ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง — **สาขา**

ชีววิทยาประมง — **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

Effects of Dissolved Oxygen, Ammonia and pH Levels on Feed Intake, Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristic of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vanna*mei) and Challenged with *Vibrio harveyi*

นามผู้วิจัย นางสาวทัศนีย์ นลวชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก (รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา (รองศาสตราจารย์อนงค์ จีรภัทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

Effects of Dissolved Oxygen, Ammonia and pH Levels on Feed Intake, Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristic of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Challenged with *Vibrio harveyi*

โดย

นางสาวทัศนีย์ นลวชัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทัศนีย์ นลวชัย 2555: ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. 129 หน้า

การศึกษาผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ ศึกษาการกินอาหารของกุ้งโดยเลี้ยงกุ้ง 10 ตัว (6-8 กรัม) ในตู้กระจกปริมาตร 100 ลิตร (ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 29±1 องศาเซลเซียส) สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันจะเลี้ยงกุ้ง 30 ตัว (6-8 กรัม) ในถังไฟเบอร์กลาสปริมาตร 500 ลิตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปกับกุ้ง 4 มื้อต่อวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ในการทดลองที่หนึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ให้อยู่ในระดับสูงกว่า 4 (ชุดการทดลองที่ 1), อยู่ระหว่าง 2-4 (ชุดการทดลองที่ 2) และต่ำกว่า 2 (ชุดการทดลองที่ 3) มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 3 หลังจากกุ้งกินอาหาร 30 นาที มีปริมาณอาหารเหลือสูงที่สุดที่ 73.31±3.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 (2.60±3.31 เปอร์เซ็นต์) และ 2 (13.22±5.67 เปอร์เซ็นต์) หลังจากการเลี้ยง 60 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีน้ำหนักเฉลี่ย 28.16±2.77 กรัม สูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 2 (25.01±1.81 กรัม) และ 3 (25.90±2.51 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการรอดตายของกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 อยู่ระหว่าง 92.22-81.11 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 3 (56.67 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การศึกษาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีค่าสูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีค่าอัตราส่วนการเจือจางของซีรั่มต่ำที่สุดที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1 : 8 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 : 4 กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดเท่ากับ 53.33±0.58 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทดสอบความต้านทานของกุ้งต่อเชื้อ *V. harveyi* แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ในการทดลองที่สองควบคุมปริมาณ DO ที่ 3 ระดับ (สูงกว่า 4 อยู่ระหว่าง 2-4 และต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ควบคุมปริมาณแอมโมเนียรวมให้ได้ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7.5 และ 8.5 ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ กุ้งในชุดการทดลองที่ DO ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 8.5 หลังจากกุ้งกินอาหาร 30 นาที มีปริมาณอาหารเหลือสูงที่สุดที่ 73.38±1.90 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ DO ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 7.5 (73.09±1.44 เปอร์เซ็นต์) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ DO อยู่ระหว่าง 2-4 และสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสองระดับพีเอช หลังจากการเลี้ยงนาน 60 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ DO สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด (25.34±0.80 กรัม) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในกลุ่มที่ DO สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรพีเอช 8.5 (25.07±0.82 กรัม) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในกลุ่มอื่น ๆ กุ้งในชุดการทดลองที่ DO สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 มีอัตราการรอดตายสูงสุดที่ 93.33±3.33 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในกลุ่มที่ DO สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรพีเอช 8.5 แต่มีอัตรารอดตายสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ DO อยู่ระหว่าง 2-4 และต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสองระดับพีเอชซึ่งมีอัตราการรอดตายอยู่ในช่วง 78.89-50.50 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งในชุดการทดลองที่ DO สูงกว่า 4 และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 และ 8.5 มีค่าสูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ DO ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 และ 8.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งในชุดการทดลองที่ DO ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งสองระดับพีเอชมีค่าอัตราส่วนการเจือจางของซีรั่มต่ำที่สุดที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1:4 ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ ที่มีค่าอัตราส่วนการเจือจางของซีรั่มเท่ากับ 1:8 กุ้งในชุดการทดลองที่ DO สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 และ 8.5 มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด (43.33±0.58 เปอร์เซ็นต์) หลังจากทดสอบความต้านทานของกุ้งต่อเชื้อ *V. harveyi* แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ DO อยู่ระหว่าง 2-4 ที่พีเอช 7.5 และ 8.5 (40.00±1.00 และ 36.67±0.58 เปอร์เซ็นต์) แต่มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ DO ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 และ 8.5 (23.33±0.58 และ 16.67±0.58 เปอร์เซ็นต์) การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมมากกว่าปริมาณแอมโมเนียที่พีเอช 7.5 และ 8.5

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Thasanee Nonwachai 2012: Effects of Dissolved Oxygen, Ammonia and pH Levels on Feed Intake, Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristic of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Challenged with *Vibrio harveyi*. Doctor of Philosophy (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 129 pages.

A study on the effects of dissolved oxygen (DO), ammonia (NH_3) and pH levels on feed intake, growth, survival and immune response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was conducted under laboratory conditions. For feed intake study, 10 shrimp (6-8 g) were reared in 100-liter aquaria (salinity 25 parts per thousand, 29±1 ^{O}C), 30 shrimp (6-8 g) were reared in 500-liter tanks for growth, survival and immune parameter study. Shrimp were fed a commercial feed four times daily for the period of 60 days. Two experiments were studied, first experiment was conducted at three DO levels of above 4 mg/l (treatment 1), 2-4 mg/l (treatment 2), and less than 2 mg/l (treatment 3) with three replicates/treatment. Results showed that shrimp in the treatment 3 had the highest leftover feed after 30 minutes of feeding at 73.31±3.65% which was statistically significantly different ($p<0.05$) from treatment 1 (2.60±3.31%) and 2 (13.22±5.67%). After 60 days, the shrimp in treatment 1 had an average body weight (28.16 ± 2.77 g) which was significantly higher ($p<0.05$) than those of treatment 2 (25.01±1.81 g) and treatment 3 (25.90 ± 2.51 g). Survival rate of shrimp reared in treatment 1 and 2 range from 92.22-81.11% which was significantly higher ($p<0.05$) than treatment 3 (56.67%). The immune parameters including total hemocyte count, percentage phagocytosis, bactericidal activity, phenoloxidase activity, superoxide dismutase activity from treatment 1 and 2 were significantly higher ($p<0.05$) than treatment 3. Shrimp in treatment 1 and 2 had bactericidal activity at the serum dilution of 1:8 while shrimp in treatment 3 had it at the dilution of 1:4. Shrimp in treatment 1 had the highest survival rate at 53.33±0.58 % after experimental challenge with *Vibrio harveyi* but not significantly different ($p>0.05$) from the shrimp in treatment 2. The second experiment was carried out at three DO levels (above 4, 2-4 and less than 2 mg/l) and total ammonia maintained at 3 mg/l at pH levels of 7.5 and 8.5 respectively with three replicates/treatment. Shrimp with DO less than 2 mg/l at pH 8.5 had highest leftover feed after 30 minutes of feeding (73.38±1.90%) with no statistically significant difference of DO less than 2 mg/l at pH 7.5 (73.09±1.44%) but significantly different from the treatment reared in DO 2-4 mg/l and higher than 4 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5. Shrimp in treatment that contained DO above 4 mg/l at pH 7.5 had highest average body weight (25.34±0.80 g) with no statistically significant difference from the treatment with DO above 4 mg/l at pH 8.5 (25.07±0.82 g) but significantly different from other treatments. Shrimp reared in treatment with DO above 4 mg/l at pH 7.5 had highest survival rate at 93.33±3.33% with no statistically significant difference of DO above 4 mg/l at pH 8.5 but significantly higher ($p<0.05$) than treatment that was in DO 2-4 and less than 2 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5 respectively and showed the survival rate from 78.89 to 50.00%. The immune parameters including total hemocyte count, percentage phagocytosis, bactericidal activity, phenoloxidase activity, superoxide dismutase activity were significantly higher ($P<0.05$) in treatment with DO above 4 and 2-4 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5 than treatment with DO less than 2 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5. Shrimp of treatment that DO less than 2 mg/l at both pH levels had bactericidal activity at the serum dilution of 1:4 while shrimp in other treatments had the dilution of 1:8. Shrimp in treatment that DO more than 4 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5 had the highest survival rate (43.33±0.58%) after experimental challenge with *V. harveyi* with no significantly different ($p>0.05$) from the shrimp of treatment that DO 2-4 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5 (40.00±1.00 and 36.67±0.58%) but significantly higher ($p<0.05$) than treatment with DO less than 2 mg/l at both pH levels 7.5 and 8.5. This study indicated that dissolved oxygen had more effects on feed intake, growth, survival and immune response of *Litopenaeus vannamei* than ammonia and pH levels of 7.5-8.5.

_____ _____ ___ / ___ / _____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำปรึกษาในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทั้งในส่วนของการทดลองรวมถึงการตรวจแก้ไขข้อมูลต่าง ๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนที่ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการทำการทดลอง เก็บข้อมูลระหว่างวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล คำแนะนำต่าง ๆ การดูแลความเรียบร้อยในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งคอยให้กำลังใจเสมอในระหว่างทำการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ทัศนีย์ นลวชัย

กุมภาพันธ์ 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	40
ผลการทดลอง	57
วิจารณ์ผลการทดลอง	101
สรุปผล	106
ข้อเสนอแนะ	107
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	108
ภาคผนวก	125
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	129

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง	7
2	ผลกระทบของค่าพีเอชต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง	13
3	ปริมาณอาหารที่เหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ	57
4	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	59
5	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	61
6	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	63
7	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	65
8	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	67
9	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	69
10	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วันภายใต้	72
12	ปริมาณอาหารเหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน	74
13	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	77
14	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	78
15	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	81
16	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	83
17	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	85
18	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน	88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	90
20	คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม 60 วัน ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	91
21	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* 9.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	93
22	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 8.2×10^6 CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การทำงานของสารโปรตีนพวก peroxinectin	30
2	การดูดเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งขาวแวนนาไม	43
3	เข็มฉีดยาขนาด 25G ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง	43
4	การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งโดยใช้ hemocytometer	44
5	กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม	46
6	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD@ superoxide dismutase	49
7	ฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวกุ้งขาวแวนนาไม ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว	54
8	ปริมาณอาหารที่เหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ	58
9	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	60
10	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	62
11	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	64
12	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	67
14	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	69
15	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน	71
16	ปริมาณอาหารเหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน	75
17	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	79
18	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน	79
19	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	82
20	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	84

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	86
22	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน	87
23	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน	89
24	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* 9.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	94
25	อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 8.2×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	96
26	ลักษณะของเม็ดสี melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อทั้งในบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไปและบริเวณกล้ามเนื้อด้านบนของตัวกุ้ง	97
27	เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดกระบวนการ melanization ที่เนื้อเยื่อบริเวณ hepatopancreas (H&E, bar = 200 μm)	97
28	เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดกระบวนการ melanization ที่เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อ (H&E, bar = 50 μm)	98

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	พฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะอยู่นิ่ง ไม่ว่ายน้ำหรือเคลื่อนไหวมาก และกุ้งบางส่วนจะว่ายน้ำขึ้นไปสู่บริเวณผิวน้ำ	99
30	พฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	100
31	พฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า 4 และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะเข้าหาอาหารและกินอาหารอย่างรวดเร็ว	100

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

Effects of Dissolved Oxygen, Ammonia and pH Levels on Feed Intake, Growth, Survival, Non-Specific Immune Characteristic of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Challenged with *Vibrio harveyi*

คำนำ

ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ให้ประสบความสำเร็จนอกจากจะต้องใช้ลูกกุ้งที่มีคุณภาพดีแล้ว การจัดการในระหว่างการเลี้ยงโดยเฉพาะการควบคุมคุณสมบัติต่าง ๆ ของน้ำ ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ก็เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากด้วย (ชลอ และพรเลิศ, 2547) โดยทั่วไปปัญหาส่วนใหญ่ของการเลี้ยงกุ้งมักจะเกิดในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยงซึ่งเป็นช่วงที่คุณสมบัติของน้ำบางตัวอยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยเฉพาะในบ่อที่มีปริมาณกุ้งอย่างหนาแน่น แต่มีจำนวนเครื่องให้อากาศจำกัด ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในตอนกลางคืนถึงเช้ามืดอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (พีพีเอ็ม) ซึ่งจะมีผลต่ออัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้ง (Boyd, 1982) ถึงแม้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่พยายามเพิ่มปริมาณออกซิเจนจากการเพิ่มจำนวนเครื่องให้อากาศ หรือเพิ่มจำนวนรอบของการตีน้ำให้เร็วขึ้นแต่ในบางครั้งการแก้ปัญหาดังกล่าวก็ไม่สามารถรักษาระดับปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรได้โดยเฉพาะในช่วงกลางวันที่ไม่มีแสงแดดหรือฝนตกติดต่อกันหลายวัน จะทำให้ปริมาณออกซิเจนในเวลากลางคืนอยู่ในระดับที่ต่ำโดยเฉพาะในตอนเช้ามืด ซึ่งเป็นช่วงที่ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่าต่ำที่สุดอาจจะอยู่ในระดับที่ต่ำมาก แม้จะมีการเปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลาก็ตาม เนื่องจากออกซิเจนส่วนใหญ่จะถูกใช้ในการหายใจของสิ่งมีชีวิตและการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรท ซึ่งจะต้องมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ มิเช่นนั้นจะส่งผลให้เกิดปัญหาปริมาณแอมโมเนียตกค้างในบ่อและเป็นพิษต่อกุ้งที่เลี้ยงจนทำให้กุ้งอ่อนแอ ป่วย ติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย จากการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยเป็นโรคขี้ขาวในปัจจุบันพบว่าส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับสภาพพื้นบ่อเลี้ยงและความหนาแน่นของกุ้งที่เลี้ยงโดยบ่อที่พบกุ้งป่วยจะเป็นบ่อที่มีกุ้งหนาแน่นหรือมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณสารอินทรีย์ในบ่อมากจนทำให้ปริมาณออกซิเจนบริเวณพื้นบ่อมีไม่เพียงพอ เพราะส่วนใหญ่เมื่อนำกุ้งป่วยจากบ่อที่เริ่มมีปัญหาดังกล่าวกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอจะพบว่ากุ้งดังกล่าวแข็งแรงขึ้นและหายจากอาการขี้ขาวในที่สุด

ที่ผ่านมามีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับผลของปริมาณออกซิเจนหรือปริมาณแอมโมเนียต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งแต่รายงานส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในภาพรวมเท่านั้นว่าปริมาณออกซิเจนหรือแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงปริมาณเท่าใดทำให้กุ้งตาย หรือ ทำให้กุ้งโตช้า (Whitfield, 1974; Lin and Chen, 2001) ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังเลยว่าในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนเท่าใดหรือมีปริมาณแอมโมเนียในน้ำเท่าใดในสภาวะที่พีเอชของน้ำแตกต่างกันจะมีผลต่อการกินอาหารหรือเริ่มกินอาหารน้อยลง โดยเฉพาะผลร่วมของค่าคุณสมบัติของน้ำทั้งสามปัจจัยดังกล่าวต่อพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งทั้ง ๆ ที่ข้อมูลนี้มีความสำคัญมากในด้านการจัดการในระหว่างการเลี้ยงเพราะถ้าเกษตรกรทราบว่า คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงขณะนั้นเป็นอย่างไรและจะมีผลอย่างไรต่อพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้ง ก็จะสามารถปรับปริมาณอาหารให้สอดคล้องกับความต้องการกินอาหารของกุ้งได้ นอกจากจะลดการสิ้นเปลืองอาหารแล้วยังจะเป็นการป้องกันปัญหาคุณภาพน้ำและพื้นบ่อเน่าเสียได้อีกด้วย การศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบถึงผลของระดับออกซิเจนเพียงอย่างเดียวและผลของปริมาณออกซิเจนร่วมกับปริมาณแอมโมเนียในช่วงที่พีเอชแตกต่างกันต่อพฤติกรรมและระยะเวลาในการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ตลอดจนอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ ผลจากการศึกษานี้จะนำไปเผยแพร่ให้แก่ผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งทั่วประเทศเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในบ่อเลี้ยงตามความเหมาะสมของคุณภาพน้ำที่มีผลต่อการกินอาหารและการเจริญเติบโตของกุ้ง ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตกุ้งขาวแวนนาไมของไทยเพิ่มขึ้น สามารถที่จะแข่งขันและยังคงรักษาตำแหน่งการเป็นผู้นำด้านการเลี้ยงและการส่งออกได้อย่างยั่งยืนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของระดับออกซิเจน ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อศึกษาผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และ พีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม หรือกุ้งขาวแปซิฟิก (Pacific white shrimp) ถูกค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* ชื่อสามัญที่ FAO รับรองและใช้เรียกกันทั่วโลกคือ white leg shrimp หรือ Pacific white shrimp มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในทวีปอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ ได้แก่ เอกวาดอร์ เม็กซิโก บราซิล ฯลฯ ส่วนในทวีปเอเชียมีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ในหลายประเทศ ได้แก่ ไต้หวัน จีน อินโดนีเซีย เวียดนาม สำหรับประเทศไทย กรมประมงอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) จากต่างประเทศ จากแหล่งที่กรมประมงรับรองแล้วเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2545 เท่านั้น (ชลอ และคณะ, 2548; มาลินี และสมยศ, 2548) ซึ่งในขณะนั้นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้าไม่ได้ขนาด และผลผลิตตามที่ต้องการ เกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน ในขณะเดียวกันมีเกษตรกรบางส่วนทดลองเลี้ยงกุ้งขาวให้ผลค่อนข้างดีทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

2. อาหารกุ้ง

อาหารสัตว์น้ำ ตามความหมายทางโภชนาการ (คณะแพทย์ศาสตร์, 2518; เวียง, 2543; Maynard and Loosli, 1969; Halver, 1972) คือ สิ่งที่สัตว์น้ำกินแล้วเกิดประโยชน์ต่อร่างกายโดยช่วยสร้างและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ให้พลังงานและช่วยควบคุมให้การปฏิบัติงานของกระบวนการต่างๆ ในร่างกายดำเนินไปตามหน้าที่ แล้วส่งผลให้สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิต มีการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ได้อย่างปกติ อาหารของสัตว์น้ำแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (เวียง, 2543) คือ อาหารธรรมชาติ (natural food) และอาหารที่จัดเตรียมขึ้น (prepared food)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) อาหารธรรมชาติ หมายถึง อาหารที่มีอยู่แล้วและเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

2) อาหารที่จัดเตรียมขึ้น หมายถึง อาหารที่ผู้เลี้ยงจัดทำหรือจัดหาให้สัตว์น้ำกิน โดยมีเป้าหมายหลักเพื่อเพิ่มผลผลิตของสัตว์น้ำให้สูงขึ้นพร้อมกับย่นระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง อาหารที่จัดเตรียมขึ้นยังแยกเป็นอาหารสมบูรณ์ (complete feed) และอาหารสมทบ (supplemental feed)

2.1) อาหารสมบูรณ์ คือ อาหารที่มีสารอาหารที่สัตว์น้ำต้องการครบถ้วนและเพียงพอกับระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่น การเลี้ยงในกระชังหรือในที่กักขังที่ไม่มีอาหารธรรมชาติหรือมีในปริมาณจำกัด

2.2) อาหารสมทบ คือ อาหารที่ให้สัตว์น้ำกินเพิ่มเติมจากอาหารธรรมชาติ จึงไม่ต้องมีสารอาหารครบถ้วนเหมือนอาหารสมบูรณ์

สำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในปัจจุบันเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาโดยเลี้ยงระบบปิดหรือมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำน้อย มีเครื่องให้อากาศ และใช้อาหารสำเร็จรูปทั้งหมดโดยมีบริษัทเป็นผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูปจำหน่ายให้เกษตรกร วัตถุดิบหลักที่เป็นส่วนประกอบในอาหารกุ้งได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง แป้งสาลี วิตามิน เกลือแร่ และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์ อาหารกุ้งที่จำหน่ายตามท้องตลาดจะแบ่งตามเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหารซึ่งอาหารกุ้งกุลาดำจะมีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนสูงกว่าอาหารกุ้งขาว ส่วนอาหารสมทบมีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนต่ำที่สุดและใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำเป็นแหล่งโปรตีน จึงทำให้อาหารกุ้งกุลาดำมีราคาสูงกว่าอาหารกุ้งขาวและอาหารสมทบ ซึ่งในการเลี้ยงกุ้งค่าอาหารเป็นต้นทุนหลักสูงถึง 40-50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนรวมทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพของอาหารเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งหากสัตว์น้ำได้รับอาหารที่มีคุณภาพต่ำอาจก่อให้เกิดภาวะทุพโภชนาการ และเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นได้ง่าย

3. พฤติกรรมการกินอาหารของกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ที่กินอาหารได้ทุกชนิดทั้งพืชและสัตว์ และชอบเนื้อสัตว์ที่มีกลิ่นคาวมาก เพราะกุ้งหาอาหารโดยมีประสาทรับความรู้สึกทางกลิ่นที่หนวด ปาก ขาเดิน หัว เหงือก ลำตัวและแพนหาง ดังนั้นอาหารกุ้ง จึงจำเป็นต้องมีสารดึงดูดกุ้งให้กุ้งเคลื่อนที่เข้าหาอาหาร กุ้งมีลักษณะการจับกิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยจะใช้ขาเดินคู่ที่ 1 หรือ 2 จับอาหารกุ้งแล้วถือแทะ เพราะปากเป็นแบบกัดแทะ ดังนั้นอาหารจึงต้องมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กยาว และไม่แตกตัวง่ายเมื่อจับถือ หลังจากกุ้งที่เติบโตจนถึงระยะกุ้งคว่ำจะมีรูปร่างเหมือนพ่อ แม่ แล้วกุ้งจะกินอาหารจากบริเวณผิวหน้าดิน ดังนั้นอาหารที่ให้จึงต้องเป็นอาหารชนิดจมน้ำเร็ว โดยธรรมชาติกุ้งเป็นสัตว์ที่หากินเวลากลางคืน แต่กุ้งเลี้ยงสามารถที่จะฝึกให้กุ้งกินเวลาอื่น ๆ ได้ ดังนั้นเราจึงต้องฝึกให้กุ้งกินอาหารวันละ 3-4 มื้อ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด ในการให้อาหารกุ้งจึงต้องปรับให้เข้ากับธรรมชาติของกุ้งโดยต้องหว่านให้ทั่วบ่อ เพื่อให้กุ้งทุกตัวที่กระจายอยู่ก้นบ่อจะได้มีโอกาสกินอาหารเท่าๆกัน เนื่องจากกุ้งไม่ใช่สัตว์สังคม จะอยู่แยกกัน กินแยกกันและมีลักษณะยึดครองพื้นที่ (ธรณ์ธันย์, 2546)

กุ้งกินอาหารได้ทุกอย่างแต่ชอบเนื้อสัตว์ ชอบอาหารที่มีกลิ่นคาวมากโดยเฉพาะอาหารสด เช่น หอย ปลา ปลาหมึก (วีรพงศ์, 2531) เพราะกุ้งรับความรู้สึกและหาอาหาร โดยมีประสาทรับความรู้สึกทางกลิ่นที่หนวด บริเวณปาก ขาเดิน หัว เหงือก ลำตัว และแพนหาง ดังนั้นอาหารกุ้งจึงจำเป็นต้องมีสารดึงดูดให้กุ้งเข้าหาอาหารเป็นกลุ่มของกรดอะมิโน เช่น ไกลซีน (glycine) กลูตาเมต (glutamate) และบีเทน (betaine) แทนที่จะเป็นกรดไขมันเหมือนในอาหารปลา (มะลิ, 2531)

พยุง (2543) ได้กล่าวถึงการจัดการเรื่องอาหารในสภาพที่อากาศหนาว ต้องเน้นในเรื่องการจัดการให้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพเพราะโดยปกติแล้วถ้าอากาศหนาวจัด กุ้งจะกินอาหารลดลงหรือแทบจะไม่กินอาหารเลย ผู้เลี้ยงจะต้องลดปริมาณอาหารที่ให้ลงมา เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารที่เหลือเป็นของเสีย และเป็นสาเหตุให้กุ้งเครียด ป่วยและตายในที่สุด

4. คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งเนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ถ้ามีการจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ดี จะทำให้กุ้งอ่อนแอ ไม่กินอาหาร และมีอัตราการรอดตายต่ำ (Boyd and Fast, 1992)

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ และเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการทางชีวเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในน้ำ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจึงมีผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีผลต่อการกิน การย่อยอาหาร การเจริญเติบโต และสุขภาพของกุ้ง ดังนั้นหากมีปริมาณออกซิเจนต่ำจะทำให้กุ้งกินอาหารลดลง (กรมประมง,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2546) ถ้าปริมาณออกซิเจนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรอาจมีผลทำให้กุ้งตายได้ ปัญหาการขาดออกซิเจนในบ่อเลี้ยงนั้นมักจะพบในบ่อที่ปล่อยกุ้งเลี้ยงในปริมาณมากหรือกุ้งมีอัตรารอดตายสูงแต่มีเครื่องให้อากาศไม่เพียงพอโดยเฉพาะในช่วงเดือนสุดท้ายของรอบการเลี้ยง ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำมากเนื่องจากมีของเสียและสารอินทรีย์สะสมในบ่อในปริมาณมาก จนทำให้จุลินทรีย์ต่างๆในบ่อใช้ออกซิเจนละลายน้ำไปเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์และของเสียต่างๆจนมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่เพียงพอต่อการหายใจของกุ้ง ซึ่งปกติแล้วออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งต้องมีปริมาณมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะวัดในตอนเช้ามืดซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำที่สุดในรอบวัน เนื่องจากการใช้ไปในการย่อยสลายของสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ และการหายใจสิ่งมีชีวิตในบ่อ หลังจากแพลงก์ตอนพืชเริ่มมีการสังเคราะห์แสง ปริมาณออกซิเจนจะเพิ่มสูงขึ้นในตอนบ่าย (ชลอ, 2543; พุทธ, 2544; ชลอ และพรเลิศ, 2547; Chen, 1985) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง

ปริมาณออกซิเจน (มิลลิกรัม / ลิตร)	ผลกระทบต่อกุ้ง
มากกว่า 4	กุ้งเจริญเติบโตดี สารอินทรีย์สลายตัวได้เร็ว
3 - 4	กุ้งเจริญเติบโตช้าลง การสะสมของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น
น้อยกว่า 3	กินอาหารน้อยลง การเจริญเติบโตช้า โอกาสป่วยเพิ่มขึ้น
น้อยกว่า 2	กุ้งจะลอย กุ้งตัวที่อ่อนแอจะลอกคราบแล้วตาย
น้อยกว่า 1	กุ้งจะตาย

ที่มา : ชลอ และพรเลิศ (2547)

4.1 ความสำคัญของออกซิเจนต่อการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ออกซิเจนเป็นก๊าซที่เป็นองค์ประกอบหลักของอากาศโดยมีอยู่ในอากาศประมาณ 20.95 เปอร์เซ็นต์ เป็นอันดับสองรองจากก๊าซไนโตรเจนที่มีอยู่ 78.08 เปอร์เซ็นต์ อันดับถัดไปคือธาตุอาร์กอน 0.934 เปอร์เซนต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.032 เปอร์เซ็นต์ (ยนต์, 2539)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.1 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

ยนต์ (2539) กล่าวว่า ก๊าซออกซิเจนสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าก๊าซไนโตรเจน ความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆคือ

1. ความกดอากาศ ถ้าความกดอากาศเพิ่มขึ้นการละลายได้ของออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นแต่ถ้าความกดอากาศลดลงความสามารถในการละลายได้ของออกซิเจนจะลดลง

2. อุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นการละลายได้ของออกซิเจนจะลดลง แต่ถ้าอุณหภูมิลดลงการละลายได้ของออกซิเจนจะเพิ่มขึ้น

3. ความเค็ม ในน้ำที่มีความเค็มสูงการละลายได้ของออกซิเจนจะลดลงในขณะที่น้ำความเค็มต่ำการละลายได้ของออกซิเจนจะมากกว่าความสามารถในการละลายได้ของออกซิเจนลดลงโดยประมาณอย่างคร่าว ๆ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้น 9 ส่วนในพันส่วน

4.1.2 แหล่งที่มาของออกซิเจนในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำได้มาจาก 3 แหล่ง คือ (ยนต์, 2539)

1. การแพร่จากอากาศ เนื่องจากอากาศมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 20.95 เปอร์เซ็นต์ การแพร่ของออกซิเจนจากอากาศจึงเป็นแหล่งที่ให้ออกซิเจนที่สำคัญแก่แหล่งน้ำ อย่างไรก็ตามการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำจะเกิดขึ้นได้ก็เพียงในสภาวะที่ปริมาณของออกซิเจนอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าจุดอิ่มตัวเท่านั้น ถ้าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่าจุดอิ่มตัวมากจะมีการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำในอัตราสูง อัตราการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศสู่น้ำจะขึ้นอยู่กับผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับน้ำด้วยแรงลมที่ทำให้ผิวน้ำเป็นคลื่นจะช่วยให้การแพร่ของออกซิเจนลงสู่น้ำเพิ่มขึ้น ที่อุณหภูมิสูงและความเค็มสูง การละลายได้ของออกซิเจนจะน้อยกว่าที่อุณหภูมิและความเค็มที่ต่ำกว่า

2. การสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืชและพรรณไม้น้ำในแหล่งน้ำที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีแพลงก์ตอนพืชหรือพรรณไม้น้ำที่ขึ้นอยู่ใต้น้ำมาก การสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นมากในช่วงเวลากลางวันที่มีแสง แสงจึงเป็นแหล่งให้ออกซิเจนแก่น้ำที่สำคัญ การผลิตออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืชและพรรณไม้น้ำจะทำให้น้ำในแหล่งน้ำมีปริมาณออกซิเจนสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในช่วงกลางวันที่มีการสังเคราะห์แสงและบ่อยครั้งที่จะวัดออกซิเจนในแหล่งน้ำได้สูงเกินจุดอิ่มตัว สำหรับในบ่อเลี้ยงกุ้ง การสังเคราะห์แสงในตอนกลางวันมาจากปริมาณแพลงก์ตอนพืชเป็นส่วนใหญ่ซึ่งในบ่อที่มีปริมาณแพลงก์ตอนอย่างหนาแน่น โดยเฉพาะในบ่อที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำมักจะมีแพลงก์ตอนในกลุ่มสีเขียวแกมน้ำเงินมาก (ชลอ, 2543)

3. จากการใช้เครื่องให้อากาศในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาซึ่งมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นจำเป็นต้องมีการให้อากาศ ซึ่งในแต่ละฟาร์มมีการใช้เครื่องให้อากาศแตกต่างกันไปทั้งจำนวนและชนิดนั้นขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของการเลี้ยงและเป้าหมายของการผลิต (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

4.1.3 การสูญเสียออกซิเจนออกไปจากแหล่งน้ำ

ยนต์ (2539) กล่าวว่า การสูญเสียออกซิเจนออกไปจากแหล่งน้ำเกิดจาก

1. การใช้ออกซิเจนในการหายใจของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ และจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำ

2. การใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ

3. การใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์บริเวณดินพื้นท้องน้ำ

4. การแพร่กลับสู่อากาศซึ่งจะเกิดขึ้นเฉพาะในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนในน้ำอยู่สูงเกินจุดอิ่มตัวเท่านั้น

5. การใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์ สารอินทรีย์ในสภาพรีดิวซ์ในน้ำและบริเวณดินพื้นท้องน้ำ

4.1.4 วงจรออกซิเจนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วงจรของออกซิเจนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับในแหล่งน้ำทั่วไป แต่จะแตกต่างตรงที่การจัดการของบ่อมีผลต่อวงจรของออกซิเจนในน้ำ ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำแบบธรรมชาติ แหล่งของออกซิเจนที่สำคัญในบ่อก็ยังคงได้มาจากอากาศ การสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืชและการเข้ามากับมวลน้ำที่มีการถ่ายน้ำ ในการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่นหรือกึ่งหนาแน่นจะมีระบบให้อากาศในบ่อ ซึ่งจะเป็นแหล่งให้ออกซิเจนหลักในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำแบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หนาแน่น การสูญเสียออกซิเจนจากบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำก็จะเป็นไปในทำนองเดียวกับการเสียออกซิเจนไปจากแหล่งน้ำ ที่เพิ่มเติมขึ้นมาอีกส่วนหนึ่งก็คือการถ่ายน้ำทิ้งทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงอัตราการผลิตและอัตราการใช้ออกซิเจนในบ่อ จากส่วนต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่นทำให้มีการให้อาหารในปริมาณมาก เศษเหลือของอาหารและสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำจะทำให้เกิดผลต่อเนื่อง 3 ประการที่มีผลต่อวงจรของออกซิเจนในบ่อ (ยนต์, 2539) คือ

1. การให้อาหารในปริมาณมาก ทำให้มีเศษอาหารตกค้างหลงเหลือมาก และมีสิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำในปริมาณมาก ปริมาณรวมของสารอินทรีย์ที่เข้าสู่ระบบในบ่อสูงและเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ การสะสมและการเน่าสลายของสารอินทรีย์ทำให้เกิดการใช้ออกซิเจนในปริมาณมากกว่าที่อากาศสามารถแพร่ลงสู่แหล่งน้ำ

2. ผลจากการเน่าสลายของสารอินทรีย์ทำให้มีการปลดปล่อยธาตุอาหารลงสู่น้ำ กระตุ้นให้เกิดการแพร่พันธุ์ของแพลงก์ตอนพืช เมื่อปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อหนาแน่นปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจึงมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันสูงมากทำให้มีผลต่อสัตว์น้ำ

3. เพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เพียงพอไม่ให้มีผลกระทบต่อสัตว์น้ำจึงมีระบบการให้อากาศเพื่อให้ออกซิเจนแก่น้ำ และแหล่งนี้ก็จะเป็นแหล่งให้ออกซิเจนหลักของบ่อและเป็นหัวใจสำคัญที่จะทำให้สัตว์น้ำอยู่รอดเจริญเติบโตให้ผลผลิต การเติมอากาศอย่างต่อเนื่องได้เพิ่มผลผลิตของปลาคาร์ปและปลานิลได้ถึง 5 – 6 เท่าของบ่อปลาที่ไม่ได้เติมอากาศ การให้อากาศแก่บ่อเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่นจึงเป็นสิ่งสำคัญ (มั่นสิน, 2536)

4.1.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนในรอบวัน (Diurnal fluctuation)

การสังเคราะแสงของแพลงก์ตอนพืชและพรรณไม้น้ำเป็นแหล่งให้ออกซิเจนในแหล่งน้ำและบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งอัตราการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืชขึ้นอยู่กับปริมาณแสง การเปลี่ยนแปลงปริมาณแสงในรอบวันจึงมีผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสง และมีผลต่ออัตราการผลิตออกซิเจนโดยแพลงก์ตอน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนในรอบวันในบ่อและแหล่งน้ำในรูปแบบที่แน่นอน คือ ปริมาณออกซิเจนจะอยู่ที่ระดับต่ำสุดตอนเช้ามืด และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มมีแสงสว่างเมื่อแพลงค์ตอนพืชเริ่มทำการสังเคราะห์แสง และจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงช่วงบ่ายตามอัตราการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะมีปริมาณสูงสุดในช่วงบ่ายที่มีความเข้มข้นของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แสงสูงสุด หลังจากนั้นอัตราการสังเคราะห์แสงจะลดลงเมื่อความเข้มแสงลดลง และจะหยุดเมื่อหมดแสงสว่าง (ยนต์, 2539; ชลอ และพรเลิศ, 2547; ศรายุทธ์, 2547)

4.1.6 ความสำคัญของออกซิเจนต่อระบบนิเวศน์ในน้ำและสัตว์น้ำ

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ และเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการทางชีวเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในน้ำ ระดับออกซิเจนที่มีอยู่ในแหล่งน้ำจึงส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำและคุณภาพน้ำ

<u>ผลกระทบโดยตรงต่อสัตว์น้ำ</u>

1. ทำให้เกิดการตายของสัตว์น้ำเนื่องจากการมีปริมาณออกซิเจนต่ำเกินไป

2. ทำให้เกิดการตายของสัตว์น้ำเนื่องจากปริมาณออกซิเจนสูงเกินไป ในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนสูงเกินจุดอิ่มตัว ที่ระดับ 300 เปอร์เซ็นต์ของจุดอิ่มตัว จะทำให้เกิดโรคฟองอากาศในสัตว์น้ำทำให้สัตว์น้ำตาย (มั่นสิน, 2536)

3. ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในระดับต่ำหรือสูงเกินไปถึงแม้ไม่ทำให้สัตว์น้ำตาย แต่จะทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ ติดโรคง่าย ปริมาณออกซิเจนที่สูงระดับ 150 เปอร์เซ็นต์ของจุดอิ่มตัวมีผลทำให้ปลาไนเป็นโรคมากขึ้น (มั่นสิน, 2536)

<u>ผลกระทบทางอ้อมต่อสัตว์น้ำ</u>

1. ในสภาพที่ขาดออกซิเจนจะทำให้เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำ

2. ในสภาพที่ขาดออกซิเจนจะมีการสะสมของสารพิษพวกแอมโมเนียและไนไตรท์ที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ

3. ในสภาพที่ขาดออกซิเจนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำและช้าลง ทำให้เกิดการสะสมสารอินทรีย์ในบ่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.7 สาเหตุของปัญหาการขาดออกซิเจนหรือมีปริมาณออกซิเจนต่ำ

ระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่น มีการให้อาหารในปริมาณมากจึงมีเศษอาหารตกค้าง และมีสิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำในปริมาณมาก ทำให้ปริมาณรวมของสารอินทรีย์ที่เข้าสู่ระบบในบ่อสูงและเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ การสะสมและการย่อยสลายของสารอินทรีย์ทำให้มีการปลดปล่อยธาตุอาหารลงสู่น้ำ กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณของแพลงก์ตอนพืชมีผลทำให้ปริมาณออกซิเจนมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันมีความแตกต่างกันมาก โดยเฉพาะในช่วงเวลากลางคืนจะมีการใช้ออกซิเจนในปริมาณมาก ซึ่งทำให้มีโอกาสเกิดปัญหาการขาดออกซิเจนในตอนเช้ามืดได้ ซึ่งจะมีผลต่อสัตว์น้ำและมีการสะสมของสารพิษพวกแอมโมเนียและไนไตรท์ที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ เนื่องจากการย่อยสลายสารดังกล่าวไม่สมบูรณ์ ในสภาวะที่มีอากาศมืดครึ้มหรือเกิดฝนตกติดต่อกันหลายวันทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงของพืชต่ำลง ขณะที่ปริมาณออกซิเจนที่ใช้มีปริมาณเท่าเดิม ทำให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนได้เช่นกันและจะส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ทั้งในด้านการกินอาหาร การเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายได้ (ชวลิต, 2552)

4.2 คุณภาพน้ำอื่น ๆ ที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมมีความสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มในช่วงกว้าง และถ้าความเค็มเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างช้าๆ สามารถปรับตัวอยู่ที่ความเค็มเป็นศูนย์เป็นเวลานานพอสมควร หรือความเค็มที่เพิ่มขึ้นจนถึง 45 พีพีที แต่ความเค็มที่เหมาะสม คือ 10-30 พีพีที (ชลอ, 2543; กรมประมง, 2547)

ความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ของน้ำมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำมาก เนื่องจากพีเอชของน้ำมีผลต่อคุณสมบัติของน้ำตัวอื่น ๆ อีกเช่น มีผลต่อความเป็นพิษของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น พีเอชของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติของดิน ค่าอัลคาไลน์นิตี้ การผลิตและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ พีเอชของน้ำมีผลกระทบต่อกุ้งดังแสดงในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ผลกระทบของค่าพีเอชต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง

ระดับพีเอช	ผลกระทบต่อกุ้ง
ต่ำกว่า 5	ความเป็นกรดรุนแรงทำให้กุ้งตายได้
6 – 7	กุ้งเจริญเติบโตช้า บางส่วนตาย
7.5 – 8.5	กุ้งเจริญเติบโตดี
9 – 10	กุ้งเจริญเติบโตช้า บางส่วนตาย
11 – สูงกว่า	ความเป็นด่างรุนแรงทำให้กุ้งตาย

ที่มา : บรรจง (2535)

นิรนาม (2545) กล่าวว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำมีอยู่ 2 ปัจจัยได้แก่ ปัจจัยภายนอก เช่น การชะล้างของดินที่เป็นกรดลงสู่บ่อเลี้ยง ฝนตก หรืออาจเกิดจากการไหลของน้ำที่เข้ามาผสมกันระหว่างน้ำที่มีพีเอชสูงหรือต่ำของน้ำในบ่อกับแหล่งน้ำ และปัจจัยภายใน เช่น การผลิต และการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ของสิ่งมีชีวิตในบ่อเลี้ยง จากการหายใจ การสังเคราะห์แสง รวมถึงการเน่าสลายของสารอินทรีย์ที่พื้นบ่อ ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ และมีผลทำให้ค่าพีเอชน้ำเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ค่าความกระด้างของน้ำ มีผลในการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชเพราะในขณะที่มีการสังเคราะห์แสง ค่าความกระด้างในรูปของแคลเซียมจะช่วยตกตะกอนคาร์บอเนตที่เกิดในกระบวนการสังเคราะห์แสงด้วย

พีเอชของน้ำที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 คือในตอนเช้าซึ่งพีเอชมีค่าต่ำสุดไม่ควรต่ำกว่า 7.5 และในช่วงบ่ายที่มีพีเอชสูงสุดไม่ควรจะสูงกว่า 8.5 แต่ค่าความแตกต่างของพีเอชในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในบ่อเลี้ยงกุ้งขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น คุณสมบัติของดิน ค่าความเป็นด่าง การผลิตและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำซึ่งส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับปริมาณแพลงก์ตอนพืช (ชลอ, 2543; ชลอ และพรเลิศ, 2547) โดยค่าพีเอชต่ำกว่า 4 มีความเป็นกรดสูง ในขณะที่ค่าพีเอชมากกว่า 11 มีความเป็นด่างสุง ซึ่งจะส่งผลให้ สัตว์น้ำตาย พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ระหว่าง 6-9 จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตดีที่สุด (Boyd and Tucker, 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเป็นด่างมีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลทุกชนิด ความเป็นด่างของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ในช่วง 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร (Boyd, 1982) โดยทั่วไปการรักษาระดับความเป็นด่างให้คงที่นั้นจะใช้วัสดุปูนในกลุ่มคาร์บอเนต ส่วนการเพิ่มความเป็นด่างอาจใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตหรือโซเดียมคาร์บอเนตขึ้นอยู่กับระดับพีเอชของน้ำ (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

