความสัมพันธ์กับปริมาณธาตุชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทะเล (สมเจตน์ และ คณะ, 2529)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มและลดการนำไฟฟ้าของน้ำ

6.1 ปริมาณของแข็งที่ละลาย (dissolved solid) หากมีจำนวนมาก จะทำให้ค่าการนำไฟฟ้ามีค่าสูงเพราะปริมาณ dissolved solid จะมีส่วนเพิ่มความสามารถเกี่ยวกับ ionic mobility

6.2 อุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้น เพราะอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้การแตกตัวเป็นอิออนของเกลือดียิ่งขึ้น

6.3 ปริมาณพีเอชของน้ำที่มากกว่า 9 หรือน้อยกว่า 5 จะมีผลทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้นเพราะน้ำหรือของเหลวที่เป็นกรดจะมีปริมาณ H^+ และด่างแก่จะมี OH^- มากซึ่งมีผลทำให้ค่า ionic mobility สูง

7. ความเป็นด่าง (alkalinity)

ความเป็นด่าง หมายถึง ความสามารถของน้ำที่จะรับไฮโดรเจนอิออน (H^+) เพื่อทำให้กรดเป็นกลาง ถ้าพีเอชสูงจะมีความเป็นด่างมากขึ้น สารประกอบที่ทำให้เกิดความเป็นด่างมี 3 ชนิด คือ ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) และไฮดรอกไซด์ (OH^-) ซึ่งสารประกอบทั้ง 3 ชนิดจะเป็นตัวกำหนดชนิดของสารละลายด่างที่อยู่ในน้ำ คือ

น้ำที่มีพีเอชเป็นกลางจนถึง 8.3 จะมี HCO_3^- มาก
น้ำที่มีพีเอชตั้งต่ 8.3 ขึ้นไปจะเริ่มมี CO_3^{2-}
น้ำที่มีพีเอชระหว่าง 9.5-10.5 จะมี CO_3^{2-} มาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำที่มีพีเอช 11 หรือมากกว่าจะมี OH^- มาก

ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลทุกชนิด กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่ต้องการธาตุแมกนีเซียมสูง (Mg^{2+}) โดยทั่วไปการรักษาความเป็นด่างให้คงที่นั้นจะใช้วัสดุปูนในกลุ่มคาร์บอเนต ส่วนการเพิ่มความเป็นด่างอาจใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตหรือโซเดียมคาร์บอเนตขึ้นอยู่กับระดับพีเอชของน้ำประกอบกันด้วย (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

8. ความกระด้าง (hardness)

ค่าความกระด้างของน้ำเกิดจากตะกอนของอิออนของโลหะที่มีประจุตั้งแต่ประจุ 2 ขึ้นไปส่วนใหญ่คือ พวก Ca^{2+} และ Mg^{2+} ซึ่งจะวัดออกมาเป็นปริมาณแคลเซียมคาร์บอนเนต ($CaCO_3$) โดยปริมาณความกระด้างรวม หมายถึง ผลรวมของความกระด้างเนื่องมาจากผลรวมความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียม (ศิริเพ็ญ, 2543) ในแหล่งน้ำธรรมชาติโดยทั่วไปมีค่าความกระด้างน้อยกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร การแบ่งความกระด้างของน้ำจะถือเอาปริมาณ $CaCO_3$ ที่มีอยู่เป็นเกณฑ์ สามารถแบ่งความกระด้างของน้ำได้ดังนี้
น้ำอ่อน 0-75 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$
น้ำค่อนข้างกระด้าง 75-150 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$
น้ำกระด้าง 150-300 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$
น้ำกระด้างมาก > 300 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$

สามารถเพิ่มความกระด้างของน้ำโดย การเติมปูนขาว ($Ca(OH)_2$) หรือปูนเผา (CaO)

9. แอมโมเนีย (ammonia)

แอมโมเนียจัดเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีความเป็นพิษต่อกุ้ง และสัตว์น้ำอื่นๆ ยกเว้นแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่ใช้แอมโมเนียเป็นอาหาร แอมโมเนียในน้ำมีผลต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยผลกระทบของการเพิ่มแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจะเพิ่มกำลังผลิตของบ่อโดยเป็นปุ๋ยให้แก่แพลงก์ตอนพืช และเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำโดยตรง ซึ่งอาจมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายต่ำ หรือทำให้สัตว์น้ำตายในระยะเวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สั้นๆ (Lin and Chen, 2000) แอมโมเนียที่พบในน้ำมี 2 รูปแบบ คือ แอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ และแอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำน้อยมาก ในการวัดค่าแอมโมเนียโดยทั่วไปนิยมวัดทั้งสองแบบ ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ทำให้สัตว์น้ำตายอยู่ในช่วง 0.4-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ NH_3 แต่แอมโมเนียระหว่าง 0.1-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้กุ้งโตช้า สำหรับระดับที่ปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้งควรน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียสามารถเปลี่ยนกลับไปมาตามพีเอชของน้ำ โดยเฉพาะที่พีเอชสูงแอมโมเนียจะอยู่ในรูป NH_3 มากทำให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำเพิ่มขึ้น ในทางกลับกัน ถ้าพีเอชของน้ำลดลง แอมโมเนียจะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมอิออนทำให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลง เมื่อแอมโมเนียในน้ำมีปริมาณสูงจะส่งผลต่อกุ้ง คือกุ้งขับถ่ายแอมโมเนียได้น้อยลงทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียในเลือดและเนื้อเยื่อทำให้การใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อกุ้งสูงขึ้น ส่งผลให้พีเอชของเลือดเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แอมโมเนียจะไปทำลายเหงือกและความสามารถในการขนส่งออกซิเจน ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอติดโรคง่าย (มั่นสิน, 2536; ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

10. ไนไตรท์ (nitrite)

ไนไตรท์เป็นสารประกอบระหว่างกลางในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) โดยทั่วไปไนไตรท์จะเปลี่ยนเป็นไนเตรทอย่างรวดเร็วจึงไม่สะสมอยู่ในแหล่งน้ำ แต่ในบางสภาวะหากอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียเร็วกว่าการออกซิไดซ์ไนไตรท์ก็จะเกิดการสะสมของไนไตรท์ขึ้นได้ ไนไตรท์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำความหนาแน่นสูงอาจมีความเข้มข้นสูงเนื่องจากมีอัตราการเติมไนโตรเจนในรูปของอาหารเม็ดสำเร็จรูป ปุ๋ยเคมีหรือปุ๋ยคอกลงในบ่อ แต่ความเข้มข้นของไนไตรท์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำมักจะต่ำ (น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เนื่องจากแอมโมเนียซึ่งเป็นสารตั้งต้นถูกแพลงก์ตอนพืชนำไปใช้ (Boyd and Tucker, 1998) ความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำและพีเอชลดลง นอกจากนี้ค่าความเป็นพิษของไนไตรท์จะถูกยับยั้งโดยคลอไรด์ในน้ำ ดังนั้นในน้ำทะเลซึ่งมีคลอไรด์สูงความเป็นพิษของสัตว์น้ำจึงค่อนข้างต่ำ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์น้ำในกลุ่มครัสเตเชียนเช่น กุ้ง ปู เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Bachere *et al*., 2000) โดยมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ไม่มีกลไกการสร้าง antibody ชนิด Immunoglobulin (Ig) เป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด เลือดกุ้งประกอบด้วย คาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และทองแดง (Cu) เป็นแร่ธาตุที่สำคัญ เลือดของกุ้งเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากมีทองแดงเป็นองค์ประกอบ มีอวัยวะในการสร้างเม็ดเลือดเรียกว่า hemopoietic tissue รงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซในน้ำเลือดของกุ้ง คือ ฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เม็ดเลือดของกุ้งจะมีปริมาณลดลงเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนในปริมาณที่เหมาะสมระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสามารถจำแนกได้เป็น 2 ระบบ ซึ่งจะมีการทำงานร่วมกันอย่างใกล้ชิด ได้แก่

1.ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity)

เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือเซลล์ เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลีนเซลล์ (hyaline cell) เซมิกรานูลาร์ (semi granular) ลาร์จกรานูลาร์ (large granular) และเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อหัวใจ และอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งมีวิธีการหลายวิธีได้แก่ กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และ การห้อมล้อมตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม (nodule formation and encapsulation)

ชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง

Bauchau (1981), Martin and Graves (1985) และ Söderhäll and Cerenius (1992) ได้จำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งออกเป็น 3 ชนิด คือ

1. Hyaline cell

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบรูปร่างคล้ายกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ ลักษณะโครงสร้างที่ผิวของเซลล์ไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodia) ไม่มีแกรนูล (granules)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายในไซโทพลาซึม ขนาดเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมโครเมตร หรือ ขนาดความกว้าง 2.5-3.6 ไมโครเมตรยาว 6.8-13.9 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543) ภายในไซโทพลาซึมมีการเก็บสะสม โปรตีนจำพวก lysozymes รวมถึง proteolytic enzyme หลาย ๆ ชนิด ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของ เซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินและทำลายเชื้อโรคโดยการย่อยภายในเซลล์ (Söderhäll and Cerenius, 1992)

2. Semi-granular cell

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือที่ขอบ มีเม็ดแกรนูลขนาดเล็กภายในไซโทพลาซึมเป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบไมโครวิลไลบ้างเล็กน้อย (Bauchau, 1981) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8ไมโครเมตร และยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543) เซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้จะปลดปล่อยสารภายในแกรนูลออกสู่ภายนอกอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นสารในระบบ prophenoloxidase system (Söderhäll and Cerenius, 1992) เม็ดเลือดชนิดนี้ทำหน้าที่รับรู้และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ทั้งในระดับโมเลกุลและ สิ่งที่มีขนาดโตกว่า โดยการปล่อยเม็ดเล็ก ๆ ออกมาและเม็ดเลือดชนิดนี้จะเคลื่อนไปเกาะและโอบล้อมตามผิวของสิ่งแปลกปลอมนั้นเซมิกรานูลาร์จะรับรู้และมีปฏิกิริยาดังกล่าว เมื่อมีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ เปปติโดกลัยแคนและ เบต้ากลูแคนเข้ามาภายในร่างกาย

3. Large granular cell

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ในไซโทพลาซึมมีเม็ดแกรนูลขนาดโตกว่าเมื่อเทียบกับเซมิกรานูลาร์การยืดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน (Bauchau, 1981) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 8-10 ไมโครเมตร ความกว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร และยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร (กิจการและคณะ, 2543) เม็ดเลือดชนิดนี้ เป็นชนิดที่มีหน้าที่หลักในกระบวนการ proPO system (Söderhäll and Cerenius,1992)

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย และจะทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เม็ดเลือดจะมีการเพิ่มจำนวนมาทดแทนส่วนที่หมดอายุและตายไปจากเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดซึ่งเรียกว่า hemopoietic tissue ในกุ้งพบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และโคนขาเดิน พบอยู่เป็นกลุ่มๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด ซึ่งในน้ำเลือดของกุ้งจะพบรงควัตถุฮีโมไซยานินทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Ratcliffe *et al*., 1985)

กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

เป็นการป้องกันตัวด่านแรกของกุ้งและสัตว์ในกลุ่มอื่น โดยเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านชั้นผิวหนังเข้ามาในร่างกาย phagocyte ซึ่งเป็นเม็ดเลือดที่สามารถกลืนกินสิ่งแปลกปลอมที่มีโครงสร้างเป็นเซลล์หรืออนุภาคขนาดเล็ก ๆ เข้าไปใน phagosome ภายในไซโทพลาซึมซึ่งจะมี proteolytic enzymes อยู่หลายชนิดทำหน้าที่ในการย่อยสลายโครงสร้างของสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว และปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกนอกเซลล์กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ที่ไม่จำเพาะเจาะจง เซลล์ที่ทำหน้าที่นี้จะมีการรับรู้และเตรียมที่เข้าไปกิน โดยนำเข้าสู่เซลล์และใช้น้ำย่อยภายในเซลล์ซึ่งอยู่ใน lysosome ย่อยทำลาย หรือสารอื่นที่เป็น opsonin จะเป็นตัวกระตุ้นให้ phagocyte เคลื่อนไปหาเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกินและทำลายเชื้อโรคเป็นเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ซึ่งหมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือด รวมทั้งเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ โดยเฉพาะในหัวใจและเนื้อเยื่อใต้เปลือก กลไกการทำลายเชื้อของไฮยาลินเซลล์เกิดขึ้นเมื่อ phagocyte เข้ารวมกับอนุภาคของสิ่งแปลกปลอมที่บริเวณผิวเซลล์และกระตุ้นการโอบล้อมรอบอนุภาค โดยเยื่อหุ้มเซลล์ของ phagocyte เกิด phagosome ต่อมาจะเกิดการสร้าง superoxide ที่เรียกว่ากระบวนการ respiratory burst หรือการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) ของ phagocyte ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเม็ดเลือดมีการรับรู้และเข้าจับกับเชื้อโรค โดยอาศัย cell adhesion receptor หรือ peroxinectin จากนั้นมีการนำเอาออกซิเจนเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว และเกิดกระบวนการ reduction ของออกซิเจน เกิดการสร้าง superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ NADPH oxidase ซึ่งต่อมาจะเปลี่ยนเป็น toxic peroxide ในรูปของ H_2O_2 โดยเอนไซม์ superoxide dismutases (SOD) ซึ่ง H_2O_2 ที่ เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับอิออนอิสระพวก halides เกิดเป็นกรดที่เป็นสารพิษ เช่น HOCl ที่สามารถทำลายเชื้อโรคได้โดยตรง (อัจฉริยา และ คมกฤช, 2545; Holmblad and Söderhäll, 1999)

กระบวนการโนดูลฟอร์เมชั่นและเอนแคปซูเลชั่น

เป็นการห้อมล้อมตัวเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีวิธีการที่ซับซ้อนมากกว่ากระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวน มากถูกกำจัดไป การเกิดก้อนโนดูลแสดงให้เห็นถึงการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อที่จะโอบสิ่งแปลกปลอมและสิ่งแปลกปลอมนั้นเพื่อไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกายและมักพบการสร้างโนดูล บริเวณเหงือก และตับ และมักพบการเกิดเมลานิน (melanin) ภายหลังปรากฏการณ์ดังกล่าว โดยเป็นผลมาจาก ปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ส่วนกระบวนการเอนแคปซูเลชั่นเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้น เพื่อต้านทานต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร เช่น เชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่และตัวอ่อนปรสิต ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถกลืนทำลายได้ ต้องอาศัยเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมรอบและห่อหุ้มเอาไว้ (Lackie, 1986; Smith and Söderhäll, 1986)

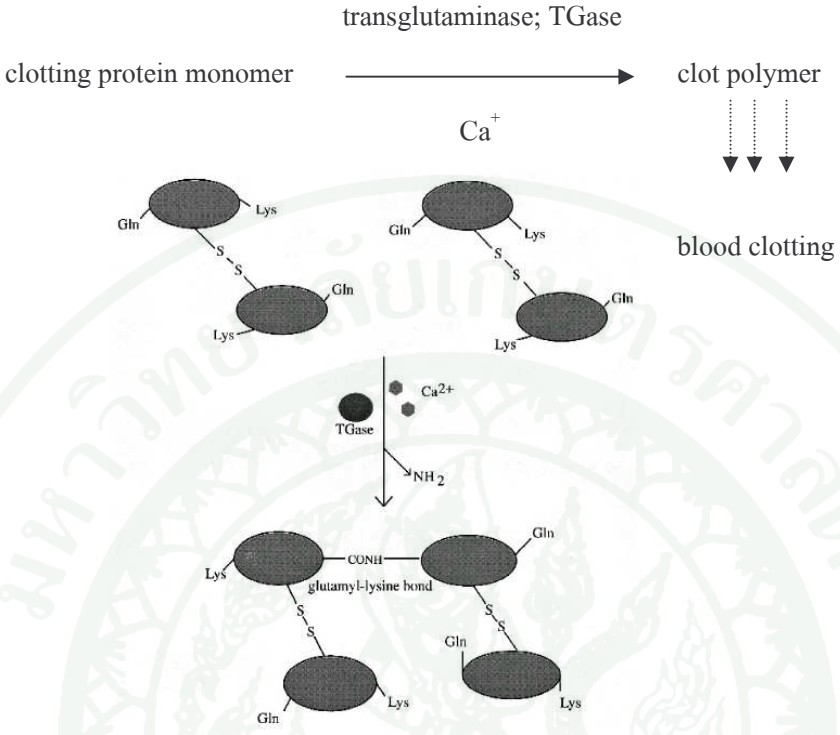
2.ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลาย ๆ ปฏิกิริยา เช่น การแข็งตัวของเลือด (coaglulation) และการทำงานของโปรตีนบางชนิดเช่น lectin ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการจับได้อย่างจำเพาะกับสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต เป็นแอกกลูตินินที่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์แบคทีเรียได้ รวมทั้งการเป็นสารที่ทำหน้าที่คล้าย opsonin ได้อีกด้วย นอกจากนี้โปรตีนในระบบ prophenol oxidase activating system สามารถทำให้เกิดกระบวนการสร้างเมลานิน (melanin formation หรือ melanization) และ opzonization ซึ่งเป็นระบบการป้องกันตัวที่พบได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไปเช่นกัน (ชัยชาญ, 2545)

กระบวนการแข็งตัวของเลือด

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อที่จะป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล เป็นปฏิกิริยาการตกตะกอนหรือการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในเลือด โดยเฉพาะเอนไซม์ Transglutaminase หรือ TGase กับ Clottable protein หรือ coagulogen ตรงบริเวณที่เกิดบาดแผล มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) แล้วได้เป็นเจลหรือโครงข่ายของโปรตีน ปิดบริเวณบาดแผล เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย และไม่ให้องค์ประกอบของเลือดไม่ว่าจะเป็นน้ำเลือด โปรตีน หรือเซลล์เม็ดเลือดต้องสูญเสียไป นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดนี้จะเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการสร้างเม็ดสีที่เกิดขึ้นในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Sritunyaluksana and Söderhäll, 2000) การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 กระบวนการแข็งตัวของเลือด

ที่มา: Sritunyalucksana *et al.* (1999)

Phenoloxidase activating system

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) เกิดจากการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) ของครัสตาเซียโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ เปปติโดกลัยแคนและ เบต้ากลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียฟีนอลออกซิเดส จะไป oxidize สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็นเมลานินได้ในที่สุด หน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของ ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส เช่นเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกัน การเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและเชื้อรา (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992; Bachere *et al*., 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Söderhäll and Smith (1983) ได้ทำการศึกษาการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนหลายชนิด โดยใช้สารละลาย percoll 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิดกรานูลาร์มีค่าเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส สูงถึง 1,249.51 ± 313.36 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนในไฮยาลินเซลล์มีค่าเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสค่อนข้างต่ำ 198.95 ± 78.75 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ทวีศักดิ์ (2547) รายงานว่าปริมาณของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน มีการเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด

Moullac *et al.* (1998) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสในสัตว์กลุ่ม crustacean ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ช่วงระยะเวลาของการลอกคราบ (intermoult) และระยะก่อนการลอกคราบ (premoult) มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบได้ในส่วนของซีรั่มและส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดที่แตก (Noga *et al*., 1996) สามารถถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นได้เมื่อได้รับสารกระตุ้น มีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด และไม่ทนต่อความร้อน (ชัยชาญ, 2545)

Agglutinin

พบโดยธรรมชาติในน้ำลือดของครัสเตเซียน นอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ด้วย (Vargas-Albores, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*)

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดส่วนใหญ่เป็น *Vibrio* spp. ประกอบด้วย *V. anguillarum*, *V.alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* spp. (Mohney *et al*., 1994; Prayitno and Latchford, 1995) โดย *V.harveyi* ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง และเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดความเสียหายมากกว่าเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ โดย *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้น เคลื่อนไหวด้วย polar flagellum ผลิตเอนไซม์ Catalase, Cytochrome oxidase, Amylase, Gelatinase, Lipaseและ Lecithinase สามารถย่อย Lysine และ Ornithine แต่ไม่สามารถย่อย Aragine ได้ ให้กรดจากการใช้ Cellobiose, Glucose, Sucrose, Trehalose, Fructose, Maltose, Raffinose และ Galactose แต่ไม่ให้กรดจากการใช้ Arabinose, Inosital และ Lactose สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 5 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือ 1.6% (Austin and Austin, 1987) มีคุณลักษณะพิเศษ คือสามารถเรืองแสงเช่นเดียวกับแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *V. fischer* (Schemetter *et al*., 1986) และแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์ (Mohney *et al*., 1994) รวมถึง *V. splendidus* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้ (Lavilla-Pitogo *et al*., 1990) เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* นี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำโดยเฉพาะฟาร์มที่เลี้ยงตามชายฝั่งทะเล กุ้งที่ป่วยจะมีปริมาณเม็ดเลือดในน้ำเลือดลดลง น้ำเลือดมีค่าความเป็นด่างมากขึ้น ค่าโปรตีนใน serum ลดลง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการอักเสบของท่อตับและตับอ่อน มีการตายของเซลล์บางส่วนมีเม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมรอบตัวเชื้อเอาไว้ (จรีพร และ กิจการ, 2530) นอกจากก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำแล้วยังมีผลต่อกุ้งแชบ๊วย โดยเฉพาะลูกกุ้งแชบ๊วยในระยะนอเพลียส (ดารุณี และคณะ, 2530)

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) หมายถึง โมเลกุลมีที่มีอิเลคตรอนซึ่งไม่ได้เข้าคู่มากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งในวงโคจรของโมเลกุล ซึ่งไม่เสถียร จึงมีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นที่อยู่ข้างเคียง เพื่อให้โมเลกุลของมันเสถียรขึ้น โดยการรับเอาอิเลคตรอนมาจากโมเลกุลข้างเคียง ทำให้โมเลกุลนั้นเกิดเป็นอนุมูลอิสระ และทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ต่อไป เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่ (Bunker, 1992; Moller *et al.*, 1996) ในการเขียนสัญลักษณ์ของอนุมูลอิสระจะใช้สัญลักษณ์ R แสดงถึงอนุมูลอิสระที่ไม่เฉพาะเจาะจง และจุด (˙) ที่ตำแหน่งขวาบนของสูตรโมเลกุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เดิม เพื่อแสดงถึงอิเลคตรอนที่ไม่ได้จับคู่ อนุมูลประจุบวกเรียกว่า อนุมูลแคทไอออน (cation radical)ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{+\cdot}$ ส่วนอนุมูลประจุลบเรียกว่า อนุมูลแอนไอออน (anion radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{-\cdot}$หรืออนุมูลที่มีประจุเป็นกลาง (neutral radical) ใช้สัญลักษณ์ $(R)^{\cdot}$ (อัญชนา, 2544) โดยทั่วไปในร่างกายมนุษย์ กระบวนการใช้พลังงานของเซลล์แบบใช้ออกซิเจน พบว่าประมาณ 2-5% ของออกซิเจนจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระในระหว่างมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำในกระบวนการลูกโซ่ขนส่งอิเลคตรอน (Ji, 1995; Urso and Clarkson, 2003)ซึ่งในระหว่างกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนนี้ จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O^{\cdot}_2$) อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) และอนุพันธ์ของออกซิเจนบางชนิดคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งไม่ใช่อนุมูลอิสระแต่เป็นอันตรายแก่ร่างกายถ้ามีปริมาณมาก อนุมูลอิสระ และอนุพันธ์ของออกซิเจน รวมเรียกว่า reactive oxygen species การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนทำให้เกิด อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O^{\cdot}_2$) (สมการที่ 1) จากนั้นอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O^{\cdot}_2$) จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ ออกซิเจน (O_2) (สมการที่ 2) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีดังนี้