ความกระด้างของน้ำเกิดจากตะกอนของแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะวัดออกมาเป็นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) โดยปริมาณความกระด้างรวม หมายถึง ผลรวมของความกระด้างเนื่องมาจากผลรวมความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียม (ศิริเพ็ญ, 2543) ปลาและสัตว์น้ำในกลุ่มปู-กุ้งต้องการแคลเซียมในการสร้างกระดูกและเปลือก โดยจะดูดซับแคลเซียมจากน้ำระหว่างการลอกคราบจึงต้องมีปริมาณแคลเซียมในน้ำระดับที่พอเพียง (Fieber and Lutz, 1982)

ชลอ และคณะ (2552) รายงานว่า อุณหภูมิจะส่งผลต่อการกินอาหารของกุ้งที่อุณหภูมิน้ำต่ำ (24±1 และ 26±1 องศาเซลเซียส) กุ้งกินอาหารในแต่ละมื้อในปริมาณน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30±1, 32±1 และ 34±1 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำยังส่งผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำด้วย โดยเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นยังมีผลทำให้สารพิษประเภทต่าง ๆ เช่น ยากำจัดศัตรูพืชและโลหะหนักมีความเป็นพิษรุนแรงมากขึ้น ทั้งนี้ยังจะช่วยเร่งให้มีการดูดซึมและการแพร่กระจายของสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้เร็ว และจะทำให้แอมโมเนียในรูปที่เป็นพิษ (un-ionized ammonia) แตกตัวเพิ่มมากขึ้น (Boyd, 1982)

สารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษต่อกุ้งได้แก่ แอมโมเนียและไนไตรท์ ซึ่งแหล่งของสารประกอบไนโตรเจนในน้ำส่วนใหญ่มาจากสารอินทรีย์ ซึ่งมาจากกระบวนการย่อยสลายของเศษอาหารที่เหลือ แพลงก์ตอนที่ตาย เศษซากพืชซากสัตว์และสารอินทรีย์อื่น ๆ โดยจุลินทรีย์ แล้วปล่อยแอมโมเนียออกมาสู่แหล่งน้ำ ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียจำพวกไนตริไฟอิ้งแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) จะเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทตามลำดับ (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอมโมเนียเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษต่อกุ้งและสัตว์น้ำอื่น ๆ ยกเว้น แพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่ใช้แอมโมเนียเป็นอาหาร โดยแพลงก์ตอนพืชจะใช้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียและไนเตรท (Patrick, 1977) แอมโมเนียที่พบอยู่ในน้ำมี 2 รูปแบบ ได้แก่ แอมโมเนีย ที่แตกตัวเป็นอิออน (ionize ammonia; NH_4^+) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำและแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออน (un-ionize ammonia; NH_3) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์ แอมโมเนียทั้งสองรูปนี้จะเปลี่ยนกลับไปกลับมาขึ้นอยู่กับค่าพีเอชและอุณหภูมิ แต่จะพบว่าค่าพีเอชจะส่งผลต่อการแตกตัวเป็นแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนมากกว่าอุณหภูมิ (Boyd, 1989) คือ เมื่อพีเอชสูงอัตราส่วนของแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนจะสูงขึ้น ทำให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำเพิ่มขึ้น การที่แอมโมเนียในน้ำสูงขึ้นจะทำให้กุ้งขับถ่ายแอมโมเนียได้น้อยลง ก่อให้เกิดการสะสมแอมโมเนียในเลือดและเนื้อเยื่อ ทำให้ค่าพีเอชของเลือดเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แอมโมเนียจะทำให้การใช้ออกซิเจนของเนื้อเยื่อสูงขึ้น โดยจะเข้าทำลายเหงือกและความสามารถในการขนส่งออกซิเจน กุ้งจะอ่อนแอและติดเชื้อโรคได้ง่าย แต่ถ้าน้ำมีพีเอชลดลง แอมโมเนียมอิออนจะมีอัตราส่วนที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความเป็นพิษของแอมโมเนียจะสูงตามไปด้วย (Boyd, 1982) และเมื่อค่าพีเอชลดลง ความเป็นพิษของแอมโมเนียก็จะลดลง ระดับแอมโมเนียที่ทำให้กุ้งโตช้าอยู่ระหว่าง 0.1-0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าอยู่ในช่วง 0.4-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้สัตว์น้ำตาย โดยทั่วไประดับแอมโมเนียที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งควรมีค่าน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brock and Main, 1994)

ไนไตรท์เป็นสารประกอบไนโตรเจนรูปแบบหนึ่งเกิดจากการที่สารอินทรีย์จมตัวลงและทับถมที่พื้นบ่อถูกย่อยสลาย โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในระหว่างอนุภาคตะกอนให้เป็นธาตุอาหารพืชต่าง ๆ โดยกระบวนการย่อยสลายจำเป็นต้องอาศัยปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอ สำหรับกระบวนการย่อยสลายก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และทำให้ค่าพีเอชลดลง การย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดแอมโมเนียซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์และถ้าบริเวณดังกล่าวมีออกซิเจนเพียงพอและมีแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying bacteria ก็อาจเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ไนไตรท์และไนเตรท (จารุมาศ, 2548) กระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ซึ่งเป็นกระบวนการแปรสภาพแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรทตามลำดับ โดยการทำงานของจุลินทรีย์ (วิทยา, 2526; เพิ่มพูน, 2528; Alexander, 1961) ซึ่งกระบวนการนี้จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ amminization ซึ่งเป็นกระบวนการที่สารประกอบโปรตีนจะสลายตัว คือ ถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายเป็นสารประกอบไนโตรเจนพวก amino compound ต่าง ๆ และในที่สุดจะเป็นเอมีน (amine) และกรดอะมิโน (amino acid) อีกกระบวนการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกันคือ กระบวนการ ammonification ซึ่งเกิดต่อเนื่องจาก amminization

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารประกอบพวกเอมีนหรือกรดอะมิโนจะเปลี่ยนเป็นเป็นแอมโมเนีย แอลกอฮอล์และพลังงาน (วิทยา, 2526) การแปรสภาพแอมโมเนียจะเกิดขึ้นโดย enzymatic oxidation ซึ่งเป็นกิจกรรมของ nitrifying bacteria ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน กระบวนการแปรสภาพจะมีอยู่ 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 NH_3 หรือ NH_4^+ จะถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรท์

$$2NH_4^+ + 3O_2 \xrightarrow[\text{oxidation}]{\text{Enzymatic}} 2NO_2^- + 2H_2O + 4H + \text{พลังงาน}$$

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ได้แก่ *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*

ขั้นตอนที่ 2 ไนไตรท์จะถูกออกซิไดซ์เป็นไนเตรท

$$NO_2^- + O_2 \xrightarrow[\text{oxidation}]{\text{Enzymatic}} 2NO_3^- + \text{พลังงาน}$$

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Nitrobacter*

ไนเตรทในแหล่งน้ำมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของแพลงก์ตอนพืช ปริมาณไนเตรทจึงสามารถบ่งชี้ถึงกำลังผลิต (productivity) ของแหล่งน้ำได้ แหล่งที่มาของไนเตรทได้มาจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน โดยแบคทีเรีย *Nitrobacter* sp. นอกจากไนเตรทจะเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชแล้ว ไนเตรทยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์อีกด้วย เนื่องจากไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในลำดับถัดลงมาจากออกซิเจนและมีความสำคัญมากในระดับดินที่การแทรกซึมของออกซิเจนจากน้ำที่อยู่เหนือระดับพื้นบ่อนั้นถูกจำกัด เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลงจนเกือบหมด แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas, Moraxella, Spirillum, Thiobacillus* และ *Bacillus* จะทำการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) โดยกระบวนการนี้จะเกิดเฉพาะในชั้นบาง ๆ ใต้ผิวดิน ซึ่งอยู่ติดกับชั้นที่มีออกซิเจนด้านบน (จารุมาศ, 2548) ดังสมการ

$$4NO_3^- + 5CH_2O\ (\text{organic matter}) + 4H^+ \longrightarrow 2N_2 + 5CO_2 + 7H_2O$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารอินทรีย์จะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนจากไนเตรทเปลี่ยนสารอินทรีย์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและก๊าซไนโตรเจน ซึ่งก๊าซไนโตรเจนที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกปล่อยสู่บรรยากาศ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับน้ำเกิดเป็นไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ปฏิกิริยานี้จะทำให้ความเป็นกรดของดินลดลง (Boyd, 1995)

ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ซัลเฟตและสารประกอบซัลเฟอร์ออกไซด์อื่น ๆ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการเมตาบอลิซึมจะได้พวกซัลไฟด์ออกมา ซึ่งซัลไฟด์เป็นอิออนที่แตกตัวอยู่ในสภาวะที่สมดุลกับไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งมีค่าพีเอชเป็นตัวกำหนดว่าซัลไฟด์จะอยู่ในรูปไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไฮโดรซัลไฟด์อิออน (HS^-) หรือไบซัลไฟด์อิออน (S^{2-}) ซัลไฟด์ที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำจะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซไข่เน่า โดยมีระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.01-0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ความเข้มข้น 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีผลทำให้กุ้งเกิดอาการช็อกเป็นอัมพาตและจะตายในที่สุด (สมพร, 2535)

5. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม arthropod มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Bachère *et al*., 2000) โดยจะไม่มีการตอบสนองและการสร้างสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี้ (antibody) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immnoglobulin) (กิจการ และคณะ, 2543 จ) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด (open circulatory system) (Söderhäll *et al*., 1996) ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือดและน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue พบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดิน พบอยู่เป็นชุด ๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C) ไนโตรเจน (N) ไฮโดรเจน (H) ซัลเฟอร์ (S) และคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุคอปเปอร์ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน ในน้ำเลือดกุ้งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ hemocyanin (Ratcliffe *et al*., 1985) โดยมีประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด (Djangmah, 1970) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดของตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง (Chen and Cheng, 1993) กุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค โดยเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำคัญ เกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

5.1 กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism)

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

5.2 กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

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

เซลล์เม็ดเลือดของครัสเตเชี่ยนแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก โดยใช้การมีหรือไม่มีกรานูลของเซลล์เป็นหลัก คือเซลล์ไฮยาลิน และเซลล์ที่มีกรานูล (granular hemocyte) (กิจการ และคณะ, 2543 จ)

1) hyaline cell หรือ hyaline hemocyte (hyalinocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณน้อยมากหรือไม่พบเลยและไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมโครเมตร ยาว 6.8-13.9 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) (กิจการ และคณะ, 2543 ก) หน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and Smith, 1986)

2) semi-granular cell หรือ semi-granular hemocyte (semi-granulocyte) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ เซลล์พบ SER และ RER ได้มาก มี cytoplasmic granules ขนาดเล็ก และจำนวนน้อย เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร และยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร ลักษณะของ cytoplasmic granules ภายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนจากผิวภายนอก (กิจการ และคณะ, 2543 ก) ทำหน้าที่โดยตรงในการห้อมล้อม และทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้ง prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell นี้ ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกลืนกินได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

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

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย และทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เม็ดเลือดจะมีการเพิ่มจำนวนมาทดแทนส่วนที่หมดอายุและตายไปจากเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดซึ่งเรียกว่า hemopoietic tissue ในกุ้งพบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารและโคนขาเดิน พบอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด ซึ่งในน้ำเลือดของกุ้งจะพบรงควัตถุ hemocyanin ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Ratcliffe *et al*., 1985) ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรรณวไล, 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำจะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

การศึกษาเม็ดเลือดของกุ้งโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular technic) ร่วมกับเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกัน มาศึกษาโปรตีนในเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization (Keyser, 1999), enzyme activity (Smith and Söderhäll, 1983; Söderhäll and Smith, 1983 a; Sequeira *et al*., 1996), immunogold (Liang *et al*., 1992), immunofluorescence (Johansson *et al*., 1999) และ immunoprecipitation (Liang *et al*., 1992) โปรตีนชนิด prophenoloxidase (proPO) และ peroxinectin สามารถพบได้ในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell ส่วนโปรตีนชนิด cell-surface superoxide dismutase และ α-macroglobulin พบมากในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell แต่พบน้อยในเม็ดเลือดชนิด hyaline cell ส่วนโปรตีนชนิด transglutaminase พบได้ในเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ semi-granular cell แต่ไม่พบในเม็ดเลือดชนิด large granular cell เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย ปริมาณเม็ดเลือดภายในตัวกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และจะมีปริมาณลดลงเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนเม็ดเลือดที่ตายไปในปริมาณที่เหมาะสม

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีกระบวนการหลัก ๆ 3 แบบ ได้แก่

1) กระบวนการฟาโกซัยโตซิส (phagocytosis)

กระบวนการฟาโกซัยโตซิสเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย ฟาโกไซท์ (phagocytes) เป็นเม็ดเลือดขาวที่สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคได้สลายตัวโดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ตัวอย่างของเม็ดเลือดขาวได้แก่ macrophages และ granulocytes

กระบวนการเกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เป็นกระบวนการที่ไม่เฉพาะเจาะจง เริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไป เกิดเป็นฟาโกโซม (phagosome) ซึ่งจะสัมผัสกับไลโซโซม (lysosome) ที่อยู่ภายในเซลล์ ภายในไลโซโซมบรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNases, RNases, proteases, phosphatases และ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย

เมื่อเซลล์ฟาโกไซท์รวมกับไลโซโซม จะเกิดเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) และมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) น้ำตาลที่ถูกเก็บสะสมไว้ ที่ใช้ในการสร้าง NADPH จะรวมเข้ากับออกซิเจน เกิดเป็น toxic peroxide (H_2O_2) และ superoxide (O^{2-}) การแตกตัวของออกซิเจนสามารถที่จะผลิตออกซิเจนในรูปแบบที่เป็นพิษ จำนวนโมเลกุลทั้งหมดจะมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาสูง และมีการทำลายอนุภาคภายในฟาโกไลโซโซม โดยกลไกทางเคมีอย่างไม่เฉพาะเจาะจง หลังจากทำการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์การเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนโดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้เกิดอนุภาคต่าง ๆ ดังสมการ

superoxide : $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^-$

hydrogen peroxide : $O_2^- + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$

hydroxyl radicle : $H_2O_2 + 2e^- + H^+ \longrightarrow OH^- + H_2O$

ภายในไลโซโซม จะมีค่าพีเอชเป็นกรด เพราะเยื่อบุผิวของไลโซโซม จะปั๊มไฮโดรเจนไอออน (H^+) เข้าไปในไลโซโซม เพื่อที่จะรักษาระดับค่าพีเอชให้ได้ 4.8 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่โปรตีนหลายชนิดเสื่อมสภาพไป (denature) และง่ายต่อการทำให้แตกออกการเป็นกรดนี้จะเป็นการเร่งให้เกิดการสร้างสารประกอบออกซิเจนบางชนิดที่เป็นพิษเช่น peroxide

ระยะเวลาในการเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมตั้งแต่เริ่มจนถึงการเกิดฟาโกไลโซโซม และการกระตุ้นการเกิดกระบวนการแตกตัวของออกซิเจนจะใช้เวลาหลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วโมง เวลาสำหรับการเกิดการแตกตัวของอนุภาคสิ่งแปลกปลอมจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไป ระดับของการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระบวนการนี้บางครั้งสามารถเกิดได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง หรือบางครั้งอาจใช้เวลาเป็นวัน (Terry, 2001)

2) โนดูลฟอร์เมชั่น (nodule formation) และเอนแคปซูเลชั่น (encapsulation)

<u>กระบวนการ nodule formation</u>

nodule formation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan *et al*., 1994) โดยจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็นชุดก้อน (nodule) จะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย มักพบการสร้างชุดก้อนที่เหงือก และ hepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสี melanin ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ semi-granular cell และ large granular cell (Johansson and Söderhäll, 1989)

<u>กระบวนการ encapsulation</u>

encapsulation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น เชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ (Jiravanichpaisan *et al*., 1994) จนเซลล์เม็ดเลือดเดียวไม่สามารถกำจัดได้ นอกจากนี้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ห่อหุ้มจะอาศัยองค์ประกอบในกระบวนการ prophenoloxidase activating system พร้อมกับการเกิดเม็ดสี melanin (Ratcliff *et al*., 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเป็นชนิดเดียวกันกับการเกิดกระบวนการ nodule formation จากการศึกษาของ กิจการ (2543 ค) ได้ทำการทดลองโดยใช้ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ใช้เป็นสิ่งแปลกปลอมเพื่อติดตามและตรวจสอบการทำงาน และการตอบสนองของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธีนับเม็ดเลือดรวมและเนื้อเยื่อวิทยา จากการทดลองหลังจากฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกุ้ง 1 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบไหลเวียนลดลง หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดค่อยๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาเนื้อเยื่อพบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับ หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 3-9 พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงและสุดท้ายมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย ผลการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความแตกต่างของโครงสร้างเม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเซลล์ไม่พบ granule ภายในไซโทพลาซึมมี vacuole ขนาดใหญ่ใน ไซโทพลาซึมและพบเศษเซลล์ (debris) และลักษณะของ myelin figure แสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอมและเกิด autophagic vacuole

โดยทั่วไปกระบวนการฟาโกซัยโตซิสจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก โดยเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยว ๆ ส่วนโนดูลฟอร์เมชั่น และ เอนแคปซูเลชั่น เป็นการห้อมล้อมตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีวิธีการที่ซับซ้อนมากกว่า สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่มีขนาดใหญ่ หรือมีจำนวนมากถูกกำจัดไป การเกิดโนดูลจะใช้เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมโดยเอนแคปซูเลชั่น จะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่

เมื่อพบว่าสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จนเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถใช้วิธีการ phagocytosis ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้จะเกิดการรวมกลุ่มกันของเซลล์เม็ดเลือดหรือ เรียกว่า nodule formation เพื่อทำการล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งถือว่าเป็นการจำกัดขอบเขตของเชื้อโรค (Smith and Söderhäll, 1986) ส่วนการเกิด encapsulation เกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายนั้นมีขนาดใหญ่เช่น ไข่ของปรสิต เชื้อรา พบว่าร่างกายจะส่ง semi-granular cell เข้ามาเป็นพวกแรก โดยจะเข้ามาเรียงตัวล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร ทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้ายแคปซูลขึ้น (Persson *et al.,* 1987)

Fontaine and Lightner (1975) ศึกษาเกี่ยวกับระบบการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บของกุ้งสกุล *Penaeus* พบว่าเมื่อกุ้งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม โดยมีการทำให้เกิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การบาดเจ็บหรือเป็นแผลขึ้นปฏิกิริยาแรกที่กุ้งมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ที่เกิดขึ้นคือ มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดไปยังบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะเกิดกระบวนการฟาโกซัยโตซิส ขึ้นเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในขั้นตอนแรก จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา encapsulation ซึ่งจะพบว่าเห็นเซลล์เม็ดเลือดบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บ หลังจากนั้นจะมี cellular infiltration และ encapsulation แล้วจะเกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้นและมี collagen like fibers เกิดเป็นแผลถาวรและมีการสร้างรงควัตถุสีดำจากกระบวนการ melanization

5.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยสารน้ำ

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำมีการทำงานต่อหรือพร้อมกับกระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำและเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recongition protein (PRPs) มีน้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs มีชื่อเรียกต่างกันตามความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเชื้อก่อโรค เช่น ถ้า PRPs จับกับโมเลกุลของเบต้ากลูแคน ซึ่งสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ (yeast) และ hyphae ของเชื้อราจะมีชื่อเรียกว่า β-glucan binding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ในส่วนของเปปติโดกลัยแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก จะมีชื่อเรียกว่า peptidoglycan binding protein และไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จะมีชื่อเรียกว่า lipopolysaccharide binding protein (ชัยชาญ, 2545) โดยโมเลกุลของสารเบต้ากลูแคน, ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ และเปปติโดกลัยแคน เรียกรวม ๆ ว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) เมื่อ PAMPs แต่ละชนิดเข้ามาในกระแสเลือดกุ้ง โมเลกุลของ PRPs จะเคลื่อนที่เข้าไปจับกับ PAMPs ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (protein complex) ได้แก่ β-1,3-glucan-binding protein complex (Sritunyalucksana *et al*., 1999), lipopolysaccharide -binding protein complex และ peptidoglycan -binding protein complex (ชัยชาญ, 2545) โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดให้เคลื่อนที่เข้ามา (migration) ซึ่งบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell มีส่วนรองรับแบบจำเพาะ (receptor) ซึ่งสามารถรองรับโมเลกุลเชิงซ้อน และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ degranulation ของเม็ดเลือด (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ซึ่งภายในกรานูลจะประกอบไปด้วยเอนไซม์และสารประกอบโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ transglutaminase (TGase), lectin, peroxinectin, protein released และเอนไซม์ใน