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -} \qquad (1)$$

$$2O_2 + e^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (2)$$

นอกจากนี้ความเป็นพิษของอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ($O^{\cdot}_2$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในสิ่งมีชีวิตยังเกี่ยวข้องกับเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\cdot}$) เมื่อมีการเข้าทำปฏิกิริยากับพวกธาตุเหล็ก เช่น ferrous iron ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction (สมการที่ 3, 4 และ 5)

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow Fe2+ + O2 \qquad (3)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+} \qquad (4)$$

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2 \qquad (5)$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตามถึงแม้มนุษย์เรามีระบบการต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถควบคุมการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระเพื่อลดการทำลายเซลล์ในร่างกายได้ ซึ่งได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) รวมถึงอาหารที่รับประทานก็เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ และ คาร์โรตินอยด์ เป็นต้น (Urso and Clarkson, 2003) ในสภาวะพักของคนปกติ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสมดุลกับการทำงานของสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระแต่พบว่าเมื่อใดเกิดความไม่สมดุลระหว่างระดับของอนุมูลอิสระและการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด จะส่งผลให้เกิดความเครียดที่เรียกว่า oxidative stress

สารต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่จะไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ร่างกายจึงมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระ ที่เรียกว่า antioxidant defense system ซึ่งได้แก่ สารกลุ่มของเอนไซม์ โปรตีน และสารอาหารต่างๆ สารต้านอนุมูลอิสระหรือ แอนตี้ออกซิแดนซ์ คือสารเคมีที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้มีการทำลายของเซลล์ ซึ่งได้แก่

1. สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากอาหาร เช่น วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม และเบต้าแคโรทีน เป็นต้น

2. โมเลกุลภายในร่างกาย เช่น กลูตาไทโอน อัลบลูมิน บิริรูบิน และกรดยูริค เป็นต้น

3. สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเอนไซม์

สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์ สามารถพบได้ในพลาสมา เม็ดเลือดแดง และในกล้ามเนื้อ เช่น SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx),
glutathione reductase, glutathione transferase เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกับการต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ โดยทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูลอิสระ superoxide ไปเป็น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ดังสมการ

$$2O^{\cdot}_2+2H^{+} \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2+O_2$$

3.2 Catalase (CAT)

เอนไซม์ CAT พบในเซลล์ที่มีการใช้พลังงานแบบแอโรบิก โดยพบในอวัยวะที่สำคัญในร่างกาย โดยเฉพาะพบมากที่ตับและตับอ่อน และเซลล์เม็ดเลือดแดง หน้าที่หลักของ CAT คือสลายโมเลกุลของของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำและออกซิเจน

$$H_2O_2+O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O+O_2$$

3.3 เอนไซม์ Glutathione peroxidase (GPx)

GPx พบในตับและปอดของสัตว์ และ เซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีการทำงานสูงในตับ การทำงานปานกลางในหัวใจ ปอด และสมอง และการทำงานต่ำในกล้ามเนื้อ เอนไซม์นี้มีบทบาทในการสลายโมเลกุลของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำ 2 โมเลกุลและยังสามารถสลายโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไปเป็นน้ำและแอลกอฮอล์อีกด้วย (Moller *et al.*, 1996)

Superoxide dismutase

SOD เป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ต่อต้านอนุมูลอิสระที่จำเป็นในสิ่งมีชีวิตในการต่อต้านผล oxidative ของอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งสารตัวนี้เกิดขึ้นตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตทุกๆ ชนิด โดยปรากฏในรูปของ peroxidative free radicals ปกป้องเซลล์จากการทำให้เกิดการทำลาย โดยการขาดความสมดุลระหว่างระบบ oxidant และ antioxidant เมื่อการขาดความสมดุลเกิดขึ้นจะเรียกว่า oxidative stress

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

SOD เป็น metalloprotein ที่พบในในไมโทคอนเดรีย (mitochondrea) โดยปกติแล้ว เอนไซม์ superoxide dismutase จะทำหน้าที่ในกำจัด superoxide anion ที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดร่วมกับ NADP oxidase ซึ่งทำหน้าที่ในการลดปริมาณ O_2 ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ เอนไซม์ glutathione peroxidase ยังทำหน้าที่เปลี่ยน hydrogen peroxide ไปเป็นน้ำและออกซิเจน พร้อมกับเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ SOD ในการเปลี่ยน superoxide anion ไปเป็น hydrogen peroxide ไม่ให้ผลิต superoxide anion มากเกินไปป้องกันการผลิตอนุมูลอิสระ hydroxyl ดังสมการ

$$2O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} 2O_2^- + NADP^+ + H^+$$

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

กุ้งขาวแวนนาไมผลิต SOD เพื่อทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากกระบวนการที่ไม่พึงปรารถนา เช่น ความเครียด เชื้อโรคหรือสิ่งที่ทำให้เกิดโรคที่นำไปสู่การเก็บสะสมสารอนุมูลอิสระ หรือภาวะออกซิเจนถูก reduce อย่างไม่สมบูรณ์ (reactive oxygen species) เอนไซม์ SOD มีความสำคัญต่อกุ้งโดยสัมพันธ์กับโปรตีนจึงใช้เป็นเครื่องหมายในการประเมินถึงประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิด ดังนั้น SOD จึงเป็นเอนไซม์หลักสำหรับกุ้ง

PROMUTASE™ 200

ในปี ค.ศ. 1980 (พ.ศ. 2523) บริษัท BIONOVจำกัด ประเทศฝรั่งเศส ค้นพบแคนตาลูปสายพันธุ์ที่คงสภาพเก็บได้นานกว่าปกติ 3-4 เท่า PROMUTASE™ 200 เป็นความเข้มข้นที่สกัดได้จากผลของแคนตาลูป ซึ่งอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะ SOD (ตารางที่ 1) โดยนำมาผ่านกระบวนการ lyophilized (กรรมวิธีในการขจัดน้ำออกจากสารตัวอย่างโดยที่สารตัวอย่างยังคงมีคุณสมบัติเหมือนเดิม) ลักษณะของ PROMUTASE™ 200 ลักษณะคล้ายผงแป้ง มีสีเหลืองอ่อน ไม่ละลายน้ำ (ภาพที่ 2) ใช้ผสมในอาหารสัตว์ SOD ไม่ถูกทำลายโดยกระบวนการย่อยอาหารในสภาวะที่เป็นกรด และอุณหภูมิสูง เพราะถูกเคลือบโดยไขมันจากพืชและแร่ธาตุสำหรับช่วงในการดูดซึม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาการใช้ PROMUTASE™ 200 กับสัตว์หลากหลายชนิดเช่น ทดลองใช้สารสกัดจากเมลอนที่มี SOD เพื่อกระตุ้น SOD ใน พลาสมา และการป้องกันการเกิดความเครียดจากการหย่านมในลูกหมู โดยมีการให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตรา 5 กรัม และ 20 กรัม ต่ออาหาร 1 ตัน ผลการทดลองพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ SOD ใน พลาสมาและมีส่วนช่วยในการป้องกันความเครียดในลูกสุกรระยะหย่านม (Lalles *et al*., 2006) และจากผลที่ศึกษาในกุ้งพบว่า PROMUTASE™ 200 ลดอัตราการตายจากการขนส่งและช่วยเพิ่มอัตราการรอดตายของการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไมได้ (Gutierrez *et al*., 2006)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ PROMUTASE™ 200

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
SOD	2600000 UI / kg
Catalase	400000 UI / kg
Phosphorus	0.4 %
Magnesium	0.28 %
Calcium	13.83 %
Sodium	0.14 %
Proteins	9.50 %
Lipids	16.60 %
Carbohydrates	34.90 %
Ashes	39.00 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 2 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ PROMUTASE™ 200

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา ที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับต่างกัน

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 3 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (replication)

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 9 จำนวน 1,500 ตัว จากโรงเพาะฟักกุ้งขาวในจังหวัดฉะเชิงเทรามาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วันในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 1 ถัง ในน้ำความเค็ม 25 พีพีทีเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม โดยให้อาหารสี่ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อครบ 3 วันลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาร์วา 12 จึงนำมาเลี้ยงในถังทดลองขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 12 ถัง โดยจะใส่กุ้งจำนวนถังละ 50 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) ความเค็มของน้ำในถัง 25 พีพีที ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากถังทุก 3 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำแล้วเติมน้ำที่มีความเค็มเท่ากันเข้าไปทดแทนให้ได้ปริมาณเท่าเดิมควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 28$\pm$ 1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกินอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของกุ้งขาวโดยใช้ heater ใส่ในถังทดลอง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่อุณหภูมิของอากาศต่ำเป็นระยะๆ อาจจะมีผลต่อการกินอาหารของกุ้ง

3. อาหารและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ PROMUTASE™ 200 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ PROMUTASE™ 200 0.02 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร

การเตรียมอาหารทดลอง ผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่กำหนดโดยทำการเคลือบบนอาหารสำเร็จรูป และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก ส่วนชุดการทดลองที่ 1 จะทำการเคลือบอาหารสำเร็จรูปด้วยน้ำมันปลาหมึกในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 จากนั้นผึ่งให้แห้งก่อนจะนำไปให้กุ้งแต่ละการทดลอง ปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้ง ตามวิธีของชลอ และพรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 60 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกวัน

4. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ระหว่าการทดลองเก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองทุกสัปดาห์วิเคราะห์ ความเค็ม พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความเป็นด่าง ความกระด้าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยงเป็นเวลา 60 วันนำกุ้งจากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษา คือ ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งที่ให้อาหารควบคุม ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่ 3 กุ้งที่ให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

5.1 นำกุ้งจากถังไฟเบอร์กลาส ชุดการทดลองละ 30 ตัว ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 3 วัน ใส่กุ้งในตู้กระจกตู้ละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยการใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวันเพื่อควบคุมคุณสมบัติของน้ำให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

5.2 ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ประมาณ 0.031 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.17×10^6 CFU/มิลลิลิตร

5.3 ฉีดสารละลายที่มีเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งชุดการทดลองทุกตัว โดยฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุมซึ่งใส่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ จำนวน 1 ตู้ ใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อในปริมาณและตำแหน่งเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 (เพื่อเปรียบเทียบระหว่างทำการทดลองว่ากุ้งในทุกชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการฉีด)ให้อาหารสำเร็จรูปปกติที่ไม่มีการผสม PROMUTASE™ 200 แก่กุ้งในทุกชุดการทดลองหลังจากการฉีดเชื้อในปริมาณที่น้อยกว่าการเลี้ยงปกติ

5.4 จดบันทึกการตายสะสมของกุ้งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งและบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในทุกกลุ่มการทดลอง ในวันที่ 30, 40, 50 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองคือวันที่ 60 วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

2. ผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับต่างกัน

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยมี 3 ชุดการทดลองในแต่ละชุดการทดลองมี 7 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุมเป็นอาหารสำเร็จรูป

ชุดการทดลองที่ 2 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 8-10 กรัม จำนวน 1,500 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ก่อนเริ่มการทดลองเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลา 14 วัน โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 ถัง ในน้ำความเค็ม 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม ให้อาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยให้ 4 ครั้ง ในเวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น. มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ และควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 28±1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 4 วัน

เมื่อครบ 14 วัน คัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไมมาคัดเลือกกุ้งที่มีขนาดไล่เลี่ยกันและมีสุขภาพแข็งแรง มาเลี้ยงในถังทดลองขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 21 ถัง แบ่งเป็นชุดการทดลองละ 7 ถัง โดย 4 ถังใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย ส่วนอีก 3 ถัง ใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยจะใส่กุ้งถังละ 35 ตัว ความเค็มของน้ำในถัง 25 พีพีที ควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 28±1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater ดูดตะกอน และระบายของเสียและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 4 วัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปโดยให้ในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ PROMUTASE™ 200 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร ให้อาหารในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ PROMUTASE™ 200 0.02 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร ให้อาหารในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน

การเตรียมอาหารทดลอง ผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่กำหนด โดยเคลือบบนอาหารสำเร็จรูป และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึก ส่วนชุดการทดลองที่ 1 จะเคลือบอาหารสำเร็จรูปด้วยน้ำมันปลาหมึกในปริมาณที่เท่ากับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 จากนั้นผึ่งให้แห้งก่อนจะนำไปให้กุ้งที่ทดลอง 4 เวลา ในเวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เริ่มต้นให้อาหารในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวันหลังจากนั้นในระหว่างการทดลองจะมีการปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้งที่มีขนาดโตขึ้น ตามวิธีของ ชลอ และพรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงนาน 50 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกวัน

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

สุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งและบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ในวันที่ 0, 10, 20, 30, 40 และสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ระหว่างทำการทดลองมีการเก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ ได้แก่ ความเค็ม พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเป็นด่าง ความกระด้าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ ตามวิธีของ APHA *et al*. (1995)

6. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลอง โดยสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 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 PROMUTASE™ 200 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity) และ การผลิตเอนไซม์ SOD (superoxide dismutase activity) ตามวิธีดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

6.1.1 ดูดเลือดจากแอ่งเลือด โดยในหลอดฉีดยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

6.1.2 ใช้ micropipette ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

6.1.3 คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็น จำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร โดยหาค่าได้จาก

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง x ยาว x สูง
= 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร
= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

6.2 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543)

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 เดี่ยวละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอ สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้น ๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08 - 0.1 ซึ่งจะมีแบคทีเรียประมาณ 10^6-10^7 CFU/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2.3 เจาะเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด โดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกุ้ง 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 ในระดับ 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 โดยใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าของการเจือจาง ซีรัม ที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

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

6.3.1 เจาะเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้หลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (เลือดกุ้ง : anticoagulant) 1:2 โดยดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3.3 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

6.3.4 ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และ ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.3.5 นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตร และสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

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 Wright stain 5 นาที

6.3.14 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3.15 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

6.3.16 ปิดสไลด์ด้วย permout

นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เพื่อคำนวณค่าร้อยละของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% phagocytosis) = $\frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$

6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543)

6.4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว 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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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 โดยใช้ชุดวิเคราะห์โปรตีนสำเร็จรูป Bio RAD Protein Assay นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยคำนวณหาค่าดังนี้

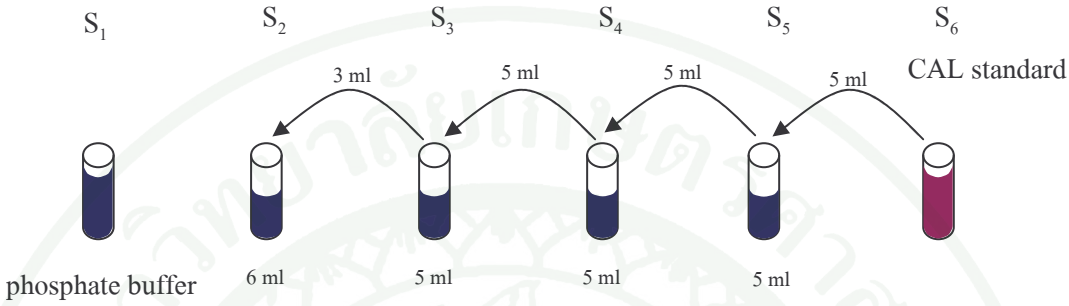
1 หน่วยของฟีนอลออกซิเดส $= \triangle OD_{490}$/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน

6.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

ทำการศึกษาโดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD@ superoxide dismutase โดยเตรียมชุดมาตรฐานใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ SOD ในตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD[@] superoxide dismutase

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 SOD ในตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้ง

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

2. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ

4. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง (ทำซ้ำข้อ 3-4) นำสารละลายละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง

6. ละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

7. นำสารละลายเม็ดเลือดที่เตรียมได้ 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 โดยคำนวณหาค่าดังนี้

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

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

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

7. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 50 วัน นำกุ้งทุกชุดการทดลองมาศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1 ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 3 วัน ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยการใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

7.2 ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีแบคทีเรียประมาณ 7.6×10^6 CFU/มิลลิลิตร เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

7.3 ฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งชุดการทดลองทุกตัว โดยฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุมซึ่งใส่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ จำนวน 1 ตู้ ใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อในปริมาณและตำแหน่งเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 (เพื่อเปรียบเทียบระหว่างทำการทดลองว่ากุ้งในทุกชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการฉีด)ให้อาหารสำเร็จรูปปกติที่ไม่มีการผสม PROMUTASE™ 200 แก่กุ้งในทุกชุดการทดลองหลังจากการฉีดเชื้อในปริมาณที่น้อยกว่าการเลี้ยงกุ้งปกติ เนื่องจากในระยะแรกกุ้งบางตัวยังกินอาหารจนกระทั่งเมื่อแสดงอาการป่วยที่ชัดเจนจะไม่กินอาหาร

7.4 จดบันทึกการตายของกุ้งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.01 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ชุด ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ SOD ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน หลังจากการเลี้ยง ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งจะวิเคราะห์ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน หลังจากการเลี้ยง ส่วนอัตราการรอดตายของกุ้งหลังจากฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* นั้นจะบันทึกที่เวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 – ตุลาคม พ.ศ. 2552

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การศึกษาผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา ที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับต่างกัน

หลังจากให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 เป็นเวลา 60 วัน แก่ลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 3 กลุ่มการทดลองคือ กลุ่มที่ 1 เป็นลูกกุ้งที่ให้อาหารควบคุม คืออาหารสำเร็จรูปปกติ กลุ่มที่ 2 ลูกกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม และกลุ่มที่ 3 เป็นลูกกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ PROMUTASE™ 200ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม น้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการรอดตายของกุ้งในทุกกลุ่มการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

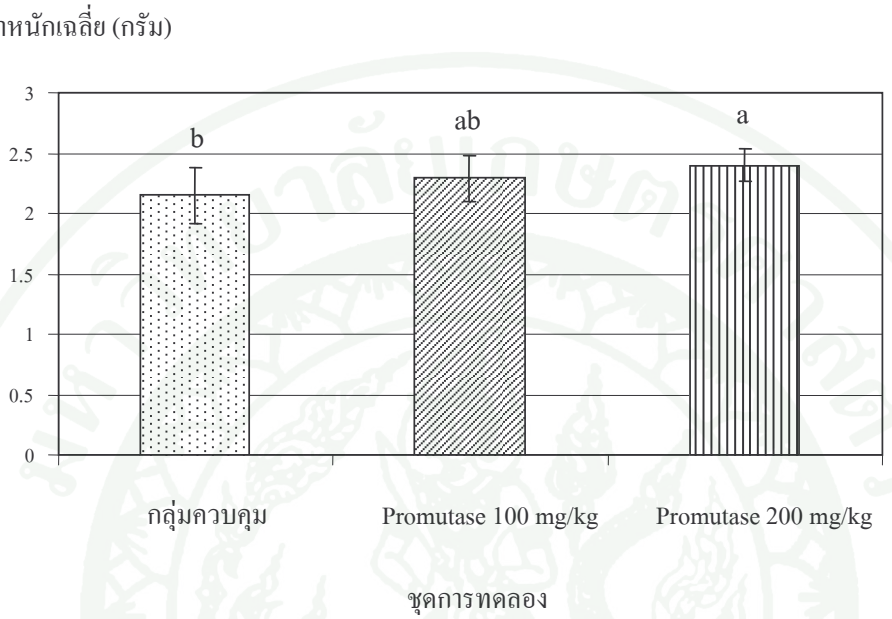
ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
กลุ่มควบคุม	2.15 ± 0.23^{b}	76.50 ± 5.51^{b}
Promutase 100 mg/kg	2.29 ± 0.19^{ab}	81.00 ± 2.58^{b}
Promutase 200 mg/kg	2.40 ± 0.13^{a}	92.00 ± 2.83^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากการเลี้ยง 60 วัน กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ PROMUTASE™ 200ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุด โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.40 ± 0.13 กรัม ซึ่งมากกว่ากลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.29 ± 0.19 และ 2.15 ± 0.23 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตามลำดับ แต่น้ำหนักเฉลี่ยระหว่างกุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม น้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4)

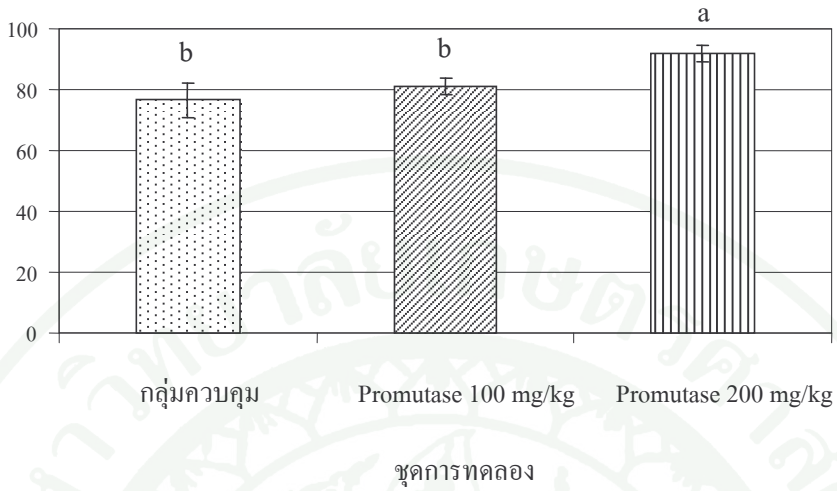


ภาพที่ 4 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากการเลี้ยง 60 วัน กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ PROMUTASE™ 200ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัมมีอัตรารอดตายเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 92.00 ± 2.83 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างนี้นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมโดยมีอัตรารอดตายเฉลี่ย 81.00 ± 2.58 และ 76.50 ± 5.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5) เนื่องจาก PROMUTASE™ 200 มีสาร superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ต่อต้านอนุมูลอิสระที่จำเป็นในสิ่งมีชีวิตในการต่อต้านผล oxidative ของอนุมูลอิสระช่วยลดความเครียดในกุ้งเมื่อเกิดการเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมเช่น การเปลี่ยนถ่ายน้ำ เป็นต้น และสารนี้จะไปช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันบางชนิดทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตดีส่งผลให้กุ้งมีน้ำหนักตัวเพิ่ม มีอัตราการรอดตายที่สูงขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

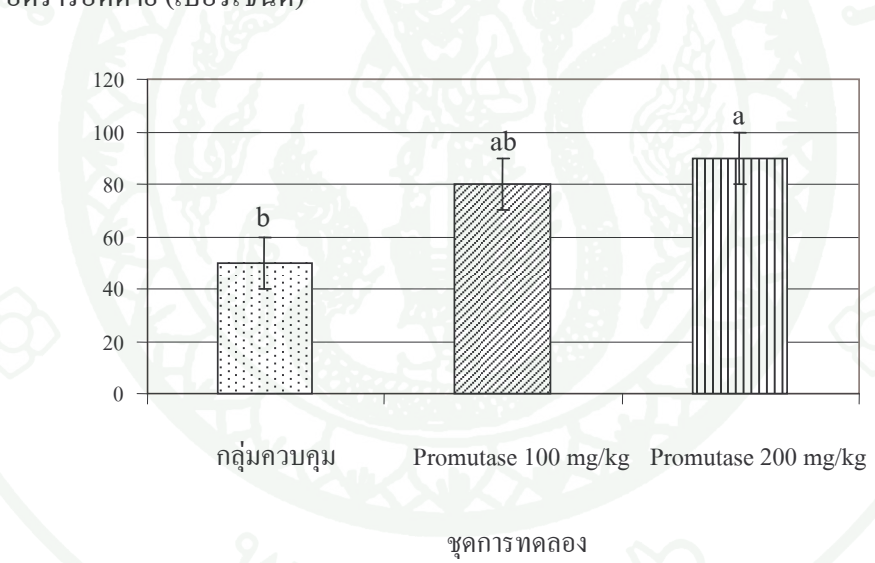
หลังจากให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 แก่กุ้งขาวแวนนาไม ทั้ง 3 ชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 60 วันแล้วฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งมีปริมาณเชื้อ เท่ากับ 3.17×10^6 CFU/มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้านหลังตัวกุ้ง (ภาพที่ 7) บันทึกอัตราการรอดตายเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 และ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันมีอัตรารอดตายเฉลี่ยเท่ากับ 80.00 ± 10.00 และ 90.00 ± 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างอย่างนี้นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุมที่มีอัตรารอดตายเฉลี่ย 50.00 ± 10.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 3.17×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กลุ่มการทดลอง	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
กลุ่มควบคุม	50.00 ± 10.00^{b}
Promutase 100 mg/kg	80.00 ± 10.00^{ab}
Promutase 200 mg/kg	90.00 ± 10.00^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

จากการทดลอง พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ทำให้เกิดการติดโรคโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ปริมาณ 3.17×10^6 CFU/ มิลลิลิตร เข้าไปบริเวณกล้ามเนื้อของลำตัว (ภาพที่ 7) ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ป่วยจะมีสีที่เข้มขึ้น ลำตัวของกุ้งสกปรก มีตะกอนบริเวณขาว่ายน้ำและตามผิวตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งที่ป่วยและตายในเวลาต่อมาสามารถมองเห็นการเรืองแสงของกุ้งในตอนกลางคืน โดยเฉพาะกุ้งในกลุ่มควบคุม

ภาพที่ 7 การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

ผลการศึกษาคุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม การนำไฟฟ้า ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ แสดงไว้ในตารางที่ 4 พบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกชุดการทดลองอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ และพรเลิศ , 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ PROMUTASE™ 200 ในระดับต่างกัน

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง					
		ชุดควบคุม		Promutase 100 mg/kg		Promutase 200 mg/kg	
		พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	เช้า	28.7-30.5	29.7±0.5 [a]	28.4-29.7	28.6±0.1 [a]	28.4-30.5	29.7±0.7 [a]
	บ่าย	30.3-33.1	31.5±1.1 [a]	28.2-31.6	29.8±1.3 [a]	29.5-31.8	30.6±0.7 [a]
พีเอช	เช้า	8.2-8.4	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)	เช้า	7.4-8.6	7.8±0.5 [a]	7.1-8.8	7.5±1.2 [a]	7.3-8.9	7.8±0.5 [a]
	บ่าย	7.2-8.7	8.1±0.5 [a]	7.2-8.7	8.2±0.4 [a]	7.2-8.9	8.2±0.4 [a]
ความเค็ม (พีพีที)		25.4-26.5	25.3±0.5 [a]	25.1-26.4	25.4±0.5 [a]	25.4-26.7	25.9±0.3 [a]
การนำไฟฟ้า (มิลลิซิเมนต์ต่อเซนติเมตร)		40.8-47.3	41.1±1.4 [a]	37.3-42.2	39.7±0.4 [a]	39.6-42.7	41.9±1.2 [a]
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		83.7-148.2	97.8±28.0 [a]	89.7-129.7	98.9±13.4 [a]	94.2-127.3	96.9±15.0 [a]
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		4384.2-5835.3	5134.5±1338.5 [a]	4436.0-5832.2	5122.0±1143.2 [a]	4256.5-5942.4	5006.1±1331.2 [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 ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลของสาร PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ที่ระดับต่างกัน

2.1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการเลี้ยง แสดงไว้ในตารางที่ 5 และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน

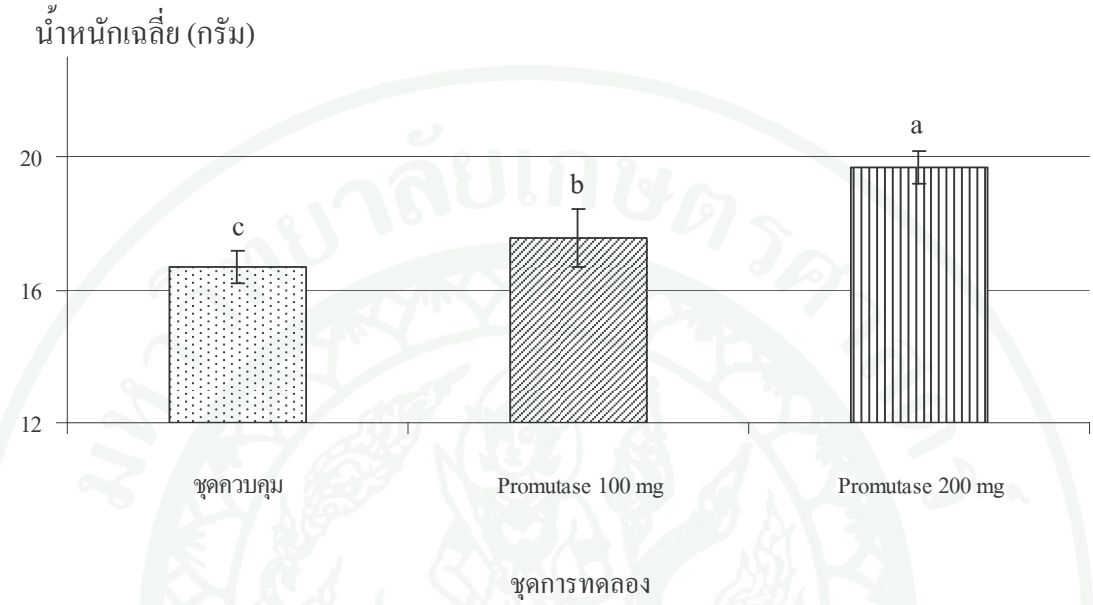
เวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	8.89±0.93[a]	8.89±0.93[a]	8.89±0.78[a]
10	9.78±0.67[b]	10.56±0.53[ab]	10.22±0.67[a]
20	11.44±0.88[b]	11.89±0.78[ab]	12.44±0.73[a]
30	13.22±0.97[b]	14.00±0.71[b]	15.11±0.78[a]
40	15.67±0.71[b]	16.78±0.67[a]	17.33±0.87[a]
50	16.67±0.50[c]	17.56±0.88[b]	19.67±0.50[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

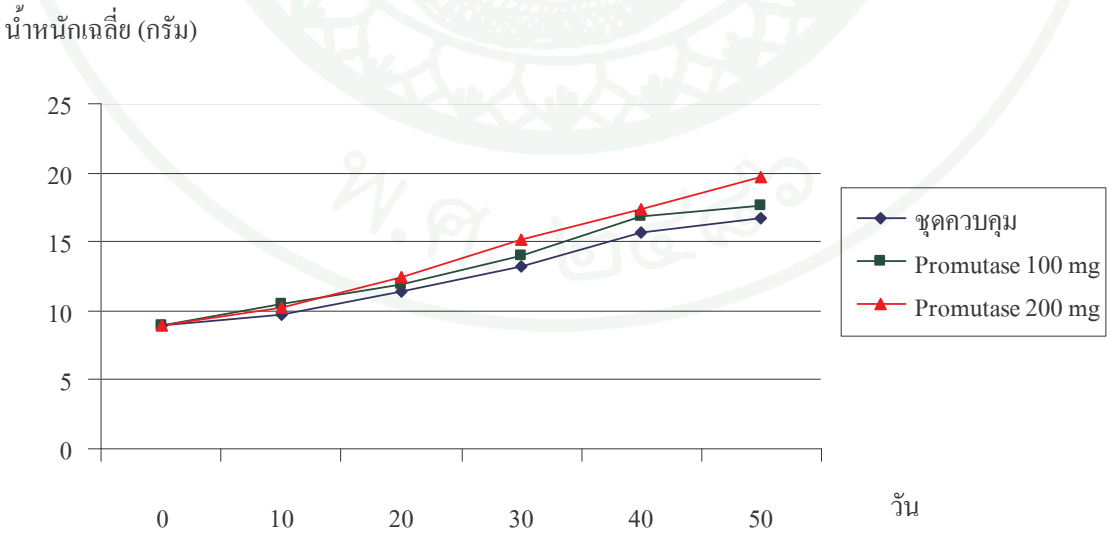
กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ตั้งแต่วันที่ 30 เป็นต้นไป ($P<0.05$) หลังจากเลี้ยงนาน 50 วันกุ้งที่ได้รับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ย19.67

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรัม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ย 17.56 กรัมและกลุ่มควบคุม 16.67 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 8, 9)



ภาพที่ 8 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน



ภาพที่ 9 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะ 0, 20, 35 และ 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

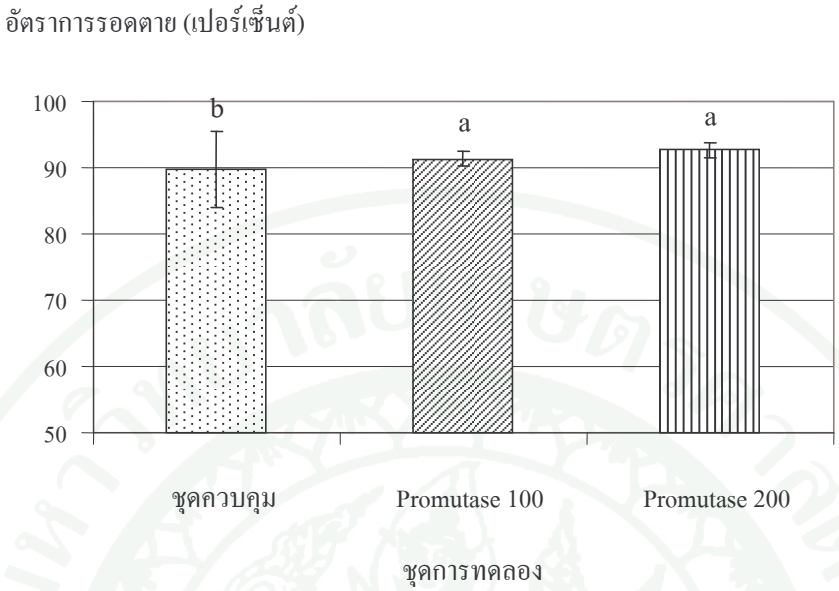
เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 92.67±1.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 91.11±1.92 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย เท่ากับ 85.56±1.92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 10-11)

ตารางที่ 6 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 50 วัน

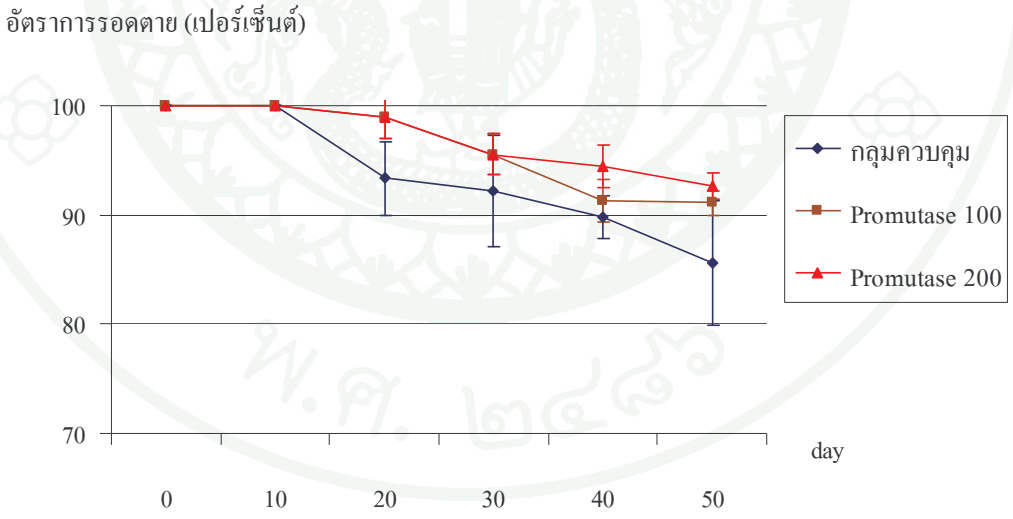
เวลาเลี้ยง (วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	100.00±0[a]	100.00±0[a]	100.00±0[a]
10	100.00±0[a]	100.00±0[a]	100.00±0[a]
20	93.33±3.33[b]	98.89±1.92[a]	98.89±1.92[a]
30	92.22±5.09[a]	95.56±1.92[a]	95.56±1.92[a]
40	89.78±5.67[b]	91.33±1.15[a]	94.44±1.92[a]
50	85.56±1.92[b]	91.11±1.92[a]	92.67±1.15[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน



ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ระยะ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200, 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ในระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ SOD ในระหว่างการทดลองมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 28±1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater รักษาระดับพีเอชของน้ำที่ 7.8 – 8.0 และความเค็มของน้ำ 25 พีพีที

1. ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

กุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากลุ่มที่ให้ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุม ตั้งแต่วันที่ 10 จนสิ้นสุดการทดลองที่ 50 วัน ($P<0.05$) โดยในวันที่ 10 จะ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ $2.49 \pm 0.98 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วน PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย เท่ากับ $1.84 \pm 0.99 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง ที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ $1.60 \pm 0.98 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงจนถึงระยะเวลาที่ 50 วัน พบว่ากุ้งที่ให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ $6.13 \pm 1.13 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ $5.01 \pm 1.30 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง ที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ $3.26 \pm 1.94 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร(ตารางที่ 7 และภาพที่ 12)

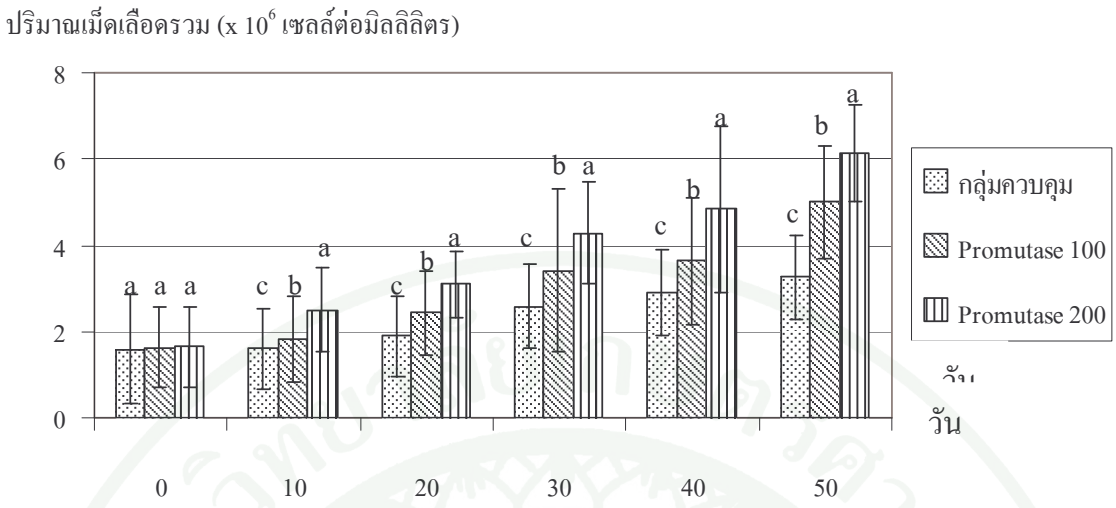
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	THC (x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	1.59±1.27[a]	1.63±0.92[a]	1.65±0.93[a]
10	1.60±0.98[c]	1.84±0.99[b]	2.49±0.98[a]
20	1.90±0.90[c]	2.44±0.97[b]	3.10+0.77[a]
30	2.58±1.07[c]	3.40±1.89[b]	4.28±1.19[a]
40	2.90±1.31[c]	3.63±1.46[b]	4.84±1.93[a]
50	3.26±1.94[c]	5.01±1.30[b]	6.13±1.13[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

2. กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

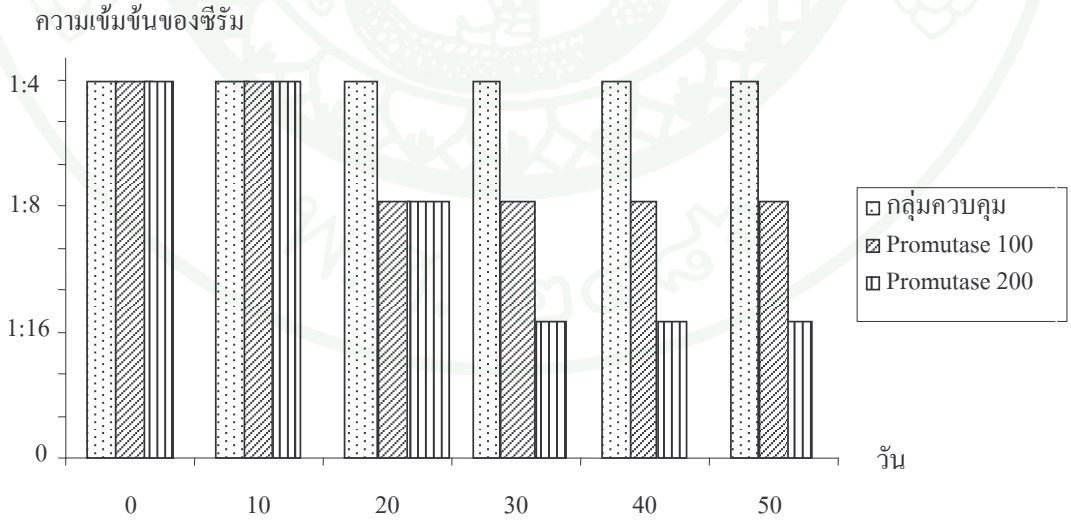
กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100, 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม เมื่อทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่ามีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 1 : 4 ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 1 : 16 แตกต่างกับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งมีอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ คือ 1 : 4 และ 1 : 8 ตามลำดับ โดยค่าอัตราส่วนการเจือจางดังกล่าวจะไม่เปลี่ยนแปลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 50 วัน (ตารางที่ 8, ภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม หลังได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	1:4	1:4	1:4
10	1:4	1:4	1:4
20	1:4	1:8	1:8
30	1:4	1:8	1:16
40	1:4	1:8	1:16
50	1:4	1:8	1:16

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 13 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง

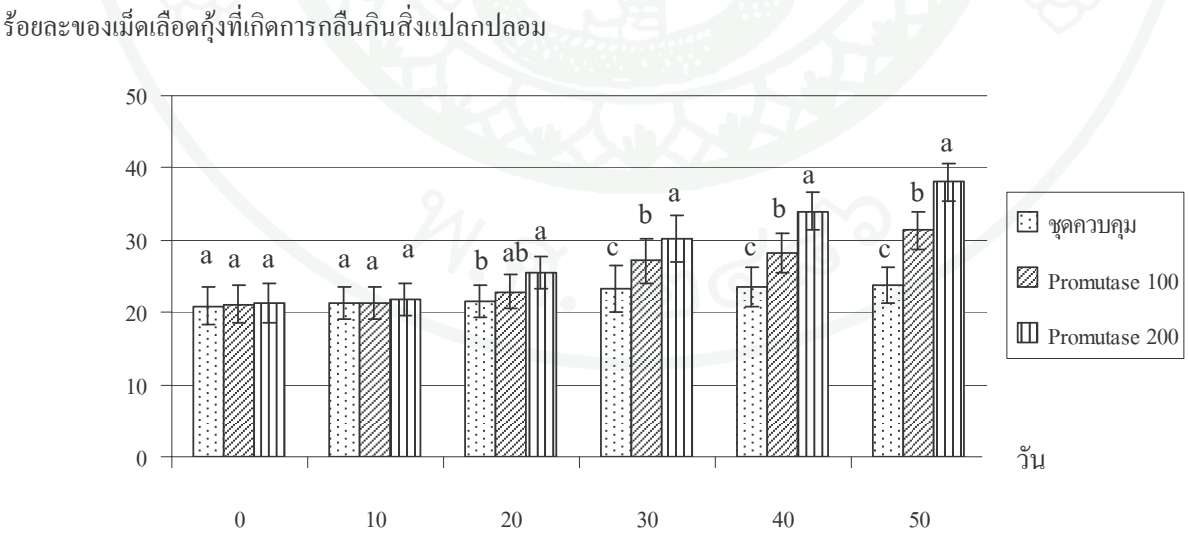
การตรวจสอบกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากการเลี้ยงในวันที่ 10 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ต่อกัน แต่หลังจากเลี้ยงกุ้งจนถึงระยะเวลา 20 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งสูงสุด เท่ากับ 25.56$\pm$3.43 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง เท่ากับ 22.89$\pm$2.85 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งมีค่า เท่ากับ 21.56$\pm$1.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งสูงสุด โดยมีค่า เท่ากับ 30.22$\pm$2.73 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง เท่ากับ 27.11$\pm$2.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุม ซึ่งให้อาหารปกติพบเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งต่ำที่สุด เท่ากับ 23.33$\pm$3.16 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 (ตารางที่ 9 และภาพที่ 14)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	20.89±2.67[a]	21.11±2.26[a]	21.33±2.24[a]
10	21.33±3.16[a]	21.33±2.65[a]	21.78±2.54[a]
20	21.56±1.94[b]	22.89±2.85[ab]	25.56+3.43[a]
30	23.33±3.16[c]	27.11±2.67[b]	30.22±2.73[a]
40	23.56±2.79[c]	28.22±2.73[b]	34.00±2.83[a]
50	23.78±2.73[c]	31.33±3.74[b]	38.00±2.45[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 14 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 10 วัน กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100, 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 334.18±13.23 และ 341.92±3.35 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมที่มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 300.18±1.58 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 10 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

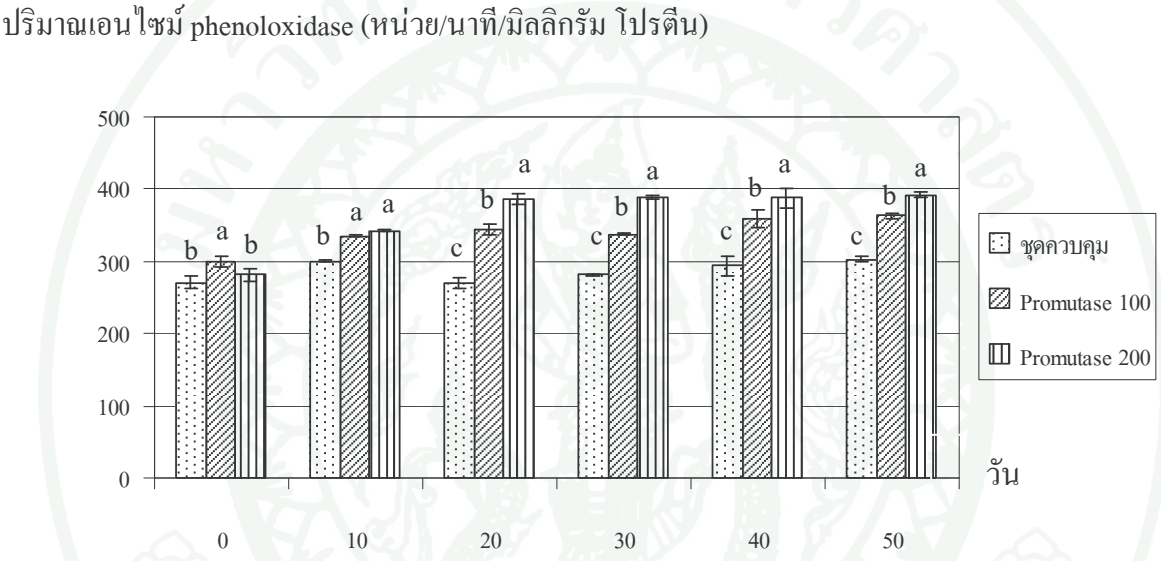
เวลาเลี้ยง (วัน)	Phenoloxidase activity หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	270.74±7.80^{b}	300.22±1.25^{a}	280.96±7.38^{b}
10	300.18±1.58^{b}	334.18±13.23^{a}	341.92±3.35^{a}
20	270.06±6.70^{c}	344.50±4.55^{b}	385.83±4.51^{a}
30	281.83±4.14^{c}	337.70±6.70^{b}	388.59±1.51^{a}
40	293.81±5.54^{c}	358.53±9.67^{b}	388.13±5.14^{a}
50	302.52±2.97^{c}	363.02±6.44^{b}	392.31±2.64^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุด เท่ากับ 385.83±4.51 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมและชุดควบคุมซึ่งมีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