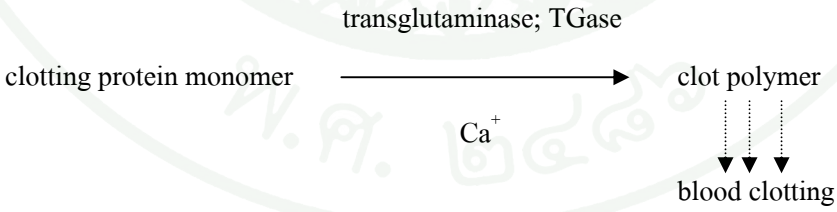
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยสารทั้งหมดที่หลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

1) การแข็งตัวของเลือด

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อที่จะป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์ ซึ่งมีกรานูลอยู่ภายใน เมื่อกรานูลถูกปล่อยออกมาแล้วแตกออก สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน โดยเป็นโปรตีนหลักเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของครัสเตเชียนหลายชนิด ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อจุลินทรีย์

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อที่จะป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ transglutaminase จะไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่งไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดกุ้ง (วัชริยา, 2547) โดย transglutaminase จะทำงานร่วมกับ calcium ion กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการจับตัวเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้เม็ดเลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting) ดังแสดงในสมการต่อไปนี้



Iwanaga (1993) ได้ทำการศึกษาระบบการแข็งตัวของเลือดในกลุ่ม Chelicerate โดยศึกษา horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* พบว่าระบบที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน (coagulation system) ประกอบไปด้วยโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ ได้แก่ serine proteinase zymogen factors C, B, G, proclotting enzyme และ clottable protein coagulogen ซึ่ง factors C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ lipopolysaccharide (LPS) และ factors G จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ β-1,3-glucan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yeh *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดกุ้งกุลาดำ โดยแยก clottable protein จากน้ำเลือดโดยใช้เทคนิค Sequential DEAE anion-exchange chromatography ซึ่งโปรตีนนี้จะเกิดการแข็งตัวเมื่อมีแคลเซียมอิออน และ TGase ที่ปล่อยออกมาจากเม็ดเลือด ซึ่งสามารถทนความร้อนได้ถึง 66 องศาเซลเซียส จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า clottable protein มีขนาด 380 กิโลดาลตัน (kDa) โดยการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ MALDI-TOF mass spectrometry ซึ่งพบว่ามีโครงสร้างของ amino acid และขนาดของโปรตีนคล้ายกับที่พบในกุ้งชนิดอื่น ๆ ทั้ง prawns, lobster และ crayfish ด้วย

Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือด ใน crayfish พบว่า ในเม็ดเลือดทั้งชนิด semi-granular cell และ large granular cell รวมถึงเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อมีกิจกรรมที่เกิดการแข็งตัวของเลือดอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TGase แต่กิจกรรมดังกล่าวกลับไม่พบใน hepatopancreas และน้ำเลือด และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ nucleotide พบว่า TGase ของ crayfish มีความคล้ายคลึงกันมากกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

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

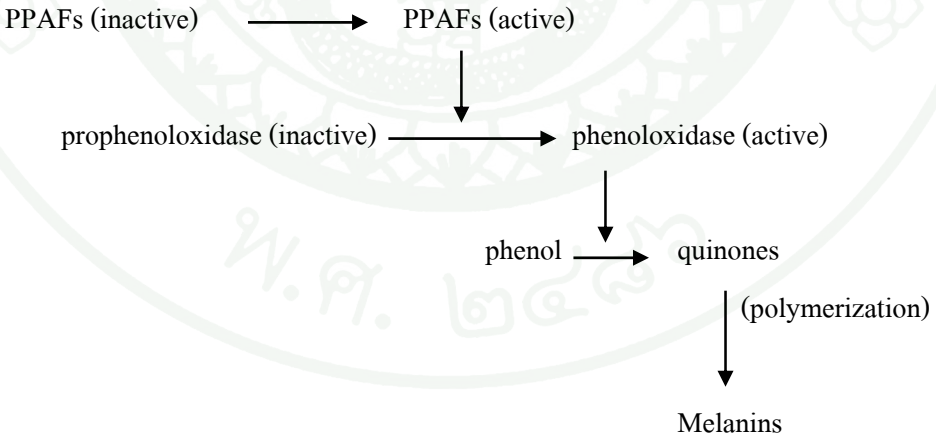
2) ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติ้งซิสเตม

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) ของครัสตาเซียโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide : LPS) เปปติโดกลัยแคน (peptidoglycan : PG) และ เบต้ากลูแคน (β-1,3-glucan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ฟีนอลออกซิเดสจะไป oxidize สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็น melanin ได้ในที่สุดหน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส เช่นเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและเชื้อรา (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992; Bachère *et al*., 1995)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติ้งซิสเตมเป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอม และควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง เมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ซึ่งส่งผลให้เกิดการหลั่งสารพวก proenzyme และ substrates ได้แก่ เอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยเอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่ยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ (inactive) จะต้องถูกกระตุ้นด้วยสารที่เรียกว่า serine proteinase (SP) หรือเรียกว่า prophenoloxidase activating factor/enzyme (PPAFs) (Söderhäll and Cerenius, 1998) และมีการทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน ส่งผลให้เอนไซม์ prophenoloxidase สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ (active) (Hose *et al.,* 1987) โดยเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า เอนไซม์ phenoloxidase (PO) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ phenoloxidase สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารฟีนอล (phenol) ให้เปลี่ยนเป็นสารควิโนน (quinone) และเกิดกระบวนการ polymerization ของสารควิโนน เกิดเป็นสาร melanin โดยกระบวนการเกิดสาร melanin มีชื่อเรียกอีกว่า melanin formation หรือ melanization ดังสมการ



โดยเอนไซม์ prophenoloxidase อยู่ในกรานูลในไซโทพลาซึมของเม็ดเลือดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงในซีรัมของกุ้ง (Perazzolo and Barracco, 1997) และมีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง (Sung *et al.,*1996; Perazzolo and Barracco, 1997) จากการศึกษาของ Söderhäll and Smith (1983 b) ได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean หลายชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยใช้สารละลาย Percoll 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell มีค่าเอนไซม์ prophenoloxidase สูงถึง 1,249.51 $\pm$ 313.36 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนใน hyaline cell มีค่าเอนไซม์ prophenoloxidase ค่อนข้างต่ำ คือ 198.95 $\pm$ 78.75 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ทวีศักดิ์ (2547) รายงานว่าค่าเอนไซม์ prophenoloxidase ในกุ้งกุลาดำ มีการเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งจากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase สูงที่สุด

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

การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายกุ้ง มีการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยจะตอบสนองทั้งภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดและภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ส่งผลให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับเชื้อก่อโรค โดยจำนวนเซลล์เม็ดเลือดจะลดลงทันทีในชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่สองและที่สาม ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอยู่ในระดับต่ำคงที่หลังจากชั่วโมงที่สี่ จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (กิจการ และคณะ, 2543 ง) นอกจากนี้พบว่าอวัยวะ ได้แก่ เหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี และผลผลิตสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการ prophenoloxidase activating system

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง คือ ต่อมน้ำเหลือง (Martin *et al.*, 1993) hemopoitic tissue ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิด โดยเซลล์เม็ดเลือดมีการกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร เซลล์เม็ดเลือดที่มักจะพบ คือ hyaline cell ซึ่งพบเศษเซลล์ และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และเกิด autophagic vacuoles (กิจการ และคณะ, 2543 ง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

3) สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

ชัยชาญ (2545) ได้รายงานว่าสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น พบได้ในส่วนของซีรัมและส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดที่แตก มีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด และไม่ทนต่อความร้อน

4) แอกกลูตินิน (agglutinin)

พบในน้ำเลือดของครัสเตเซียน agglutinin เป็นสารที่ก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอม นอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์ด้วย (Vargas-Albores, 1995)

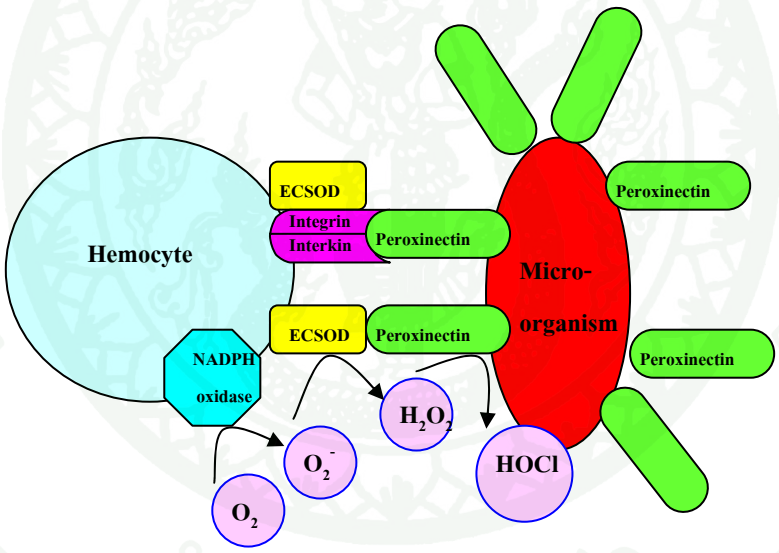
5) การหลั่งสารโปรตีนพวก peroxinectin

เป็นสารที่คล้ายไซโทไคน์ (cytokine-like factors) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ช่วยในการประสานงาน (พชรวดี, 2549) ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสาร peroxinectin เป็นสารชนิดโปรตีนมีขนาดของโมเลกุลประมาณ 89.1 kDa (Liu *et al*., 2004) จะทำหน้าที่เป็นสาร opsonin เคลือบบนผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่อยู่ในกระแสเลือด โดยจะกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้าและเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Smith and Chisholm, 1992) nodule formation และ encapsulation โดยช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับเชื้อก่อโรค และช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดกระบวนการ degranulation มากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และสารโปรตีนต่าง ๆ ภายในกรานูลถูกปล่อยออกมามากขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system

บนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งมีส่วนรองรับ (receptor) แบบจำเพาะกับสาร peroxinectin ที่เรียกว่า integrin, interkin และ extracellular superoxide dismutase (ECSOD) ทำหน้าที่เป็นส่วนรองรับของเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำให้เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและมีการหลั่งเอนไซม์ NADPH oxidase ออกสู่ผิวเซลล์เม็ดเลือด มีการใช้ออกซิเจนสูงมากภายนอกเซลล์ ได้ผลผลิตเป็น reactive oxygen intermediates (ROI) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ superoxide anion, hydrogen peroxide และ hypochlorous acid (HOCl) ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค โดยเฉพาะ hypochlorous acid ซึ่งมีสภาพเป็นกรดรุนแรง ส่งผลให้ผนังเซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกออกได้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การทำงานของสารโปรตีนพวก peroxinectin

ที่มา: ชยพร (2552)

6) การหลั่งสารโปรตีน (protein released)

เป็นสารโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial peptide) มีการหลั่งอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ของเซลล์เม็ดเลือดและมีการตอบสนอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างรวดเร็วต่อแบคทีเรีย โดยมีขนาดโมเลกุลโปรตีนประมาณ 6.5 kDa สารโปรตีนบางชนิดที่หลั่งออกมานั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมาก เช่น

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

lysosome C type หน้าที่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลายระบบ osmoregulation ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

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

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

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

สารโปรตีนพวก protein released สามารถพบได้ทั้งส่วนของน้ำ ซีรัมและในสารละลายเม็ดเลือดที่แตก (hemocyte lysate supernatant)

6. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งขาว

กิจการ และคณะ (2543 ค) พบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustacean ในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมมีทั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นโดยการตอบสนองของเซลล์และของเหลวในร่างกาย (cellular and humoral response) (กิจการ และคณะ, 2543 ค) ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบคือโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในซีรัม เช่น แอกกลูตินิน (agglutinin) ฮีโมไลซิน (hemolysin) ไลโซซายม์ (lysozyme) และโปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) เซลล์เม็ดเลือดซึ่งจะก่อให้เกิดกระบวนการเกาะกลุ่ม (adhesion) phagocytosis การห่อหุ้มโดยวิธี encapsulation และ melanization และระบบอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น การแข็งตัวของเลือด และสมานแผล และ prophenoloxidase activating system (Martin *et al.,* 1993)

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งคือต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด รวมทั้งอวัยวะต่าง ๆ ที่มีเซลล์จับกินอยู่กับที่กระจายอยู่ (Johnson, 1987)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ค) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายโดยจำนวนเม็ดเลือดจะลดลงทันทีในชั่วโมงแรกหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งในชุดควบคุมนับได้ $3.36 \pm 1.85 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่ชุดที่ได้รับการฉีดเซลล์ยีสต์มีจำนวนเม็ดเลือด $2.12 \pm 1.96 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร และจำนวนเม็ดเลือดในชุดทดลองจะลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 2 และที่ 3 คือมีค่า $1.95 \pm 1.21 \times 10^4$ และ $1.28 \pm 0.44 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจะอยู่ในระดับต่ำคงที่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดในชุดควบคุมจะปกติอยู่ในระดับ $3.28 \pm 1.26 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดยีสต์ และจะเข้าสู่ระดับปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นพบว่าเหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมจะมีเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเมื่อฉีดยีสต์เข้าไปในตัวกุ้ง จะพบเซลล์ของยีสต์ในเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวภายใน 1 ชั่วโมง ในระยะแรกของการจับกินจะมีเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ และเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยว ๆ เข้ามาจับกิน หลังจากผ่านไป 3-9 ชั่วโมง มีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้น จนเห็นเป็นกลุ่มใหญ่ขึ้นที่เรียกว่า nodule formation ซึ่งจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจะมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดน้อยลงและเมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมง หลังจากฉีดยีสต์เข้าสู่ตัวกุ้งหรือมากกว่านั้น จะพบว่ามีเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมในส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้นจนกลายเป็นแคปซูลขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะค่อย ๆ ถูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำจัดออกไป เมื่อสิ่งแปลกปลอมถูกกำจัดออกนอกร่างกายเม็ดเลือดที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ก็กลับเข้าไปในระบบหมุนเวียน ปริมาณเม็ดเลือดจึงค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้นจนเข้าสู่สภาวะปกติ พบลักษณะของ nodule formation หรือ encapsulation กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง hepatopancreas หัวใจ เหงือก ซึ่งกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีเซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียน และเซลล์จับกินกับที่ เข้ามาเกี่ยวข้องเป็นหลัก ในระยะสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้าง melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการของ prophenoloxidase

Fontaine and Lightner (1974) พบว่าหลังจากฉีดอนุภาคของสีคาร์มีน (carmine) เข้าไปในเนื้อเยื่อกุ้ง Atlantic white shrimp (*Penaeus setiferus*) ภายใน 1 ชั่วโมง จะมีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมอนุภาคสี เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุภาคสีก็จะมีทั้งเม็ดเลือดและเซลล์จับกินกับที่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยอนุภาคสีสามารถตรวจพบคงอยู่ในตัวกุ้งได้นาน 33 วัน

กิจการ และคณะ (2543 ค) รายงานว่า เซลล์จับกินกับที่เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ากระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร ลักษณะของเซลล์จับกินกับที่ต่างจากเม็ดเลือดกุ้งคือไม่พบแกรนูลภายในไซโทพลาซึม มี vacuole ขนาดใหญ่อยู่ในไซโทพลาซึม และมักพบเศษเซลล์ และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และเกิดจากโครงสร้างที่พบแสดงให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากตัวกุ้งเกิดขึ้นได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็นสิ่งไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่มีผลทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ตอบสนองสิ่งแปลกปลอมนั้นกุ้งก็สามารถจะทำลายและขับออกมาภายนอกตัวได้ แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นเชื้อโรค เช่นแบคทีเรียหรือไวรัสที่สามารถสร้างสาร hemolysin ย่อยสลายเม็ดเลือด สร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ย่อยสลายเปลือกกุ้งรวมถึงอนุภาคของไวรัส เชื้อรา และโพรโทซัวชนิดต่าง ๆ ที่เข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยตรง หรือสร้างสารรบกวนกิจกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกุ้งลดลงและก่อให้เกิดโรคได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

7.1 คุณภาพน้ำ

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดส่งผลให้การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง กุ้งเกิดสภาวะการติดเชื้ออย่างรุนแรง โดยคุณภาพน้ำที่สำคัญที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ได้แก่

1) ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอชของน้ำ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากในรอบวันหรือมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (กิจการและคณะ, 2543 ง) จากการศึกษาของ Allan and Maguire (1992) ได้ทดลองพบว่าน้ำที่มีค่า พีเอช 3.7 ส่งผลให้กุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 96 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงกุ้งที่พีเอช 5.9 เป็นระยะเวลา 23 วัน ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง 5 เปอร์เซ็นต์

2) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ในสภาวะที่ออกซิเจนละลายน้ำต่ำจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพฤติกรรมการดำรงชีวิต โดยกุ้งจะเคลื่อนที่ช้าลงเพื่อลดกิจกรรมการใช้ออกซิเจนในร่างกาย และจะว่ายน้ำสู่ผิวน้ำเพื่อรับออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลงส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Seidman and Lawrence (1986) พบว่าที่ระดับออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไม (Martinez-Palacios *et al*., 1996) มีอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัวลดลง

3) ผลของอุณหภูมิต่อระดับภูมิคุ้มกัน พบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จากการศึกษาของ Yu (1993) เมื่ออุณหภูมิต่ำลงและมีการเลี้ยงกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมลดลง ซึ่งทำให้กุ้งมีอัตราการหายใจและน้ำหนักตัวลดลง โดยกุ้งที่เลี้ยงใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตู้ทดลองที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบวันมาก ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและมีผลต่อโปรตีนในซีรัมได้ในที่สุด

4) ความเค็มมีผลต่อตัวกุ้งขาว เนื่องจากความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำ ในน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที มีค่า osmolality ใกล้เคียงกับในตัวกุ้ง โดยกุ้งขาวมีค่า isoosmotic point (IOP) เท่ากับน้ำความเค็ม 24.7 พีพีที จึงทำให้กุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที ไม่ต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ส่งผลให้พลังงานและสารอาหารที่ได้รับมาจากอาหารได้นำไปใช้ในการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไป กุ้งต้องนำพลังงานที่ได้มาใช้ในการปรับตัวเป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้เหลือพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีน้อยลง

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

Chen and Cheng (1993) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *P. chinensis* ที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีค่าของแอมโมเนียสูง (มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะทำให้ค่าโปรตีนในซีรัมลดต่ำลงกว่ากุ้งที่อาศัยในน้ำปกติ

Schnutt and Santos (1999) พบว่ากุ้ง *P. paulensis* มีค่าพีเอชของน้ำเลือดสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแอมโมเนียมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

กิจการ และคณะ (2543 ข) พบว่าในสภาพที่พีเอชของน้ำต่ำกว่าค่าปกติ (6.0) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase แต่มีผลให้ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมที่พีเอชปกติ (7.8) จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจนละลายน้ำปกติ (5.0-5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าความสามารถการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดต่ำลงกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง

7.2 ชีววิทยาบางประการของกุ้ง

กุ้งมีช่วงระยะเวลาของการลอกคราบ และระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Moullac *et al*., 1998) กุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการลอกคราบของกุ้ง เนื่องจากน้ำจากตัวกุ้งจะมีการแพร่ออกและน้ำจากภายนอกจะมีการแพร่เข้าสู่ร่างกาย โดยกุ้งเมื่อเข้าสู่ระยะลอกคราบตัวกุ้งจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายเพื่อให้ร่างกายขยายตัวและลอกออกจากคราบเดิม เมื่อลอกคราบเสร็จตัวกุ้งจะมีการดึงแร่ธาตุกลับเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะแร่ธาตุแคลเซียม เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างให้เปลือกแข็ง มักจะพบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ ซึ่งแร่ธาตุในน้ำมีไม่เพียงพอในการสร้างเปลือกในขณะที่มีน้ำแพร่เข้าสู่ตัวกุ้งตลอดเวลา ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอและตายขณะเปลือกยังนิ่มอยู่ แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำที่ความเค็มสูง น้ำในร่างกายกุ้งมีการแพร่ออกตลอดเวลาแม้จะอยู่ในระยะก่อนลอกคราบซึ่งกุ้งต้องมีการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้กุ้งลอกคราบไม่ได้และตายในที่สุด จากการศึกษาของ Santos and Nary (1987) ในปู *Chasmagnathus granulata* พบว่าความเค็มของน้ำมีผลทำให้น้ำตาลในเลือดลดต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปลี่ยนจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ไปเป็นน้ำจืด

8. แบคทีเรียสกุล *Vibrio*

แบคทีเรียสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งเป็นสาเหตุการตายของกุ้ง และปลาจำนวนมากซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic แกรมลบ (gram-negative) รูปร่างเป็นแท่งโค้ง (curved rods) หรือตรงขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้าง endospore หรือ microcyst เมื่ออยู่ในอาหารเหลว (liquid media) จะมีการเคลื่อนที่โดยใช้ monotrichous หรือ multitrichous flagella เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) สร้าง lateral flagella จำนวนมาก ทุกสายพันธุ์เป็น chemoorganotroph ต้องการ sodium ion เป็นตัวกระตุ้นสำหรับการเจริญโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5 – 700 mM. ส่วนใหญ่จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย D-glucose และ NH_4Cl มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ต้องการสารอินทรีย์เพื่อการเจริญ และส่วนใหญ่ไม่สร้างก๊าซทุกชนิดสามารถใช้ D–glucose, D–fructose, maltose และ glycerol ส่วนใหญ่จะให้ปฏิกิริยา oxidase เป็นบวกทุกชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบได้ในช่วงความเค็มค่อนข้างกว้าง พบได้ทั่วไปในทะเล และบริเวณชายฝั่งรวมทั้งผิวลำตัวและในลำไส้ของสัตว์ทะเล บางชนิดจะพบในแหล่งน้ำจืด หลายชนิดจะเป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล เปอร์เซ็นต์โมลของเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 38 – 51 หลาย ๆ สายพันธุ์ของ *Vibrio* สามารถเคลื่อนที่ได้บนอาหารแข็ง การเคลื่อนที่จะเกิดจากความยาวของเซลล์ และมี lateral flagella เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นผลจากสภาพทางกายภาพ เคมี รวมทั้งความเข้มข้นของอาหาร องค์ประกอบของอาหาร และอุณหภูมิแบคทีเรียสกุลนี้สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด (Buchanan *et al.,* 1974) และสามารถเจริญได้ดีใน selective media คือ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS agar) เจริญได้ในสภาพที่มีพีเอชเท่ากับ 9 และก่อให้เกิดโรคแบบ secondary infection คือเมื่อสัตว์น้ำเกิดอาการเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมร่างกายอ่อนแอทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายได้จึงเรียกว่าเป็น opportunistic pathogen (Prosser *et al.,* 1996)

8.1 *Vibrio harveyi*

V. harveyi เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นแท่งตรง สร้าง lateral flagella บนอาหารแข็ง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ผลบวกใน D–mannose, cellobiose, D–gluconate, D–glucuronate, heptanoate, α-ketoglutarate, L–serine, L–glutamate และ L–tyrosine ให้ผลลบใน arginine dihydrolase, acetoin หรือ diacetyl และสามารถใช้ β-hydroxybutyrate, D–sorbitol, ethanol, L–leucine, γ-aminobutyrate และ putrescine เปอร์เซ็นต์โมลของเบส G+C DNA เท่ากับ 46–48 แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมาก (Ruangpan *et al.,* 1995) แต่ก่อนพบว่าเป็นสาเหตุการตายของกุ้งวัยอ่อนเท่านั้น แต่ต่อมาพบว่าเป็นสาเหตุการตายของกุ้งในบ่อเลี้ยงด้วย (Baticados *et al.,* 1990; Lavilla-Pitogo *et al.,* 1990) *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (Chen *et al.,* 1992) ความรุนแรงของการติดเชื้อเรืองแสงนั้น มีความสัมพันธ์กับชนิด และการเจริญเติบโตของกุ้ง ดารุณี และคณะ (2530) รายงานว่าการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยมักเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นสารเรืองแสงในน้ำทะเลที่ใช้เพาะฟัก และมีสารเรืองแสงอยู่ตามซากกุ้ง และลูกกุ้งมีชีวิตในเวลากลางคืน และเมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงจากลูกกุ้งที่ป่วยเป็นโรคพบว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* จากการตรวจสอบจะพบเชื้อนี้มากในบ่อที่มีการตายของลูกกุ้ง 70-100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าลูกกุ้งระยะ nauplius มีการยอมรับเชื้อ *V. harveyi* ดีที่สุด ขณะที่กุ้งระยะ mysis และ โพสลาร์วา (post larva) มีการยอมรับเชื้อน้อยลงตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lavilla-Pitogo *et al.* (1992) รายงานว่าแหล่งสำคัญของแบคทีเรียเรืองแสงจะอยู่ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งจะถูกปล่อยออกมากในน้ำในขณะที่แม่กุ้งมีการวางไข่โดยแบคทีเรียจะอยู่บริเวณผิวส่วน chorion ของไข่กุ้งหลังจากวางไข่แล้ว 8 ชั่วโมง

8.2 ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi*

กุ้งที่ติดเชื้อเริ่มแสดงอาการเซื่องซึม (จรีพร และคณะ, 2546) ว่ายน้ำเกยขอบบ่อ เรืองแสงในที่มืด และเริ่มมีการตายมากขึ้นตามระยะเวลาการติดเชื้อ ลักษณะเด่นภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ คือ ตัวกุ้งมีสีเข้ม ลำตัวสีแดง (จรีพร และคณะ, 2546) ตัวหลวม ตัวขาวขุ่น ว่ายน้ำไม่สะดวก เหงือกมีสีแดงหรือน้ำตาล นอกจากนั้นเปลือกมีจุดสีดำบนเปลือกและรยางค์กร่อนบางบริเวณ มีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะระยะโพสลาร์วา และระยะวัยรุ่น (juvenile) มีรอยแผลสีดำที่เปลือกหรือเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น (Lightner, 1988; Alday de Graindorge and Flegel, 1999) มีการเรืองแสงอยู่ตามซากกุ้ง มองเห็นชัดในที่มืด กุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบบริเวณขอบบ่อ

8.3 การเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของตัวกุ้ง

การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด กุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* จะมีปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนต่ำกว่ากุ้งปกติมาก เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้ง เม็ดเลือดกุ้งจะเข้ามาล้อมรอบเพื่อจับและกำจัดออกนอกตัว ส่งผลให้เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง และเมื่อแบคทีเรียเข้าในกระแสเลือด แบคทีเรียจะใช้เลือดซึ่งมีโปรตีนและสารอาหารต่างๆ เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ Luo (1996) ศึกษาในกุ้งขาวจีน *P. chinensis* ที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น และปริมาณของโปรตีนในซีรัมลดลงเล็กน้อย

กิจการ และคณะ (2543 ข) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคลดลงทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และความว่องไวของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม โดยกุ้งที่เป็นโรคปริมาณเม็ดเลือดจะลดลงซึ่งส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.4 ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ในช่วงแรกของการติดเชื้อ hepatopancreas จะมีขนาดเล็กลง (atrophy) (จรีพร และคณะ, 2546) และต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ขึ้น เซลล์ภายใน hepatopancreas ตายเล็กน้อย ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ ไขมันที่สะสมไว้ใน hepatopancreas น้อยลง พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวใน hepatopancreas และลำไส้ hepatopancreas ถูกทำลาย พบเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับเซลล์ที่ตายชัดเจน กุ้งที่ติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ hepatopancreas ต่อมน้ำเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ตายเป็นบริเวณกว้างมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับมากขึ้น กุ้งทยอยตาย กุ้งที่ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ภายใน hepatopancreas จะตายจำนวนมากและเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis กุ้งไม่กินอาหาร อ่อนแอและตายในที่สุด สำหรับ systemic vibriosis จะพบการรวมตัวกันของเม็ดเลือดในลักษณะของ nodule formation กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อ (Jiravanichpaisan *et al*., 1994)

Lee *et al.* (1995) พบว่าเชื้อ *V. harveyi* สามารถผลิตสาร hemolysin ย่อยสลายเม็ดเลือด ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลง เมื่อกุ้งได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอม ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง และเมื่อนำกุ้งป่วยมาแยกเชื้อจากบริเวณ hepatopancreas หรือจากน้ำเลือด จะพบเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก กล้ามเนื้อขุ่น เลือดแข็งตัวช้า (วรณัฏฐ์, 2545) ในกุ้งกุลาดำที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง hepatopancreas จะมีขนาดเล็กลง (ชลอ, 2543)

ชัยชาญ (2545) ได้ทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่กล้าม เนื้อกุ้งพบว่าในชั่วโมงที่ 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป จำนวนเซลล์เม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและหลังจาก นั้นมีจำนวนไม่แตกต่างจากกุ้งปกติซึ่งสอดคล้องกับ Martin *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Sicyonia ingentis* พบว่าปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของระดับออกซิเจนต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

1.1 ผลของระดับออกซิเจนต่อการกินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

1.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมขนาดเฉลี่ย 5-6 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงของเอกชนมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 5,000 ลิตร ในน้ำความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ

1.1.2 การวางแผนการทดลอง

คัดเลือกกุ้งที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อที่ 1.1.1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือมีน้ำหนักเฉลี่ย 7±1 กรัม มาปรับสภาพในตู้กระจกขนาดความจุ 100 ลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที ที่อุณหภูมิ 29±1 ^{O}C จำนวนชุดการทดลองละ 3 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอด 24 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 6.00 น.- 18.00 น.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 3 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ในระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เล็กน้อย เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2

1.1.3 การให้อาหาร

สำหรับปริมาณอาหารที่ให้ใช้ตามวิธีของชลอและพรเลิศ (2547) โดยกุ้งขาวแวนนาไมขนาดน้ำหนัก 7±1 กรัม ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 3.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน แบ่งให้อาหารจำนวน 3 มื้อ มื้อละ 1.23 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว แต่ช่วงเวลาที่สังเกตพฤติกรรมการกินอาหารจะทำในช่วงเวลาประมาณ 13.00 น. เนื่องจากในช่วงเวลาตอนเย็นจนกระทั่งเช้าวันรุ่งขึ้นทุกชุดการทดลองมีการเปิดเครื่องให้อากาศอย่างเต็มที่ให้กับกุ้งเพราะในชุดการทดลองที่ต้องการควบคุมระดับออกซิเจนในระดับต่ำนั้นถ้าลดปริมาณออกซิเจนให้ต่ำติดต่อกันตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดลองจะทำให้กุ้งบางส่วนตาย โดยตั้งแต่ตอนเช้าของทุกวันจะเริ่มควบคุมระดับออกซิเจนให้อยู่ในช่วงที่ต้องการในแต่ละชุดการทดลองแล้วจึงเริ่มการทดลอง ปริมาณอาหารที่ให้ต่อมื้อเมื่อชั่งปริมาณอาหารแล้วทำการนับจำนวนเม็ดอาหารเพื่อที่จะจดบันทึกเม็ดอาหารที่เหลือหลังจากให้อาหาร 15, 30, 45 และ 60 นาที ทำการทดลองเป็นเวลา 7 วัน

1.2 ผลของระดับออกซิเจนต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

คัดเลือกกุ้งที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อที่ 1.1.1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือมีน้ำหนักเฉลี่ย 7±1 กรัม นำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร ด้วยน้ำความเค็ม 25 พีพีที วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ใส่กุ้งจำนวนถังละ 30 ตัว (53 ตัวต่อตารางเมตร) ชุดการทดลองละ 6 ถัง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับ มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอด 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 18.00 น.-06.00 น.

ชุดการทดลองที่ 3 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ในระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เล็กน้อย เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2

โดยศึกษาผลของระดับออกซิเจนต่อการการเจริญเติบโต การรอดตาย และอัตราการแลกเนื้อจำนวน 3 ถัง และอีก 3 ถัง เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 3.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน มีการปรับปริมาณอาหารตามน้ำหนักของกุ้งในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน

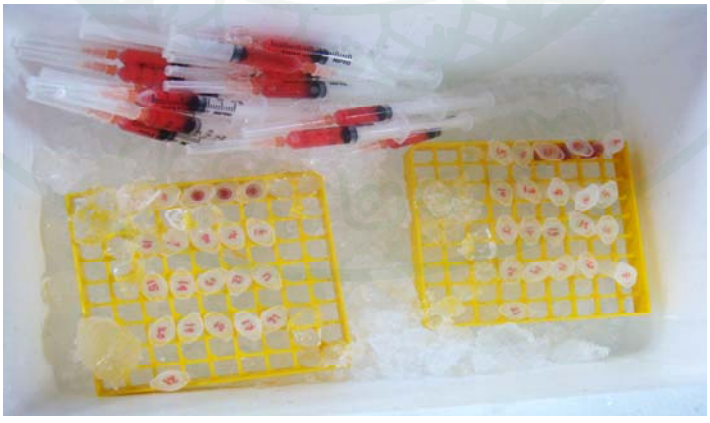
ทุกชุดการทดลองมีการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำ วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ สุ่มชั่งน้ำหนักเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม ทุก 10 วัน (ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะทำการตรวจวัดทุกวันเพื่อให้ได้ค่าตามที่กำหนดไว้) สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำมีดังนี้ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ และอุณหภูมิวัดโดยใช้เครื่อง YSIDO200-4M พีเอชของน้ำโดย pH meter ORION Model Sa520 วัดความเค็มโดย salinometer ปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia nitrogen: TAN) ใช้วิธี phenol-hypochloride ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995) ไนไตรท์ (nitrite -nitrogen) ใช้วิธี colorimetric method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995) สำหรับความกระด้างรวม (total hardness) และความเป็นด่างรวม (total alkalinity) ใช้วิธี tritation method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)

นับจำนวนกุ้งที่เหลือในถังทดลองทุก 10 วัน นำข้อมูลมาคำนวณอัตราการรอดตาย และชั่งน้ำหนักกุ้งโดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอล เพื่อหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกุ้งแต่ละตัวก่อนการทดลองและในทุก 10 วัน นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (อนันต์ชัย, 2542) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม โดยสุ่มกุ้งถังละ 3 ตัว โดยดูดเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้ง (ภาพที่ 2) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25G ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) (ภาพที่ 3) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity) และ การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (superoxide dismutase activity) ตามวิธีดังนี้

ภาพที่ 2 การดูดเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ 3 เข็มฉีดยาขนาด 25G ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การตรวจนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้ง

1) ดูดเลือดจากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้ง โดยในหลอดฉีดยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

2) ใช้ micropipette ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer (ภาพที่ 4)

3) คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร โดยหาค่าได้จาก

ปริมาตรของ hemacytometer = กว้าง x ยาว x สูง

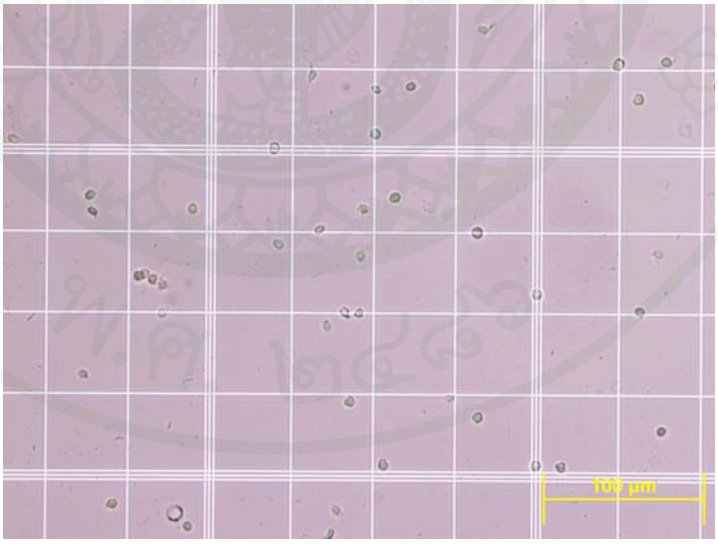
= 0.2 มิลลิเมตร x0.2 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร

= 0.02 เซนติเมตร x 0.02 เซนติเมตรx 0.01 เซนติเมตร

= 0.000004 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 0.000004 มิลลิลิตร

= 4×10^{-6} มิลลิลิตร

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อมิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 1/4 x 10^{6} x ค่า dilution ของน้ำเลือด



ภาพที่ 4 การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดกุ้งโดยใช้ hemocytometer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ตามวิธีของ Itami *et al*. (1994) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1) เจาะเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (เลือดกุ้ง: anticoagulant) 1:2 โดยดูดเลือดกุ้ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

3) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

4) ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และ ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

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

7) ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

8) หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

9) ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

10) หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

11) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

12) ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

13) ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

14) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

15) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

16) ทำสไลด์ถาวรโดยใช้น้ำยา permount

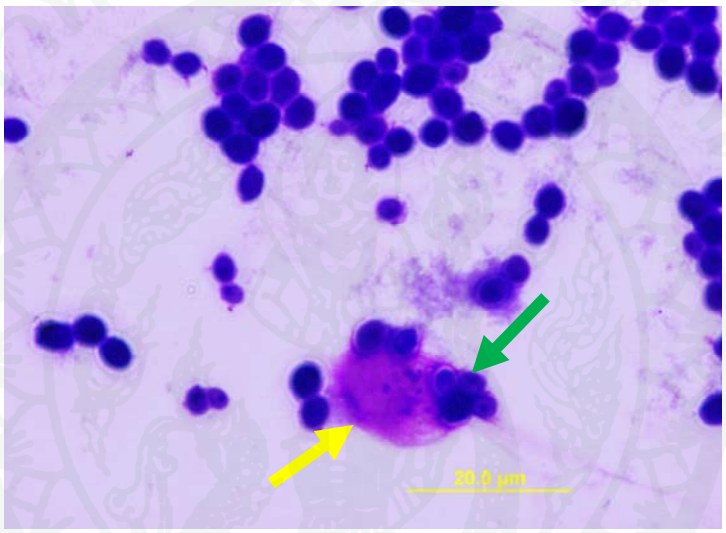
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป (ภาพที่ 5) คำนวณค่าได้จาก

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

กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

(% phagocytosis)



ภาพที่ 5 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม บริเวณที่ลูกศรสีเหลืองชี้คือ เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และบริเวณที่ลูกศรสีเขียวชี้คือเซลล์ยีสต์ (bar = 20 µm)

3. กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543 จ)

1) เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

2) เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วมาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอสำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้น ๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08 - 0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้

3) เจาะเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกุ้ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

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

5) นำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในระดับ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

6) นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรัมในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7) นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละหลอด โดยใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose agar (TCBS agar) จดบันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

4. กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543 จ)

1) เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย M-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

2) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3) นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลาย M-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4

4) ทำให้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

5) นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารป้องกันเลือดแข็งตัว สารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับทริปซิน L-dihydroxyphenylalanine และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

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

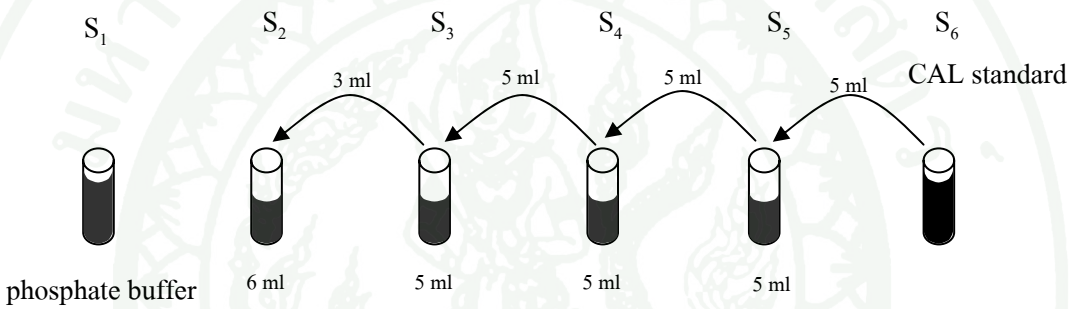
1 หน่วยของฟีนอลออกซิเดส = $\triangle OD_{490}$/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

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

1) เตรียมสารมาตรฐาน S_1-S_6 จากสารละลาย CAL standard และ สารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD@ superoxide dismutase

ที่มา: ชยพร (2552)

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

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้ง

1) เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัวโดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ M-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

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

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย และ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการกินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

2.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1.1.1

2.1.2 การวางแผนการทดลอง

คัดเลือกกุ้งที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อที่ 2.1.1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือมีน้ำหนักเฉลี่ย 7±1 กรัม นำกุ้งมาปรับสภาพในตู้กระจกขนาดความจุ 100 ลิตร ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที ที่อุณหภูมิ 29±1^{O}C จำนวนชุดการทดลองละ 3 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอด 24 ชั่วโมง และควบคุมพีเอชให้อยู่ที่ 7.5 ± 0.5

ชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอด 24 ชั่วโมง และควบคุมพีเอชให้อยู่ที่ 8.5 ± 0.5

ชุดการทดลองที่ 3 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 18.00- 06.00 น. และควบคุมพีเอชให้อยู่ที่ 7.5 ± 0.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 4 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 18.00- 06.00 น. และควบคุมพีเอชให้อยู่ที่ 8.5 ± 0.5

ชุดการทดลองที่ 5 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ในระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เล็กน้อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 18.00- 06.00 น. และควบคุมพีเอชให้อยู่ที่ 7.5 ± 0.5

ชุดการทดลองที่ 6 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร 12 ชั่วโมง และอยู่ในระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เล็กน้อย เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 18.00 - 06.00 น. และควบคุมพีเอชให้อยู่ที่ 8.5 ± 0.5

การปรับค่าพีเอชของน้ำ

1) การลดพีเอชใช้ 0.5 M กรดบอริก (H_3BO_3)

2) การเพิ่มพีเอชใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $Ca(OH)_2$ หรือปูนขาว โดยละลายปูนขาวในถังไฟเบอร์กลาสจนกระทั่งอิ่มตัวจนตกตะกอน นำเฉพาะน้ำส่วนที่ใสมาใช้โดยจะค่อย ๆ เติมสารละลายที่เตรียมจนได้ระดับโดยปรับให้พีเอชมีค่าสูงขึ้นจนกว่าจะถึงระดับที่ต้องการทดลอง

การปรับปริมาณแอมโมเนียในน้ำ

ทุกชุดการทดลองจะปรับปริมาณแอมโมเนียรวมในน้ำให้อยู่ในระดับ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมสารละลายที่จะใช้ปรับปริมาณแอมโมเนียในน้ำโดยใช้แอมโมเนียม คลอไรด์ (NH_4Cl) ละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 38.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ammonia-N และทำให้เจือจางด้วยน้ำทะเลที่เตรียมไว้สำหรับทดลองให้ได้ความเข้มข้นของแอมโมเนีย ตามที่ต้องการโดยใช้สูตร

$$(N_1V_1) \text{ stock solution} = (N_2V_2) \text{ dilution}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลาย (mg/l ammonia-N)