344.50±4.55 และ 270.06±6.70 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมPROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมมีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุดคือ 392.31±2.64 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ต่างจากชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมและชุดควบคุมซึ่งมีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 363.02±6.44 และ 302.52±2.97 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

5. การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 42.23±5.69 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม และชุดควบคุมซึ่งมีค่า 36.39±7.42 และ 30.70±3.68 หน่วย SOD/ มิลลิลิตรตามลำดับ กุ้งเมื่อเลี้ยงจนครบระยะเวลา 50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 64.66±6.26 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร ต่างจากชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมและชุดควบคุมซึ่งมีค่าปริมาณเอนไซม์ SOD คือ 43.23±12.70 และ31.47±2.48 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 16)

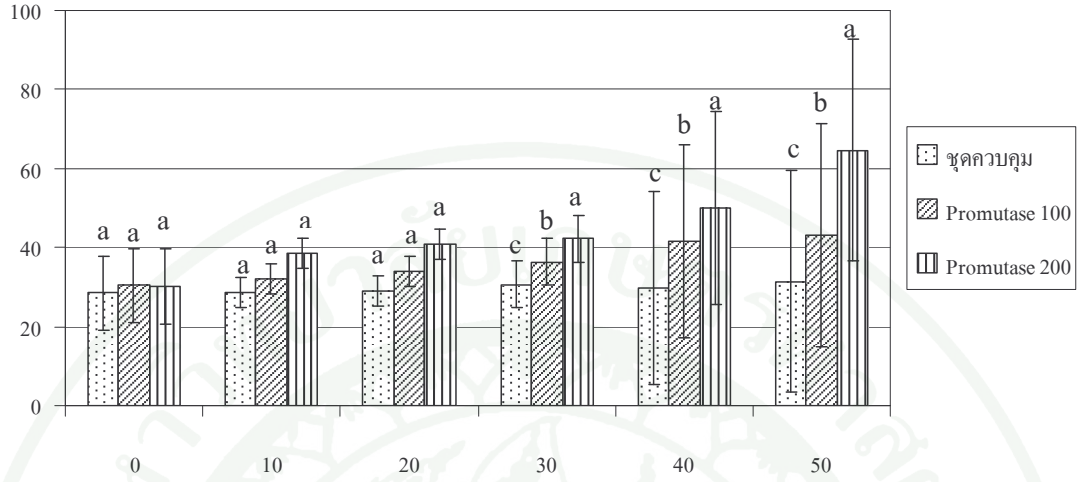
ตารางที่ 11 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase หน่วย SOD/ มิลลิลิตร		
	ชุดควบคุม	Promutase 100 mg/kg	Promutase 200 mg/kg
0	28.53±9.44[a]	30.37±3.85[a]	30.21±3.82[a]
10	28.72±5.91[a]	32.18±24.42[a]	38.46±28.17[a]
20	29.17±26.81[a]	33.92±16.27[a]	40.72+10.77[a]
30	30.70±3.68[c]	36.39±7.42[b]	42.23±5.69[a]
40	29.87±8.91[b]	41.63±11.36[a]	50.13±6.63[a]
50	31.47±2.48[c]	43.23±12.70[b]	64.66±6.26[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร)



ภาพที่ 16 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ สาร PROMUTASE™ 200 ที่ได้รับจากการผสมอาหารและระยะเวลาที่กุ้งได้รับอาหารผสมสาร PROMUTASE™ 200 โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมกับสาร PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 20 วัน มีกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง และปริมาณการผลิต superoxide anion สูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ถ้าเลือกใช้สาร PROMUTASE™ 200ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะต้องใช้ระยะเวลายาวนานขึ้นกว่าการใช้สาร ที่มีปริมาณสูงกว่า โดยต้องให้อาหารเป็นระยะเวลาอย่างน้อยประมาณ 30 วัน จะส่งผลให้กุ้งมีกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด และปริมาณการผลิต superoxide anion สูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

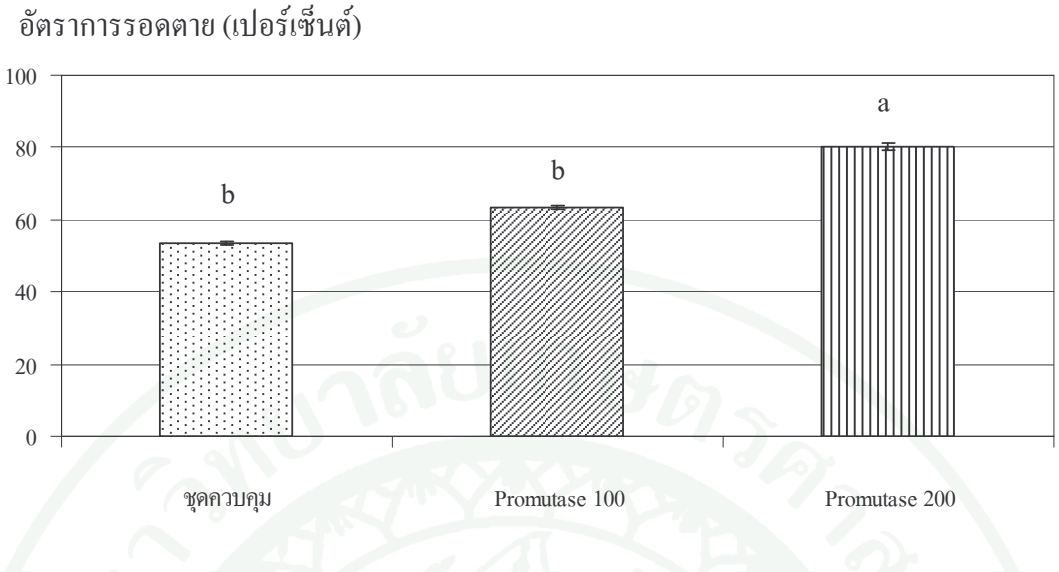
หลังจากให้อาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 แก่กุ้งขาวแวนนาไม ทั้ง 3 ชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 50 วันแล้วทำให้กุ้งทั้งหมดติดเชื้อ โดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อ เท่ากับ 7.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้านหลังตัวกุ้ง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละชุดการทดลอง บันทึกอัตราการรอดตายเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายสูงสุด เท่ากับ 80.00 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมPROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม มีอัตราการรอดตาย เท่ากับ 63.33 ± 0.58 และ 53.33 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 12 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 12 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 7.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	53.33 ± 0.58^{b}
Promutase 100 mg/kg	63.33 ± 0.58^{b}
Promutase 200 mg/kg	80.00 ± 1.00^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร PROMUTASE™ 200 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 50 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

ผลการศึกษาคุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 50 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 13 อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม การนำไฟฟ้า ความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ ในทุกชุดการทดลองอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ PROMUTASE™ 200 ในระดับต่างกัน

คุณสมบัติของน้ำ	ชุดการทดลอง					
	ชุดควบคุม		Promutase 100 mg/kg		Promutase 200 mg/kg	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส) เช้า	28.6-30.7	29.8±0.8 [a]	28.3-29.9	28.9±0.4 [a]	28.5-30.9	29.2±0.7 [a]
บ่าย	30.8-33.5	31.5±0.9 [a]	27.8-31.3	29.3±1.2 [a]	29.4-31.7	30.6±0.9 [a]
พีเอช เช้า	7.9-8.3	8.1±0.2 [a]	7.9-8.3	8.1±0.2 [a]	7.9-8.3	8.1±0.2 [a]
บ่าย	7.9-8.3	8.1±0.2 [a]	7.9-8.3	8.1±0.2 [a]	7.9-8.3	8.1±0.2 [a]
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) เช้า	7.4-8.5	7.8±0.3 [a]	7.1-8.7	7.7±1.0 [a]	7.0-8.8	8.0±0.4 [a]
บ่าย	7.2-8.9	8.2±0.4 [a]	7.3-8.8	8.3±0.6 [a]	7.4-8.9	8.2±0.5 [a]
ความเค็ม (พีพีที)	25.3-27.0	25.5±0.4 [a]	25.0-26.8	25.3±0.6 [a]	25.5-26.4	25.7±0.3 [a]
การนำไฟฟ้า (มิลลิซิเมนต์ต่อเซนติเมตร)	38.8-45.6	43.1±1.6 [a]	40.3-42.5	39.4±0.4 [a]	39.5-43.5	40.6±1.0 [a]
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	94.4-136.5	98.4±12.0 [a]	90.7-131.7	95.4±11.5 [a]	94.6-129.7	91.56±13.0 [a]
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4142.2-5822.5	4320.3±1449.5 [a]	4274.0-5725.4	5144.0±1063.2 [a]	4342.5-5814.7	5203.1±1209.2 [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 ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

จากการศึกษาการใช้ PROMUTASE™ 200 เป็นสารเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองในลูกกุ้งระยะโพสลาร์วาพบว่ากุ้งที่ให้ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม มีการเจริญเติบโตดีที่สุดมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่ให้ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม และอัตราการรอดตายของกุ้งที่ให้ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม สูงกว่าชุดควบคุม และกลุ่มที่ใช้ PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม เนื่องจาก PROMUTASE™ 200 มี superoxide dismutase เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสารนี้จะช่วยลดความเครียดและต่อต้านอนุมูลอิสระช่วยให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรงทนต่อโรคและสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี และพบว่าสาร SOD สามารถช่วยเพิ่มอัตราการฟักตัวของลูกกุ้งได้ดีขึ้นและช่วยลดอัตราการตายจากการขนส่งกุ้งได้ดี (Campa-Córdova *et al*., 2005)

จากการศึกษาถึงระดับที่เหมาะสมในการใช้ PROMUTASE™ 200 เพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน โดยมีการประเมินจากองค์ประกอบต่างๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่าการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันมีความสัมพันธ์กับระดับของการให้ PROMUTASE™ 200 ผสมลงในอาหารที่เพิ่มขึ้นกล่าวคือ กุ้งขาวแวนนาไมที่มีการได้รับอาหารผสมกับ PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีผลทำให้การเพิ่มของระดับภูมิคุ้มกันและความต้านทานต่อ *V. harveyi* สูงที่สุด ซึ่งแตกต่างไปจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ PROMUTASE™ 200 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

และจากผลการศึกษาประสิทธิภาพของ PROMUTASE™ 200 ในครั้งนี้พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 20 วันปริมาณเม็ดเลือดรวมและกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นและนอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งและปริมาณการผลิต superoxide anion จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกุ้งได้รับอาหารที่ผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมในระยะเวลา 30 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภูมิคุ้มกันก็จะสูงขึ้น (พรรณวไล, 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำก็จะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้ดีด้วย (Vargas-Albores *et al.,* 1998) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ phenoloxidase (ทวีศักดิ์, 2547) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง และการผลิตเอนไซม์ SOD (สมบัติ, 2542) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ทำให้กุ้งสามารถต่อต้านกับเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Lalles *et al* .(2006) ซึ่งทดลองใช้สารสกัดจากเมลอนที่มี SOD เพื่อกระตุ้น SOD ใน พลาสมา และการป้องกันการเกิดความเครียดจากการหย่านมในลูกหมู โดยมีการให้อาหารผสม PROMUTASE™ 200 ในอัตรา 5 กรัม และ 20 กรัม ต่ออาหาร 1 ตัน ผลการทดลองพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ SOD ในพลาสมาและมีส่วนช่วยในการป้องกันความเครียดในลูกหมูระยะหย่านม