V = ปริมาตรของสารละลาย (หน่วยเป็นมิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่อย ๆ ปรับปริมาณแอมโมเนียโดยเติมสารละลายที่เตรียมไว้ จนกระทั่งวันที่ 7 แอมโมเนียรวมในทุกชุดการทดลองมีค่าเฉลี่ยประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.1.3 การให้อาหาร

ตามวิธีการดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1.1.3

2.2 ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอช ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

คัดเลือกกุ้งที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อที่ 2.1.1 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือมีน้ำหนักเฉลี่ย 7±1 กรัม นำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร ด้วยน้ำความเค็ม 25 พีพีที แบ่งชุดการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 ใส่กุ้งจำนวนถังละ 30 ตัว (30 ตัวต่อตารางเมตร) ชุดการทดลองละ 6 ถัง โดยศึกษาผลของระดับออกซิเจนต่อการการเจริญเติบโตและการรอดตายจำนวน 3 ถัง และอีก 3 ถัง เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 3.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน มีการปรับปริมาณอาหารในระหว่างการทดลองตามน้ำหนักของกุ้ง ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 60 วัน

ทุกชุดการทดลองมีการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำ วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ สุ่มชั่งน้ำหนักเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต และศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม ทุก 10 วัน (ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ปริมาณแอมโมเนียรวม และพีเอช ทำการตรวจวัดทุกวันเพื่อให้ได้ค่าตามที่กำหนดไว้) สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ การศึกษาการเจริญเติบโต การรอดตาย อัตราการแลกเนื้อ และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม ทำวิธีการเดียวกับข้อ 1.2 ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3. การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไม

เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเป็นเวลา 60 วันนำกุ้งจากการทดลองที่ 1.2 และ 2.2 มาทำการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 1 วัน สุ่มกุ้งชุดการทดลองละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยการใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

2) ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร บันทึกค่า OD ที่ได้

3) ฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งทุกชุดการทดลองทุกตัว โดยฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุม ใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อในปริมาณและตำแหน่งเช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น เพื่อต้องการยืนยันว่า กุ้งในทุกชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการฉีด (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 7 ฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวกุ้งขาวแวนนาไม ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

4) จดบันทึกจำนวนกุ้งที่ตายทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกุ้งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งที่แสดงอาการป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5) นำตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ตรวจยืนยันผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ โดยการเก็บตัวอย่างกุ้งมาฉีดน้ำยา Davidson's fixative เข้าบริเวณ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ แช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative นานประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากนั้น นำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป ตามวิธีของ Bell and Lightner (1988)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลอง โดยวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์อาหารเหลือ อัตราการเจริญเติบโต การรอดตาย ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase การผลิต superoxide dismutase และจำนวนกุ้งที่รอดตายหลังจากฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (อนันต์ชัย, 2542) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 – พฤศจิกายน พ.ศ. 2554

แหล่งทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลอง

1. ผลของระดับออกซิเจนต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

1.1 ผลของระดับออกซิเจนต่อการกินอาหารอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

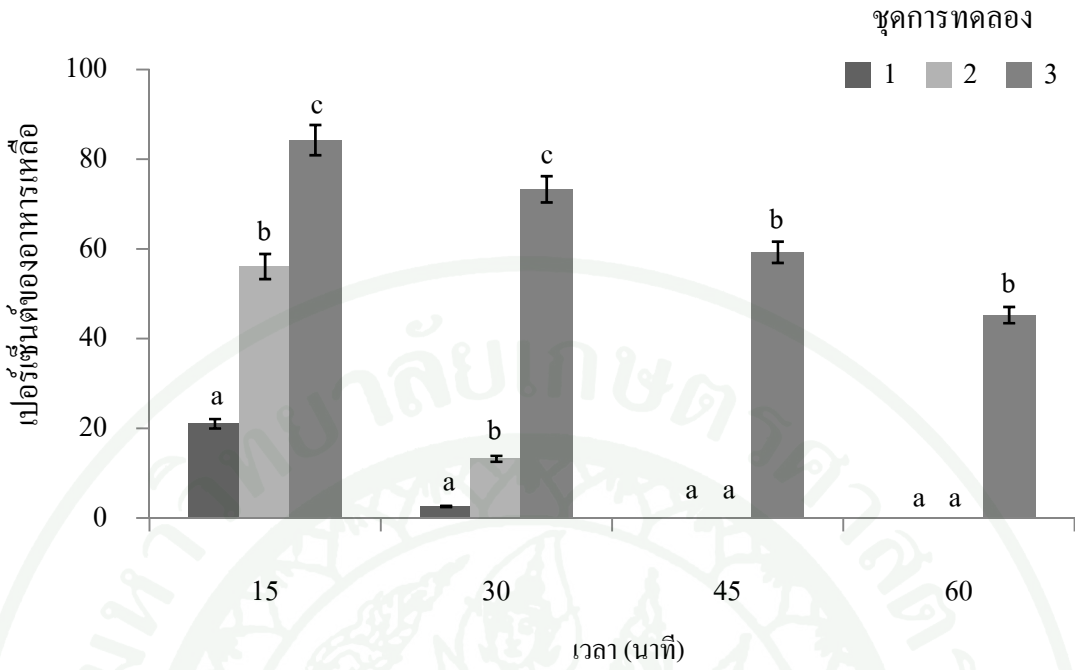
จากการทดลองพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้สูงกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่เกิน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกินอาหารหมดภายในเวลา 45 นาที ช้ากว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ที่เลี้ยงโดยมีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอดเวลา ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงโดยมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะกินอาหารน้อยและช้ากว่าชุดการทดลองอื่นๆ และกินไม่หมดภายในเวลา 45 นาที (ตารางที่ 3 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 3 ปริมาณอาหารที่เหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ

ชุดการทดลอง	ปริมาณอาหารเหลือ (เปอร์เซ็นต์)			
	15 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	21.03±5.43[a]	2.60±3.31[a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00[a]
2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	56.10±6.03[b]	13.22±5.67[b]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	84.28±6.00[c]	73.31±3.65[c]	59.27±5.04[b]	45.27±7.80[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ปริมาณอาหารที่เหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ

1.2 ผลของระดับออกซิเจนต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

1.2.1 ผลของระดับออกซิเจนต่อการเจริญเติบโต และการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วันพบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 28.16±2.77 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 (ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำอยู่ระหว่าง 2-4 และต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 25.01±1.81 และ 25.90±2.51 กรัม ตามลำดับ น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลองจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่วันที่ 10 ของการเลี้ยง โดยกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 จะมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 10.40±0.56 กรัมรองลงมาคือกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 9.54±0.54 และ 8.91±1.07 กรัมตามลำดับ และน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งทั้งสามชุดการทดลองจะแตกต่างกันเช่นนี้จนครบระยะเวลาการเลี้ยงที่ 60 วัน (ตารางที่ 4 และภาพที่ 9)

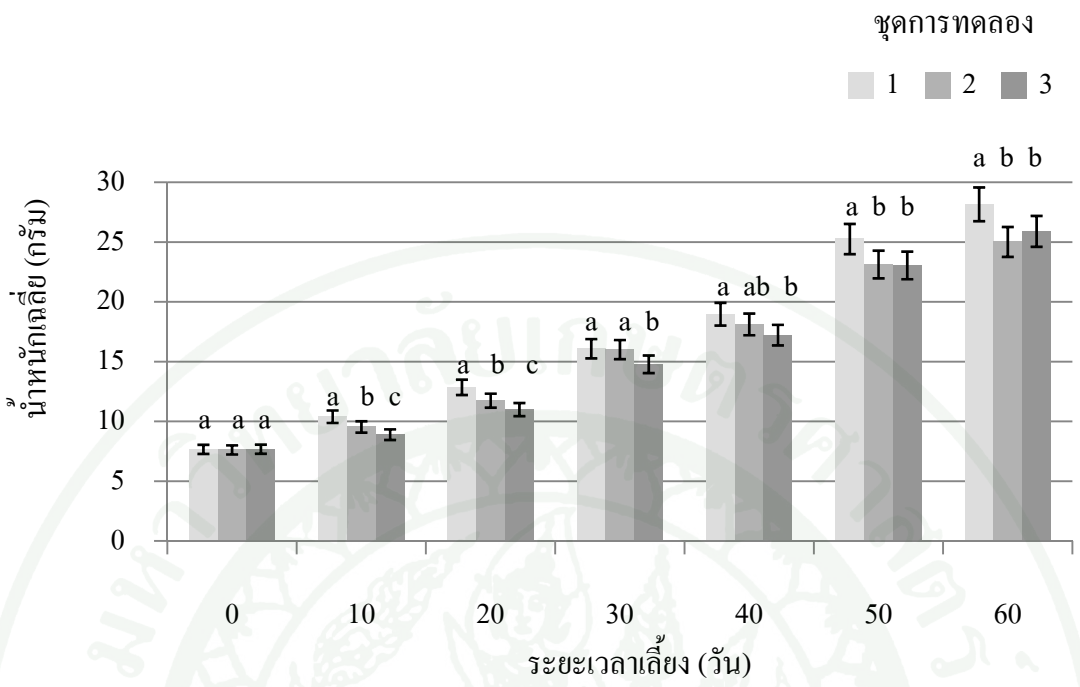
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	7.67±0.47[a]	7.62±0.45[a]	7.68±0.35[a]
10	10.40±0.56[a]	9.54±0.54[b]	8.91±1.07[c]
20	12.08±1.03[a]	11.74±0.59[b]	11.05±1.42[c]
30	16.00±1.38[a]	15.64±1.79[a]	14.32±1.81[b]
40	18.94±1.27[a]	18.12±0.81[ab]	17.22±2.96[b]
50	25.26±2.27[a]	23.13±2.55[b]	23.01±2.72[b]
60	28.16±2.77[a]	25.01±1.81[b]	25.90±2.51[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในการศึกษาครั้งนี้อยู่ระหว่าง 92 ถึง 56 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งที่เลี้ยงโดยมีระดับออกซิเจนละลายน้ำสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 1) มีอัตราการรอดตายสูงสุด 92.22±3.85 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยมีระดับออกซิเจนละลายน้ำระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 2) ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 81.11±13.47 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยมีระดับออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) ซึ่งมีอัตราการรอดตายของกุ้งต่ำที่สุด (56.67±8.82 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 10)

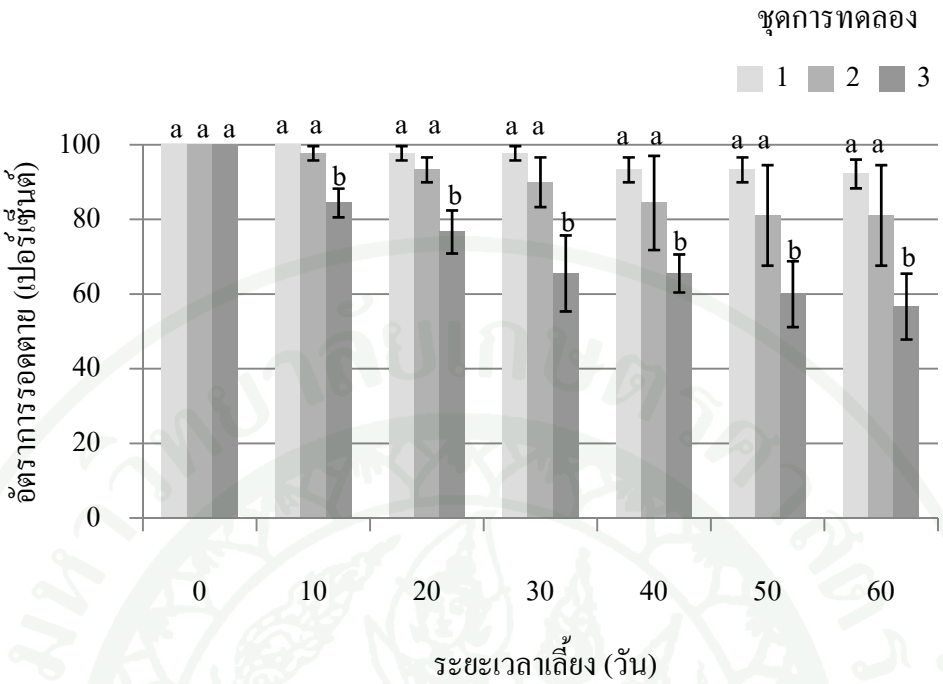
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	100.00±0.00[a]	100.00±0.00[a]	100.00±0.00[a]
10	100.00±0.00[a]	97.78±1.92[a]	84.44±3.85[b]
20	97.78±1.92[a]	93.33±3.33[a]	76.67±5.77[b]
30	97.78±1.92[a]	90.00±6.67[a]	65.56±10.18[b]
40	93.33±3.33[a]	84.44±12.62[a]	65.56±5.09[b]
50	93.33±3.33[a]	81.11±13.47[a]	60.00±8.82[b]
60	92.22±3.85[a]	81.11±13.47[a]	56.67±8.82[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

1.2.2 ผลของระดับออกซิเจนต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ได้ผลการทดลองดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) การตรวจนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้ง

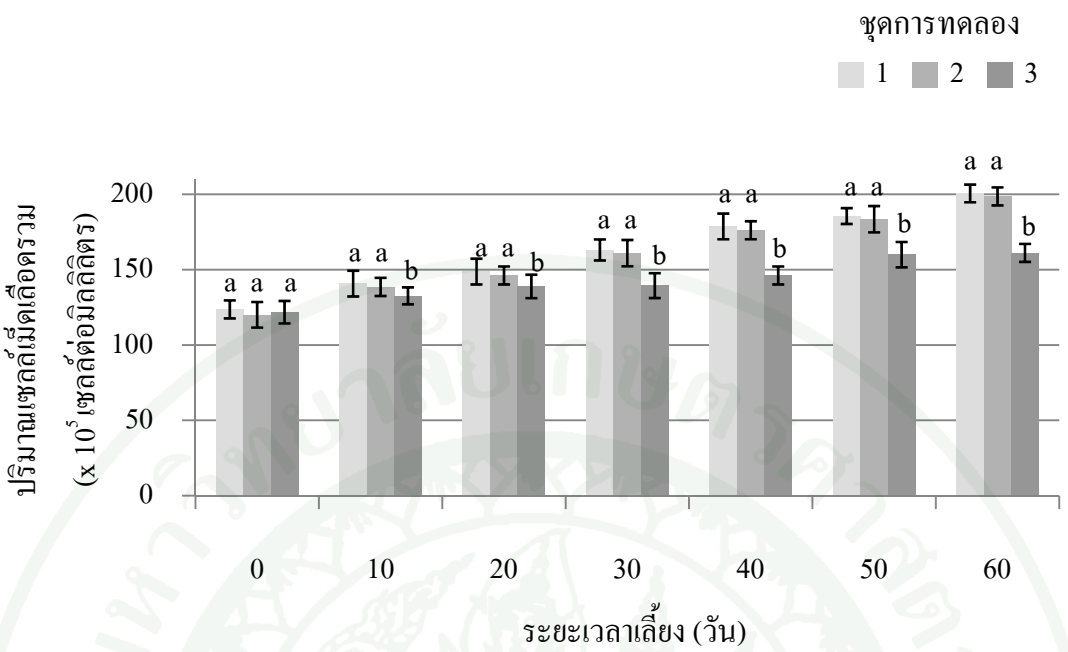
หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับ มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งสูงสุดคือ 200.63±5.85 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ 198.67±5.97 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) ซึ่งมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ 161.17±5.97 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจะพบว่าตั้งแต่วันที่ 10 ของการเลี้ยงจนกระทั่งครบระยะเวลา 60 วันปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งจะสูงที่สุดในกุ้งชุดการทดลองที่ 1 รองลงมาจะเป็นกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 6 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	123.67±5.97[a]	120.08±8.50[a]	121.80±7.47[a]
10	140.78±8.56[a]	138.59±6.03[a]	132.66±5.65[b]
20	148.75±8.54[a]	146.17±5.97[a]	138.91±7.80[b]
30	163.13±6.97[a]	161.02±8.75[a]	139.45±8.25[b]
40	178.75±8.54[a]	176.17±5.97[a]	146.17±5.97[b]
50	185.63±5.27[a]	183.52±8.75[a]	160.00±8.40[b]
60	200.63±5.85[a]	198.67±5.97[a]	161.17±5.97[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

2) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด 37.25 ± 8.94 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 37.00 ± 6.07 เปอร์เซ็นต์แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งเลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 26.33 ± 3.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 12)

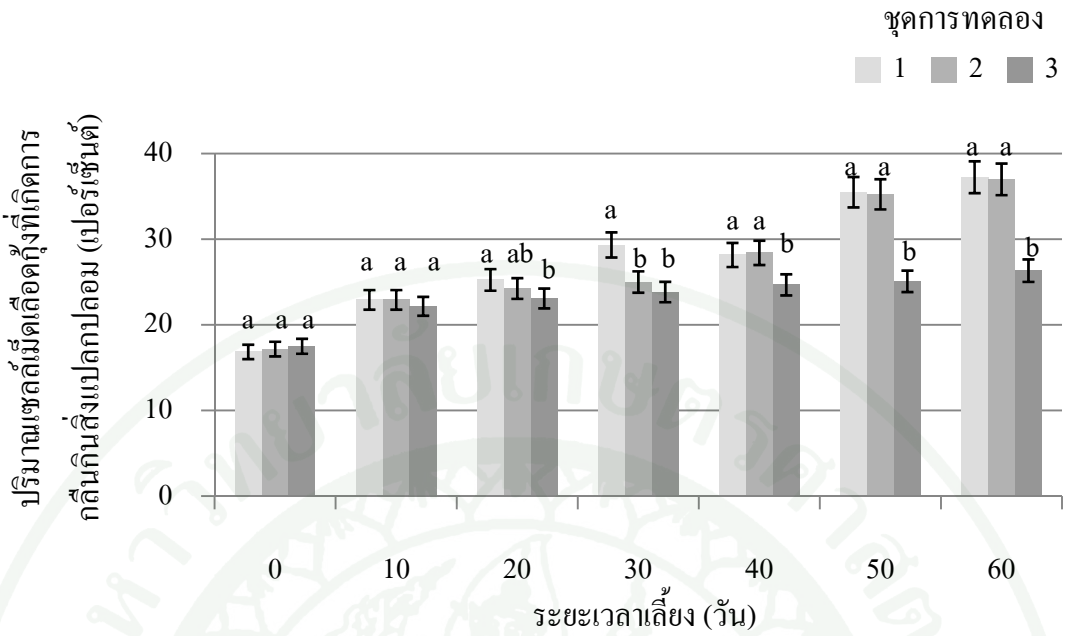
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (เปอร์เซ็นต์)		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	16.83±6.54[a]	17.17±5.56[a]	17.50±4.80[a]
10	22.92±7.67[a]	22.92±4.64[a]	22.17±6.51[a]
20	25.25±2.63[a]	24.25±2.79[ab]	23.08±2.12[b]
30	29.33±2.41[a]	25.00±2.77[b]	23.83±3.17[b]
40	28.17±2.70[a]	28.42±2.12[a]	24.67±3.85[b]
50	35.50±7.44[a]	35.25±7.15[a]	25.08±6.46[b]
60	37.25±8.94[a]	37.00±6.07[a]	26.33±3.10[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

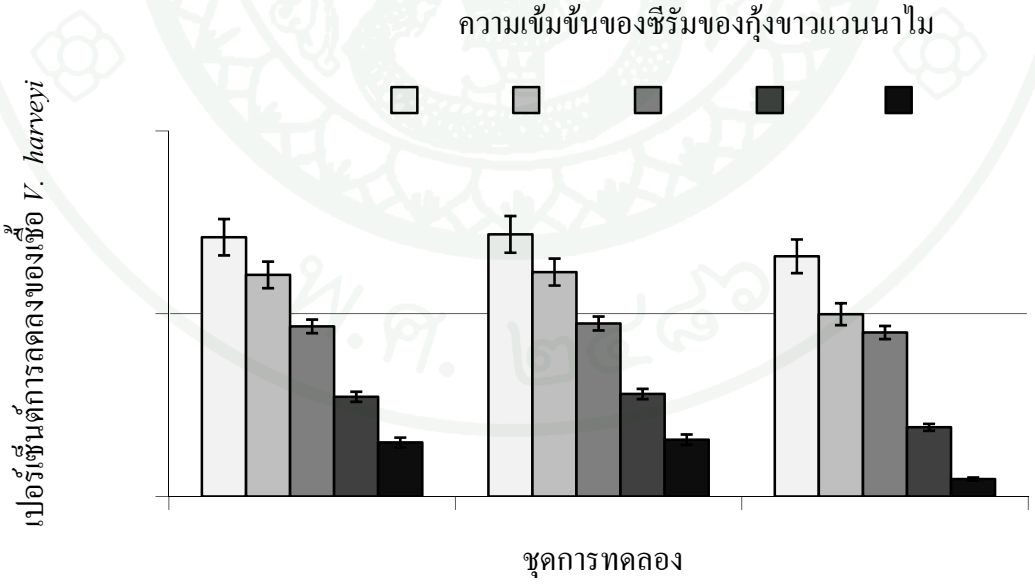
3) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1:8 ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองที่ 3 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 1:4 โดยในวันที่ 40 ของการเลี้ยงกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุดคือ 1:8 ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีค่าอยู่ที่ 1:4 และตั้งแต่วันที่ 50 ของการเลี้ยงพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุดเท่ากันคือ 1:8 ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 มีค่าอยู่ที่ 1:4 (ตารางที่ 8 และภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	1:4	1:4	1:4
10	1:4	1:4	1:4
20	1:4	1:4	1:4
30	1:4	1:4	1:4
40	1:8	1:4	1:4
50	1:8	1:8	1:4
60	1:8	1:8	1:4