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสาร PROMUTASE™ 200 มีประสิทธิภาพในการช่วยเสริมการเจริญเติบโต การรอดตาย การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ในระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยเฉพาะช่วงเวลาที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมเช่น มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและคุณสมบัติของน้ำบางพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการกินอาหารหรือสุขภาพโดยรวมของกุ้ง ซึ่งการเพิ่มหรือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและลดความเครียดของกุ้งได้ จะทำให้โอกาสที่กุ้งจะป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียลดลงด้วย นอกจากนั้นการใช้ PROMUTASE™ 200 ยังเป็นการป้องกันโรคและลดการใช้ยาปฏิชีวนะได้ด้วยซึ่งจะทำให้การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นทั้งในด้านการผลิตและคุณภาพสำหรับการบริโภคทั้งในประเทศและเพื่อการส่งออกไปต่างประเทศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การทดลองเพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของ PROMUTASE™ 200 ที่ใช้ในการผสมอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตอัตราการรอดตายและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยผลการทดลองสรุปได้ว่า การเสริม PROMUTASE™ 200 ในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กับกุ้งขาวแวนนาไม มีส่วนช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หลังจากกุ้งได้รับอาหารเป็นเวลา 20 วัน

2. PROMUTASE™ 200 ที่ผสมลงในอาหารปริมาณ 200 มิลลิกรัมและ 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้กุ้งรอดตายจากแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มี PROMUTASE™ 200

3. อาหารที่มีการเสริมด้วย PROMUTASE™ 200 ด้วยระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จะส่งผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน ความเข้มข้นของ PROMUTASE™ 200 ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับของภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เพิ่มขึ้นด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงผลของ PROMUTASE™ 200 ต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในระดับฟาร์ม โดยผสมกับอาหารสำเร็จรูปมาจากโรงงาน เพื่อความสะดวกในการใช้สำหรับเกษตรกร

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ PROMUTASE™ 200 ผสมลงในอาหารสำเร็จรูปแก่สัตว์น้ำเพื่อความเหมาะสมในด้านต้นทุนการผลิต และผลตอบแทนที่ได้รับจากการใช้ระดับฟาร์ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

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

จรีพร เรืองศรี และ กิจการ ศุภมาตย์. 2530. **การศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ.** รายงานการวิจัย. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

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

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. **กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม**. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์. กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. **ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดารุณี แซ่อุ่ย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และ ลิลา เรืองแป้น. 2530. ***Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*).** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/30. ฝ่ายทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 11 น.

พชรวดี เลาหะมงคลรักษ์. 2549. **การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

พรเลิศ จันทร์รัชกูล, นภดล ศุกระกาญจน์ และสัมพันธ์ ปานจรัตน์. 2541. ผลของ β-1, 3-Glucan ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immune response) ของกุ้งกุลาดำ. น. 43-52. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

พุทธ ส่องแสงจินดา และ ดุสิต ตันวิไลย. 2534. การแพร่กระจายและการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนละลายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา. **เอกสารวิชาการ**ฉบับที่ 1/2534. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, สงขลา.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2536. **การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. 2549. **การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวิทย์ ชีวาพร. 2531. คุณภาพน้ำ-ดินในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ,น. 171-182. *ใน* **การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, ชลบุรี.

วิทยา รัตนะ. 2549. **ผลระดับความเค็มต่ำและองค์ประกอบของธาตุในน้ำที่มีต่อการเจริญเติบโต**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และอัตรารอดตายของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2543. **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

สิทธิชัย ตันธนะสฤษดิ์. 2549. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ.** ภาควิชาอนุรักษวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมเจตน์ จันทวัฒน์ ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา จงรัก จันทร์เจริญสุข วิโรจน์ อิ่มพิทักษ์และ อัญชลี สุทธิปราการ. 2529. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น.** คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2546. **ระเบียบและการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามตามมาตรฐาน จี เอ พี พ.ศ.2546.** สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. กรุงเทพฯ.

อัจฉริยา ไสลสูต และ คมกฤช เทียนคำ. 2545. **พยาธิวิทยาภูมิคุ้มกัน.** *ใน* พยาธิวิทยาทั่วไปทางสัตว์แพทย์. หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. **การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

Austin, B. and D.A. Austin. 1987. **Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish.** Ellis Horwood, Chichester.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Bachere, E., E. Mialhe and J. Rodriguez. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. **Fish & Shellfish Immunol**. 5: 597-612.

Bauchau, A.G. 1981. Crustacean, pp. 385-420. *In* N.A. Ratcliffe, and A.F. Rowley, eds. **Invertebrate Blood Cell**. Academic Press**,** London. 385-420.

Boyd, C.E. 1982. **Water Quality Management for Pond Fish Culture**. Elsevier Sci Pulb. CO., Amsterdam

Boyd, C.E. and A. W. Fast. 1992. Pond monitoring and management, pp. 497-513. *In* A.W.Fast and L.J. Lester (eds). **Marine Shrimp Culture.** Principles and Practices. Elsevier Science B.V.,Amsterdam.

Boyd, C.E. 1982. and C.S. Tucker. 1998. **Pond Aquaculture Water Quality Management.** Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.

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.

Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei*.** Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Brouwer M., T.H. Brouwer, W. Grater and N.B. Brown-Peterson. 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. **J. Biol. Chem**. 374: 28-219

Bunker, V.W. 1992. Free radicals, antioxidants and aging**. Med. Lab. Science.** 49: 299- 312.

Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavedra, and F. Ascencio. 2005. Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. **Ciencias Marinas** 3: 661-669.

Hirono, Y. and M. Leslie. 1992. Shrimp culture industry in Ecuadore, pp. 783-815. *In* A.W. Fast and L.J. Lester, eds. **Marine Shrimp Culture Principles and Practices.** Elsevier Amsterdam, London, New York, Tokyo.

Holmblad, T. and K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture** 172: 111-123.

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.

Ji, L.L. 1995. Oxidative stress during exercise: Implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Bio. Med.** 18: 1079-1086.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kungvankij, P., P. T.W. Chua, J. Pudadera, G. Corres, L.B. Tibo, Io. Potestas, G.A. Taleona and KN.Paw. 1986. Shrimp culture: pond design operation and management. p 68. *In* **Asia (NACA), Region Lead Center in Philippines (RLCP).** Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Network of Aquaculture Center. Iloilo, Philippines.

Lackie, A.M. 1986. **Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors.** Clarendon Press, Oxford.

Lalles, J.P., J.C David, M.A Milesi, D. Lacan and C. Yard. 2006. **Effect of A SOD-Containing Mel on Extract on the Increase of Plasma SOD Activity and the Prevention of Oxidative Stress Linked to Weaning in Piglets**. SEPPIC.

Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.

Lawson,T.B. 1995. **Fundamentals of Aquaculture Engineering.** Chapman and Hall, New York.

Lester, L.J. 1992. Overview of shrimp farming in the western hemisphere, pp. 771-782. *In* A.W. Fast and L.J. Lester, eds. **Marine Shrimp Culture Principles and Practices.** Elsevier Amsterdam, London, New York, Tokyo.

Lin, Y.C. and J.C. Chen. 2000. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. **Aquaculture** 259: 109-119.

Liu C.H., W. Cheng, J.P. Hsu and J.C. Chen. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Dis. Aquat. Org**. 61: 74-169.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Martin, G.G. and L. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. **J. Morphol.** 185: 339-348.

McGraw, W.J. and J. Scarpa. 2002. Determining ion concentrations *for Litopenaeus vannamei* culture in freshwater. **Global Aqua. Advocate** 5: 36-38.

Mohney, L.L., D.V. Lightner and T.A. Bell. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian Pondrared *Penaeus vannamei* Boon (Crustacean: Decapoda). **J. World Aqua. Soc.** 25: 116-125

Moller, P., H. Wallin and L.E. Knudsen. 1996. Oxidative stress associated with exercise psychological stress and life-style factors. **Chemico-Biological Interactions.** 102:17-36.

Moullac, G.L., C. Soyez, D. Sauliner, D. Ansqner, 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.

Noga, E. J., T.A. Arroll and Z. Fan. 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. **Fish & Shellfish Immunol.** 6: 403-412.

Ponce-Palafox, J., Martinez- Palacios, C.A. and L.G. Ross. 1997. The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture** 157: 107-115.

Poss, S.G. 1998. **Non-indigenous Species in the Gulf of Mexico Ecosystem**. A Cooperative Program Between the Gulf of Mexico Program and the Gulf Coast Research Laboratory Museum , The University of Southern Mississippi.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Prayitno, S.B. and J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture** 132: 105-112.

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.

Rosenberry, B. 1993. World Shrimp Farming 1993. **Aquaculture Digest**, December 1993.

Saulnier D, P. Haffner, C. Goarant, P. Levy and D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review**. Aquaculture** 191: 44-133.

Schemetter, G., C.P. Wolk and J. Elhai. 1986. Expression of luciferase gram *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* in filamentous cyanobacteria. **J. Bacteriol.** 167: 411-414.

Smith, V. J. and J.R.S Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunol.** 2 (1): 1-31.

Smith, V. and K. Söderhäll. 1986. Cellular immune mecahanism in the crustacean. **Symposium of the Zoological Society of London**. 56: 59-79.

Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis**. 2: 3-23.

Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol**. 7: 229–239.

Soowannayan C., TW. Flegel, P. Sithigorngul, J. Slater, A. Hyatt and S. Cramerri. 2003 Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. **Dis. Aquat. Org**. 57:193–200.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Sritunyalucksana, K. and K. Söderhäll. 2000. The proPo and clotting system in crustacean. **Aquaculture** 191: 53-69.

Urso, M.L. and P.M. Clarkson. 2003. Oxidative stress exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology.** 189: 41-54.

Vargas- Albores, F., F. Jiménez-Vega and K. Söderhäll. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhance the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 299-306.

Vargas-Albores, F., P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark and F. Magallon-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp. *Penaeus californiensis* Holmes, phenoloxidase system. **Aquaculture** 29(8): 549-553.

Wyban, J., W.A. Walsh and D.M. Godin. 1995**.** Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 138: 267-279.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารเคมี

1. ส่วนผสม K-199 (อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด) จำนวน 100 มิลลิลิตร

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน	50 มิลลิลิตร
Salt mixture	10 มิลลิลิตร
NaCl	10 มิลลิลิตร
$CaCl_2 . 2H_2O$	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 $NaHCO_3$ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.2 Salt mixture ปริมาตร10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

KCl	0.4 กรัม
$MgCl . 6 H_2O$	3.3 กรัม
$MgSO_4 . 7 H_2O$	3.0 กรัม
$NaH_2PO_4 . 2 H_2O$	0.05 กรัม

จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2 . 2 H_2O$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย $CaCl_2 . 2 H_2O$ 0.9 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

L-glutamine 0.015 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.6 Hepes จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cystein จำนวน 5 กรัม

วิธีการเตรียม K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร คือนำสารละลายจากข้อ 1- 7 ผสมกันตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6 หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรใน Laminar flow หรือบริเวณ steriled ก็ได้

2. Shrimp saline

NaCl	28.4	กรัม
$MgCl_2 .6H_2O$	1.0	กรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	2.0	กรัม
$CaCl_2 .2H_2O$	2.25	กรัม
KCl	0.7	กรัม
Glucose (Dextrose)	1.0	กรัม
Hepes	2.38	กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตรในขวดที่ผ่านการ autoclave และอบให้แห้ง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker’s yeast

0.9% NaCl

shrimp saline

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการเตรียมคือ นำ Baker's yeast ละลายใน 0.9% NaCl จากนั้นต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ (อาจใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) จากนั้นทำการล้าง yeast ด้วย shrimp saline ที่ 3,000 rpm. 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที โดยใช้ shrimp saline : yeast อัตราส่วน 1 : 1 หลังจากนั้นละลายด้วย shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 5 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์