ภาพที่ 13 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase

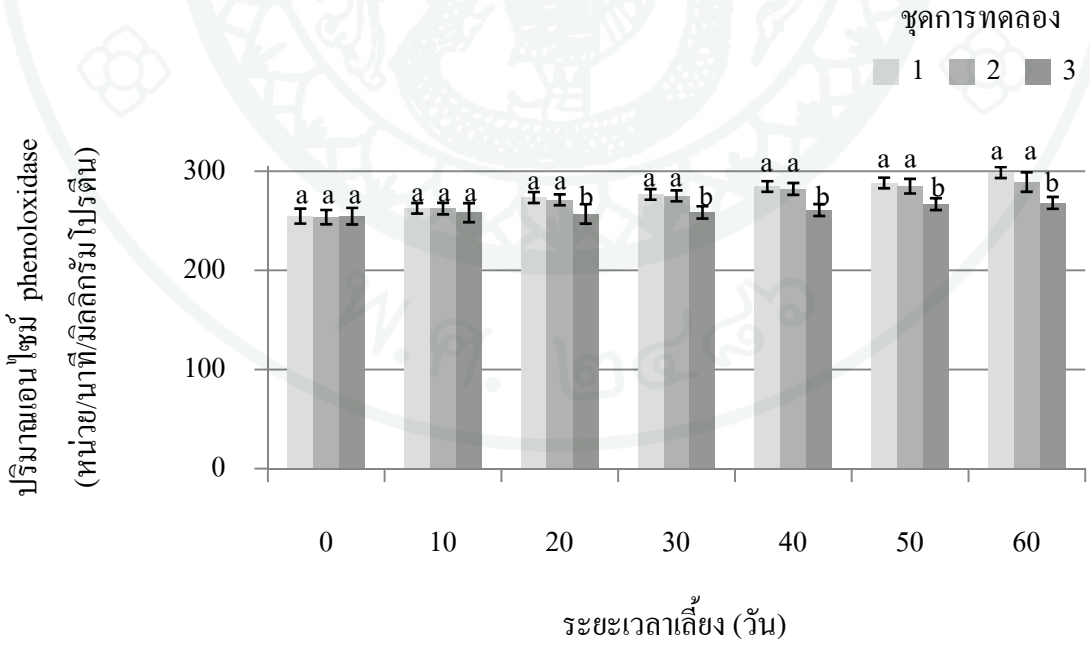
หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุด (298.83 ± 5.56 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 289.22 ± 9.87 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) ซึ่งมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase 268.22 ± 6.01 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และจะพบว่าในวันที่ 20 ของการเลี้ยงจะเริ่มมีความแตกต่างกันของปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase โดยกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 จะมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำที่สุดและเป็นเช่นนี้ไปจนกระทั่งครบ 60 วัน (ตารางที่ 9 และภาพที่ 14)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	254.87±7.53[a]	253.86±7.19[a]	254.79±8.37[a]
10	262.77±5.37[a]	262.46±5.82[a]	258.35±9.63[a]
20	273.63±5.50[a]	271.29±5.50[a]	257.08±9.78[b]
30	276.77±5.37[a]	275.29±5.50[a]	258.60±6.21[b]
40	284.77±5.37[a]	282.29±5.98[a]	261.00±6.01[b]
50	288.33±5.37[a]	285.06±7.38[a]	266.98±6.01[b]
60	298.83±5.56[a]	289.22±9.87[a]	268.22±6.01[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 14 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สูงที่สุด (47.87±7.62 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 45.07±10.23 หน่วย SOD/มิลลิลิตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 35.97±6.01 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร และจะพบว่ากุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลองจะเริ่มมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ที่แตกต่างกันตั้งแต่วันที่ 20 ของการเลี้ยงโดยกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 จะมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงที่สุด (39.18±6.60 หน่วย SOD/มิลลิลิตร) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 35.41±3.25 และ 34.44±3.91หน่วย SOD/ มิลลิลิตรตามลำดับ แต่ในช่วงตั้งแต่วันที่ 30 ของการเลี้ยงพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 จะมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งจะมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ต่ำที่สุดและจะเป็นเช่นนี้ไปจนกระทั่งครบ 60 วัน (ตารางที่ 10 และภาพที่ 15)

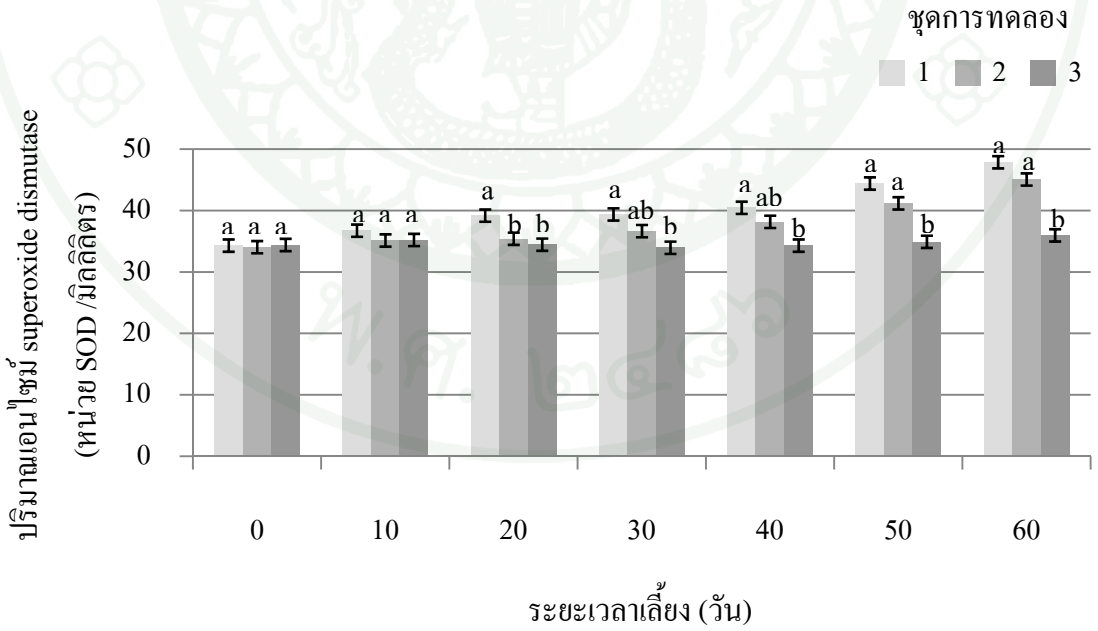
ระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 31±1 องศาเซลเซียสโดยใช้ heater ควบคุมระดับพีเอชของน้ำที่ 7.5 – 8.2 และความเค็มของน้ำประมาณ 25 พีพีที คุณสมบัติของน้ำแสดงไว้ในตารางที่ 11 โดยทำการวิเคราะห์ อุณหภูมิ พีเอช ความเค็ม ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ ทุกสัปดาห์แต่ในส่วนของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะตรวจวัดทุกวันเพื่อให้ได้ค่าที่เป็นไปตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งพบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกชุดการทดลองอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ยกเว้นในส่วนของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในชุดการทดลองที่ 3 ในช่วงเวลาที่ควบคุมให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และพรเลิศ, 2547

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ระยะเวลาเลี้ยง (วัน)	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD /มิลลิลิตร)		
	ชุดการทดลองที่ 1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 2 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุดการทดลองที่ 3 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)
0	34.30±6.36[a]	34.04±3.79[a]	34.40±3.61[a]
10	36.73±7.66[a]	35.13±3.08[a]	35.22±3.20[a]
20	39.18±6.60[a]	35.41±3.25[b]	34.44±3.91[b]
30	39.37±8.50[a]	36.66±10.62[ab]	33.94±3.27[b]
40	40.46±10.45[a]	38.17±8.67[ab]	34.30±3.18[b]
50	44.41±11.24[a]	41.18±10.28[a]	34.91±4.72[b]
60	47.87±7.62[a]	45.07±10.23[a]	35.97±6.01[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 15 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง 1	2	3
		พิสัย	พิสัย	พิสัย
อุณหภูมิน้ำ	เช้า	28.60-30.20	29.00-30.00	28.9-30.10
(องศาเซลเซียส)	บ่าย	29.60-31.00	30.20-30.90	29.90-30.90
พีเอช	เช้า	7.50-7.70	7.50-7.75	7.40-7.69
	บ่าย	7.70-8.20	7.70-8.20	7.60-8.20
ออกซิเจนละลายน้ำ	เช้า	4.90-6.57	2.80-3.55	1.30-1.75
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	บ่าย	5.20-6.63	3.00-3.62	1.30-1.70
ความเค็ม (พีพีที)		24.30-25.70	24.50-25.90	24.50-26.10
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		112-130	102-136	110-128
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5376-5676	5388-5676	5376-5676
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.30-0.80	0.27-0.77	0.27-0.80
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.01-0.09	0.01-0.09	0.01-0.05

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และ พีเอชต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย และ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอชต่อการกินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการทดลองผลของปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน 3 ระดับและพีเอชสองระดับคือ 7.5 และ 8.5 ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในห้องปฏิบัติการพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และในชุดการทดลองที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งพีเอช 7.5 และ 8.5 จะกินอาหารหมดภายในเวลา 45 นาที แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสองระดับพีเอช โดยกุ้งในกลุ่มนี้จะกินอาหารช้ากว่ากลุ่มที่มีออกซิเจนสูงกว่าและกินไม่หมด ภายในเวลา 45 นาที โดยมีอาหารเหลือเท่ากับ 54.50±1.24 และ 54.67±0.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในน้ำที่มีพีเอชสูงการกินอาหารของกุ้งจากทุกชุดการทดลองจะลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ที่ระดับออกซิเจนเดียวกัน (ตารางที่ 12 และภาพที่ 16)

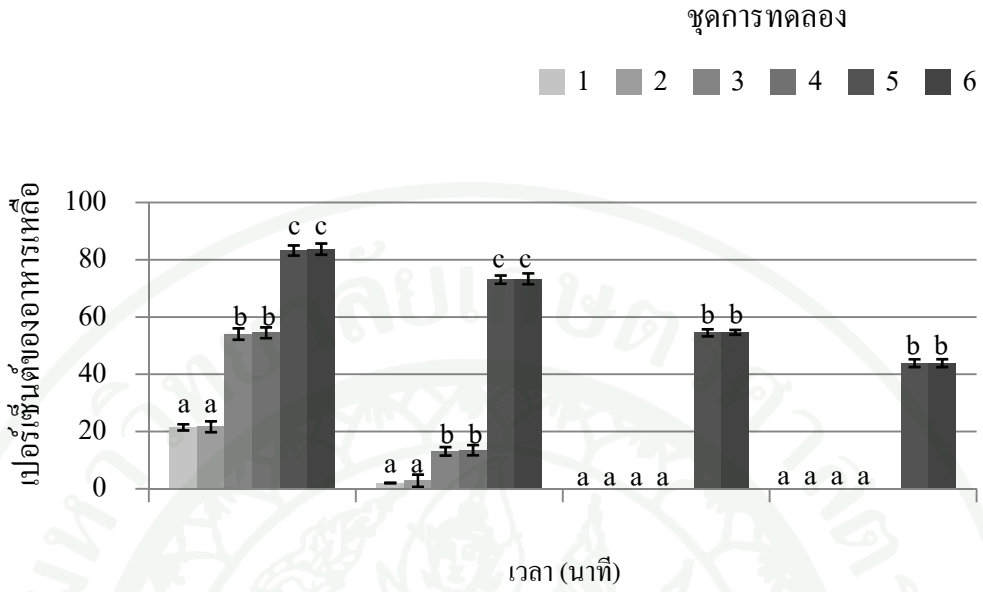
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ปริมาณอาหารเหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยง ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	พีเอช	ปริมาณอาหารเหลือที่เวลา (เปอร์เซ็นต์)			
		15 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	21.49±0.95[a]	2.05±1.49[a]	0±0.00[a]	0±0.00[a]
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	21.69±1.90[a]	2.84±2.15[a]	0±0.00[a]	0±0.00[a]
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	54.09±1.99[b]	13.12±1.47[b]	0±0.00[a]	0±0.00[a]
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	54.52±1.88[b]	13.51±1.79[b]	0±0.00[a]	0±0.00[a]
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	83.27±1.78[c]	73.09±1.44[c]	54.50±1.24[b]	43.90±1.35[b]
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	83.75±1.96[c]	73.38±1.90[c]	54.67±0.85[b]	43.92±1.37[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ปริมาณอาหารเหลือจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

2.2 ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอชต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

2.2.1 ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอชต่อการเจริญเติบโต และการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 60 วันในสภาวะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนและพีเอชที่แตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด (25.34±0.80 กรัม) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 25.07±0.82 กรัม และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3, 4, 5 และ 6 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 24.42±0.61, 24.21±0.78, 23.67±1.00 และ 23.56±0.65 กรัม ตามลำดับ และจะพบว่าตั้งแต่วันที่ 10 ของการเลี้ยงกุ้งในชุดการทดลองที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5 และ 6) จะมีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำที่สุด (9.55±0.53 และ 9.59±0.43 กรัม) แตกต่างอย่างมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่สูงกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4) ซึ่งจะมีน้ำหนักเฉลี่ยที่สูงกว่า และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกชุดการทดลอง จนกระทั่งในวันที่ 40 ของการเลี้ยงกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด (19.57±0.95 กรัม) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 19.32±0.85 กรัม ซึ่งกุ้งทั้งสองชุดการทดลองนี้จะมีระดับออกซิเจนมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ทั้งสองกลุ่มนี้จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3, 4, 5 และ 6 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งทั้ง 6 ชุดการทดลองจะแตกต่างกันเช่นนี้จนครบระยะเวลาการเลี้ยงที่ 60 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกระดับของออกซิเจนกุ้งจะมีน้ำหนักเฉลี่ยลดลงในชุดการทดลองที่มีพีเอชสูง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ที่ระดับออกซิเจนเดียวกัน (ตารางที่ 13 และภาพที่ 17)

อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในการศึกษาครั้งนี้อยู่ระหว่าง 93 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีอัตราการรอดตายสูงสุดถึง 93.33±3.33 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 92.22±1.92 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้งสองกลุ่มจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3, 4, 5 และ 6 ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 78.89±1.92, 77.78±1.92, 51.11±1.92 และ 50.00±3.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมจะเริ่มมีความแตกต่างกันตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไป โดยเฉพาะกุ้งในชุดการทดลองที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5 และ 6) จะมีอัตราการรอดตายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับระดับออกซิเจนสูงกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4) ซึ่งน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งทั้ง 6 ชุดการทดลองจะแตกต่างกันตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงนาน 60 วัน และยังพบว่าในทุกระดับของออกซิเจนที่มีพีเอชสูง อัตราการรอดตายจะลดลง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ที่ระดับออกซิเจนเดียวกันแต่พีเอชต่ำ (ภาพที่ 14 และตารางที่ 18)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	พีเอช	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	7.52±0.51[a]	10.03±0.49[a]	12.89±0.49[a]	15.80±0.49[a]	19.57±0.95[a]	22.46±0.89[a]	25.34±0.80[a]
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	7.55±0.51[a]	9.96±0.51[a]	12.93±0.52[a]	15.85±0.51[a]	19.32±0.85[a]	22.14±0.76[a]	25.07±0.82[a]
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	7.59±0.53[a]	10.00±0.53[a]	12.93±0.49[a]	15.84±0.49[a]	18.60±0.56[b]	21.24±0.57[b]	24.42±0.61[b]
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	7.57±0.62[a]	9.98±0.62[a]	12.84±0.62[a]	15.75±0.62[a]	18.31±0.73[b]	21.00±0.72[b]	24.21±0.78[b]
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	7.54±0.53[a]	9.55±0.53[b]	11.41±0.53[b]	13.40±0.53[b]	16.74±0.59[c]	20.44±0.85[c]	23.67±1.00[c]
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	7.58±0.43[a]	9.59±0.43[b]	11.45±0.43[b]	13.44±0.43[b]	16.57±0.45[c]	20.21±0.72[c]	23.56±0.65[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

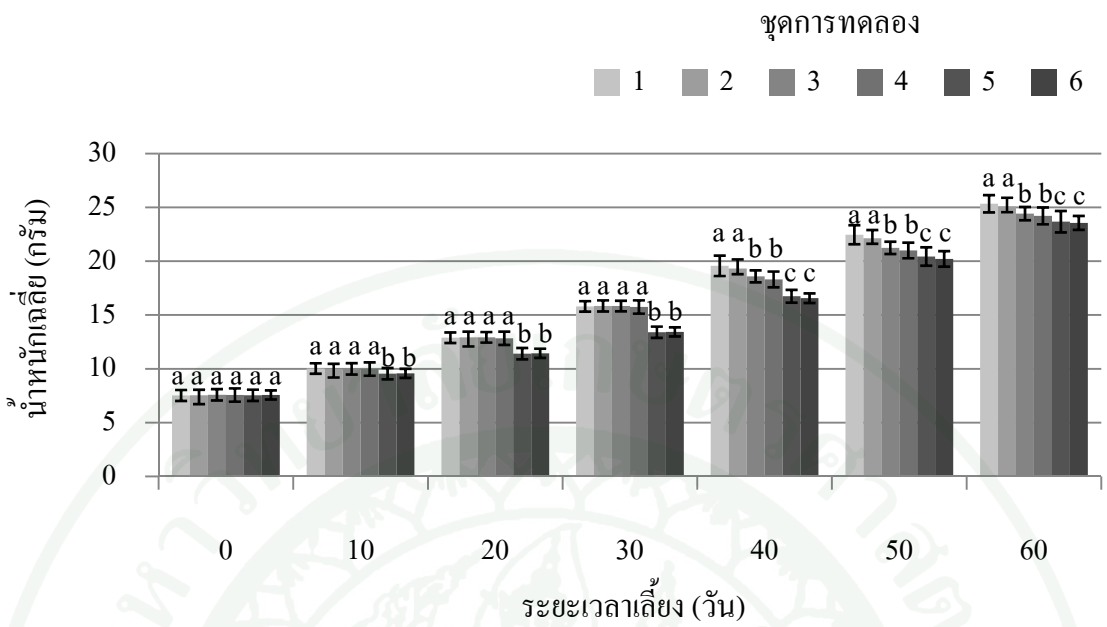
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

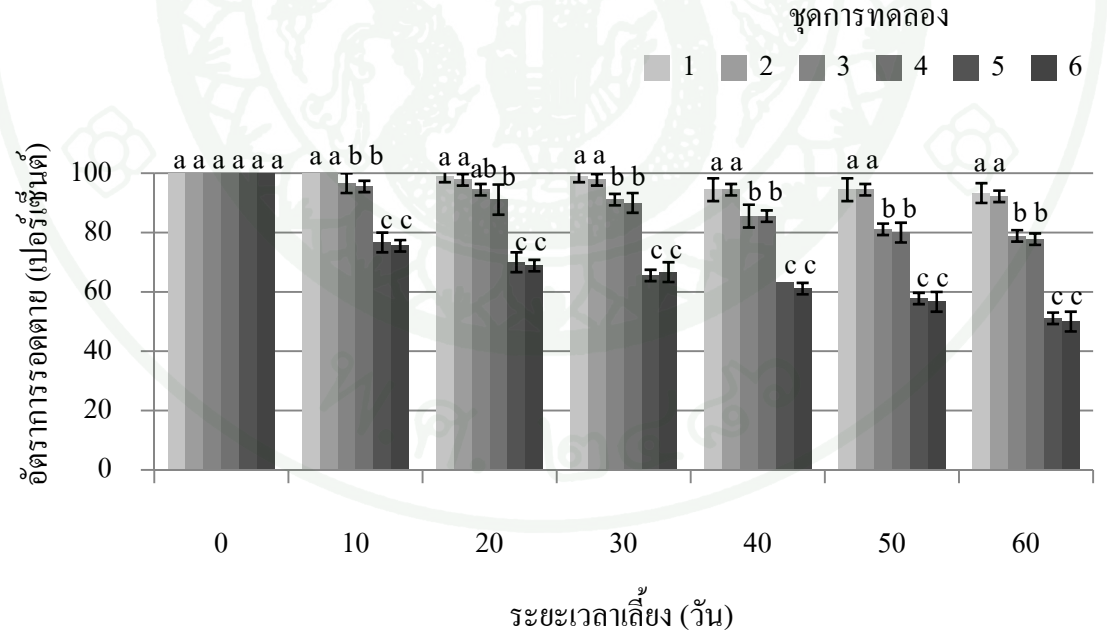
ชุดการทดลอง	พีเอช	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)						
		ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}	98.89±1.92^{a}	98.89±1.92^{a}	94.44± 3.85^{a}	94.44±3.85^{a}	93.33±3.33^{a}
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}	97.78±1.92^{a}	97.78±1.92^{a}	94.44±1.92^{a}	94.44±1.92^{a}	92.22±1.92^{a}
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	100.00±0.00^{a}	96.67±3.33^{b}	94.44±1.92^{ab}	91.11±1.92^{b}	85.56±3.85^{b}	81.11±1.92^{b}	78.89±1.92^{b}
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	100.00±0.00^{a}	95.56±1.92^{b}	91.11±5.09^{b}	90.00±3.33^{b}	85.56±1.92^{b}	80.00±3.33^{b}	77.78±1.92^{b}
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	100.00±0.00^{a}	76.67±3.33^{c}	70.00±3.33^{c}	68.89±3.85^{c}	64.44±1.92^{c}	57.78±1.92^{c}	51.11±1.92^{c}
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	100.00±0.00^{a}	75.56±1.92^{c}	68.89±1.92^{c}	66.67±3.33^{c}	61.11±1.92^{c}	56.67±3.33^{c}	50.00±3.33^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอช แตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน



ภาพที่ 18 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอช แตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.2 ผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และพีเอชต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วันโดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ได้ผลการทดลองดังนี้

1) การตรวจนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้ง

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งสูงที่สุด (197.03±8.12 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นเดียวกัน แต่มีพีเอชสูงกว่า (พีเอช 8.5) มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ 195.63±9.51 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3, 4, 5 และ 6 ซึ่งมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ 191.17±9.81, 190.08±10.39, 170.21±10.65 และ 168.28±8.30 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าตั้งแต่วันที่ 10 ของเลี้ยงจนกระทั่งครบระยะเวลา 60 วันปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งจะสูงที่สุดในชุดการทดลองที่ 1 รองลงมาจะเป็นชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้เป็นชุดการทดลองที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในชุดการทดลองที่ 2 จะมีระดับพีเอชที่สูงกว่าในชุดการทดลองที่ 1 แม้ว่ากุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้จะมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ควบปริมาณออกซิเจนให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3 และ 4) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนให้ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5 และ 6) (ตารางที่ 15 และภาพที่ 19)

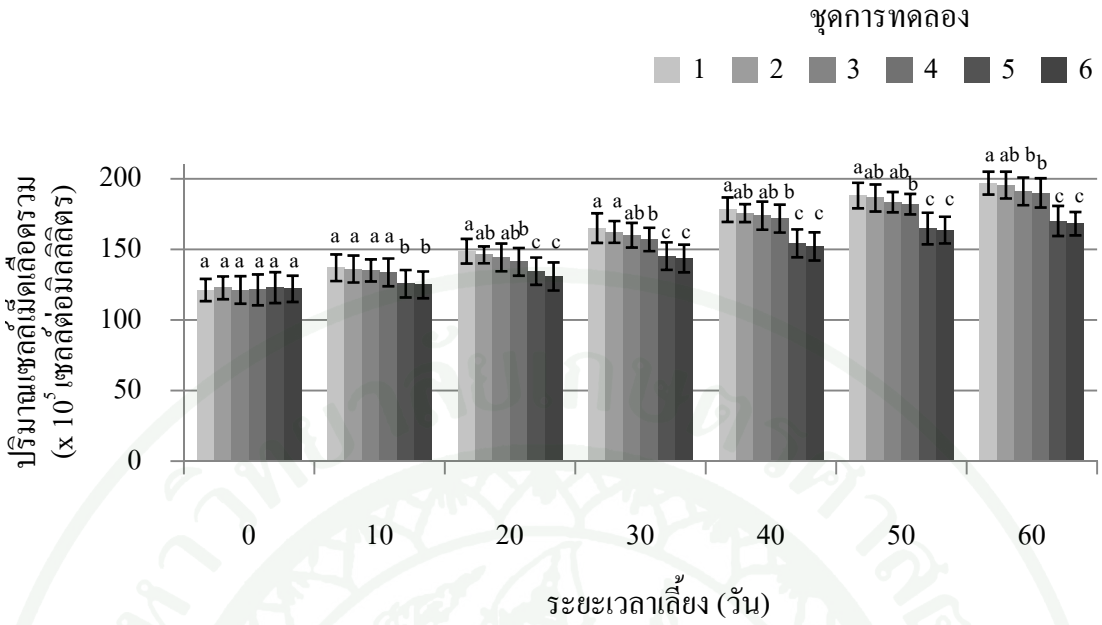
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	พีเอช	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวม (x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)						
		ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	121.25±7.89^{a}	137.03±9.43^{a}	148.75±8.72^{a}	165.16±10.49^{a}	178.20±8.68^{a}	188.20±9.07^{a}	197.03±8.12^{a}
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	122.81±8.09^{a}	136.17±9.56^{a}	146.17±5.97^{ab}	162.42±7.72^{a}	175.78±6.36^{ab}	186.48±9.58^{ab}	195.63±9.51^{ab}
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	121.33±9.77^{a}	135.16±7.86^{a}	144.38±9.84^{ab}	160.08±8.74^{ab}	173.98±9.97^{ab}	183.52±7.22^{ab}	191.17±9.81^{b}
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	121.41±10.95^{a}	133.75±9.85^{a}	141.25±9.85^{b}	157.11±8.27^{b}	171.88±9.90^{b}	182.11±7.28^{b}	190.08±10.39^{b}
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	122.97±10.95^{a}	125.70±9.73^{b}	134.61±9.67^{c}	145.31±9.75^{c}	154.38±9.89^{c}	164.84±11.18^{c}	170.21±10.65^{c}
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	122.11±9.32^{a}	124.92±9.49^{b}	130.86±9.94^{c}	143.59±9.83^{c}	152.16±9.99^{c}	163.75±9.48^{c}	168.28±8.30^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

2) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลานาน 60 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด (36.42±4.53 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 มีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 34.75±4.93 เปอร์เซ็นต์แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3, 4, 5 และ 6 ซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 32.50±4.69, 32.08±4.59, 28.17±5.10 และ 27.58±4.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยตลอดระยะเวลากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนให้สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและควบคุมพีเอชที่ 7.5 จะมีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 6 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและควบคุมพีเอชที่ 8.5 จะมีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมต่ำที่สุด และยังพบว่าที่พีเอชสูงในทุกระดับของออกซิเจนจะมีเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมลดลง (ตารางที่ 16 และภาพที่ 20)

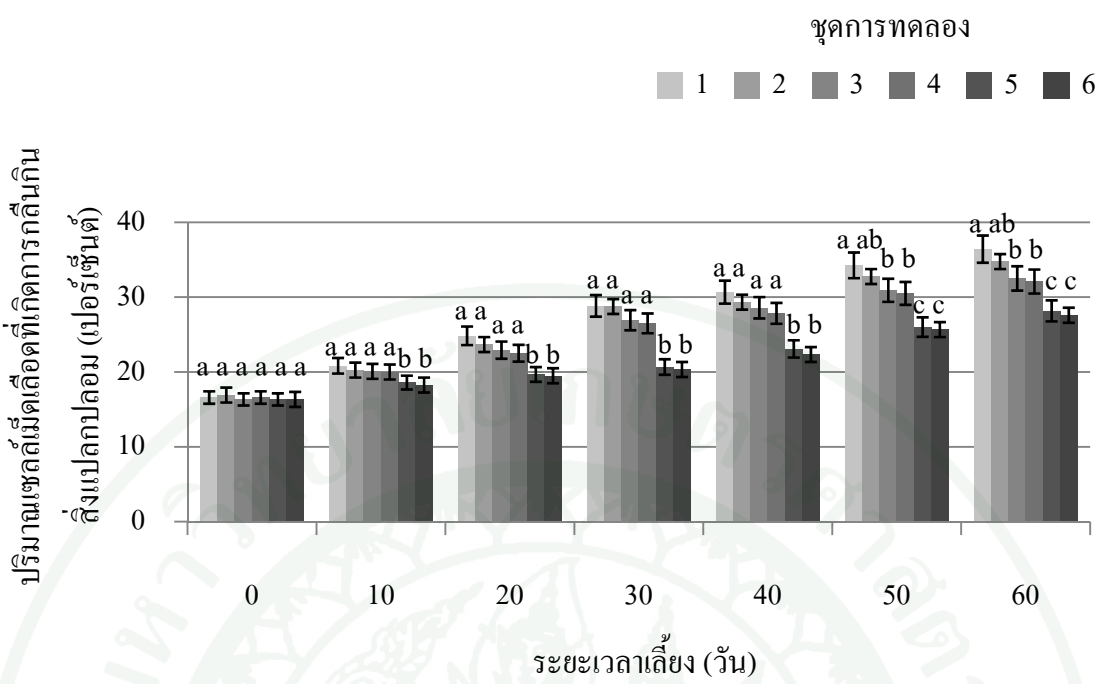
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	พีเอช	ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (เปอร์เซ็นต์) ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	16.58±5.58^{a}	20.83±4.64^{a}	24.83±4.64^{a}	28.83±5.17^{a}	30.67±5.20^{a}	34.25±4.39^{a}	36.42 ±4.53^{a}
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	16.92±4.79^{a}	20.25±5.22^{a}	23.67±4.40^{a}	28.75±4.37^{a}	29.33±4.44^{a}	32.75±4.37^{ab}	34.75±4.93^{ab}
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	16.33±4.28^{a}	20.08±4.81^{a}	22.92±4.13^{a}	26.92±4.13^{a}	28.58±4.19^{a}	30.92±4.13^{b}	32.50±4.69^{b}
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	16.58±4.43^{a}	20.00±4.86^{a}	22.50±3.88^{a}	26.50±3.88^{a}	27.83±4.53^{a}	30.50±3.88^{b}	32.08±4.59^{b}
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	16.33±4.40^{a}	18.58±4.31^{b}	19.67±5.43^{b}	20.67±5.71^{b}	23.08±5.69^{b}	26.00±5.11^{c}	28.17±5.10^{c}
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	16.33±4.96^{a}	18.25±5.05^{b}	19.50±3.92^{b}	20.33±4.92^{b}	22.33±4.92^{b}	25.67±4.40^{c}	27.58±4.61^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

3) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

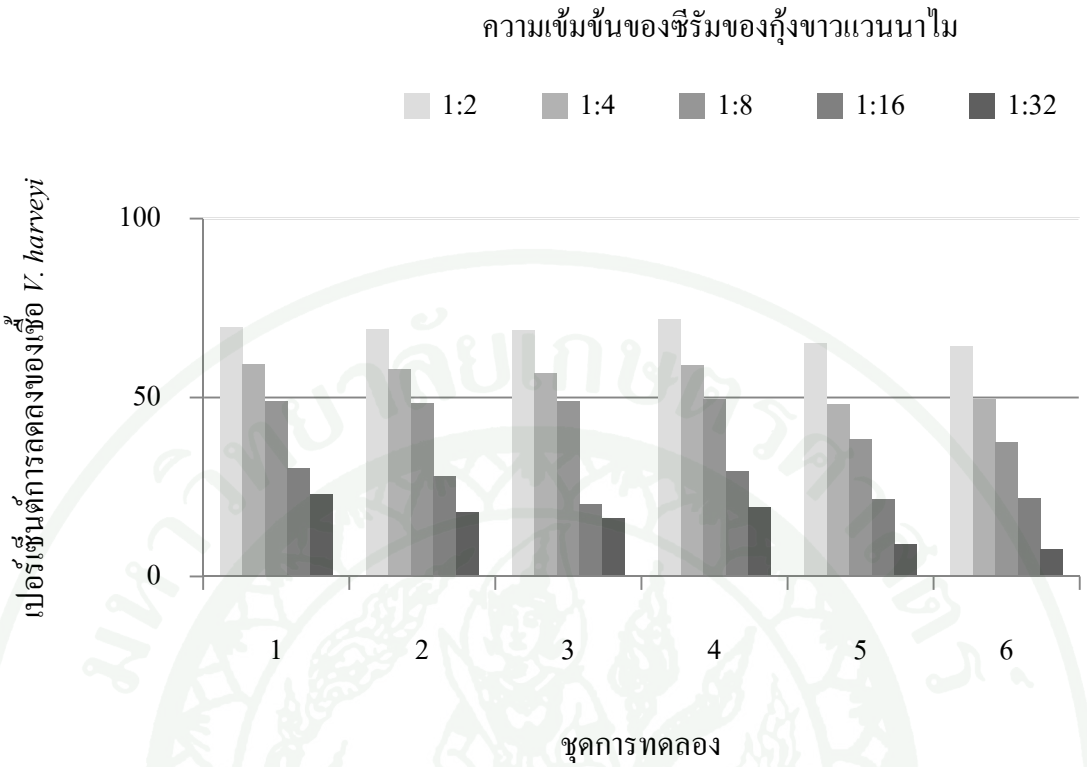
หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่ ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งพีเอช 7.5 และ 8.5 มีอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1:8 ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสองระดับพีเอช ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1:4 และพบว่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ของกุ้งมีความแตกต่างกันในช่วงวันที่ 50 ของการเลี้ยง โดยกุ้งในชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ดีที่สุดคือ 1:8 ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 5 และ 6 มีค่าอยู่ที่ 1:4 (ตารางที่ 17 และภาพที่ 21)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	พีเอช	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง						
		ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:8	1:8
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



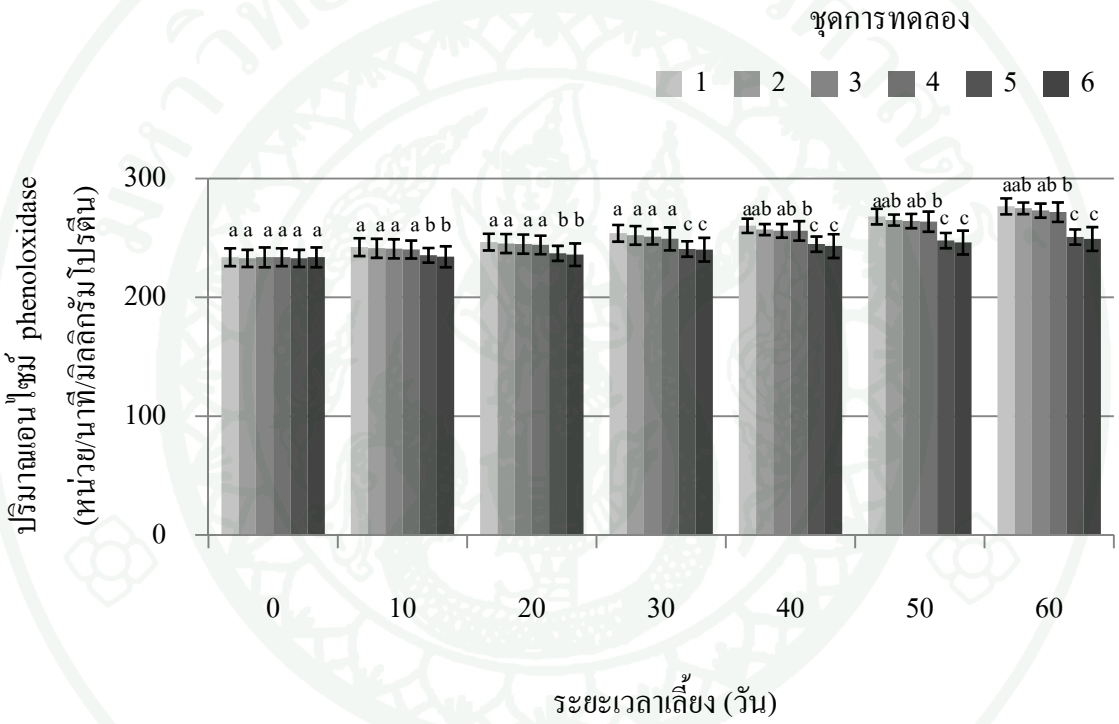
ภาพที่ 21 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

4) กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 60 วันพบว่า กุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และควบคุมพีเอชที่ 7.5 มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุดเท่ากับ 276.66±6.74 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นเดียวกันแต่ควบคุมพีเอชที่ 8.5 และกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และควบคุมพีเอชที่ 7.5 มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 275.03±4.90 และ 273.14±5.91 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลิตร แต่ควบคุมพีเอชที่ 8.5 และกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5 และ 6) ซึ่งมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase 271.79±8.17, 250.89±6.41 และ 249.24±10.00 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ และจะพบว่าตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไป กุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำที่สุดจนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงที่ 60 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าที่พีเอชสูงในทุกระดับของออกซิเจนกุ้งจะมีอัตราการรอดตายลดลง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ที่ระดับออกซิเจนเดียวกัน (ตารางที่ 18 และภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน

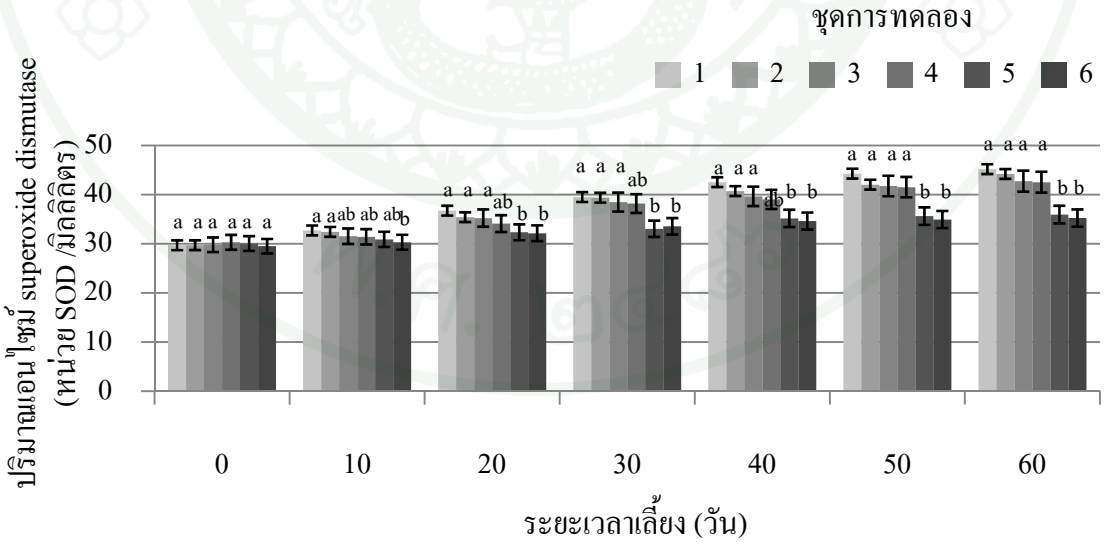
ชุดการทดลอง	พีเอช	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)						
		ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	233.87±7.53^{a}	242.37±7.51^{a}	246.587.05^{a}	254.03±7.03^{a}	260.36±6.05^{a}	268.12±6.56^{a}	276.66±6.74^{a}
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	232.86±7.19^{a}	241.37±8.00^{a}	245.37±8.00^{a}	252.26±7.84^{a}	257.17±4.65^{ab}	265.17±4.65^{ab}	275.03±4.90^{ab}
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	233.79±8.37^{a}	240.93±8.03^{a}	244.93±8.03^{a}	251.14±6.53^{a}	256.06±5.75^{ab}	264.30±6.04^{ab}	273.14±5.91^{ab}
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	233.87±7.53^{a}	240.39±7.52^{a}	244.22±7.82^{a}	249.32±9.69^{a}	256.04±8.20^{b}	263.78±8.48^{b}	271.79±8.17^{b}
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	232.86±7.19^{a}	235.50±6.15^{b}	237.15±6.32^{b}	240.78±6.52^{b}	244.89±6.41^{c}	247.89±6.41^{c}	250.89±6.41^{c}
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	233.79±8.37^{a}	234.24±8.80^{b}	236.03±9.48^{b}	240.24±10.00^{b}	243.24±10.00^{c}	246.24±10.00^{c}	249.24±10.00^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

หลังจากเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วันพบว่า กุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและควบคุมพีเอชที่ 7.5 (ชุดการทดลองที่ 1) มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงที่สุดเท่ากับ 45.18±10.22 หน่วย SOD/มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 8.5 (ชุดการทดลองที่ 2) และกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตรทุกระดับพีเอช (ชุดการทดลองที่ 3 และ 4) ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 44.19±9.56, 42.73±9.62 และ 42.52±9.82 หน่วย SOD/มิลลิลิตรตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรทุกระดับพีเอช (ชุดการทดลองที่ 5 และ 6) ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 35.94±5.77 และ 35.23±6.86 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร และยังพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่เลี้ยงที่ระดับพีเอชสูง (พีเอช 8.5) จะมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ที่ต่ำกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่เลี้ยงที่ระดับพีเอชต่ำ (พีเอช 7.5) แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในระดับออกซิเจนเดียวกันก็ตาม (ตารางที่ 19 และภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	พีเอช	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD /มิลลิลิตร)						
		ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)						
		0	10	20	30	40	50	60
1 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	29.70±4.59^{a}	32.71±3.21^{a}	36.73±7.66^{a}	39.49±8.20^{a}	42.54±9.60^{a}	44.27±9.80^{a}	45.18±10.22^{a}
2 (DO > 4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	29.71±4.01^{a}	32.41±3.14^{a}	35.41±3.25^{a}	39.37±9.79^{a}	40.72±8.66^{a}	42.03±9.93^{a}	44.19±9.56^{a}
3 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	29.80±4.49^{a}	31.52±3.20^{ab}	35.22±3.20^{a}	38.47±10.52^{a}	39.64±8.46^{a}	41.75±9.74^{a}	42.73±9.62^{a}
4 (DO 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	30.28±5.52^{a}	31.41±3.06^{ab}	34.10±3.91^{ab}	38.18±8.60^{ab}	39.02±8.16^{ab}	41.51±9.67^{a}	42.52±9.82^{a}
5 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	7.5	30.04±4.48^{a}	30.89±2.53^{ab}	32.33±3.35^{b}	33.04±4.65^{b}	35.16±3.02^{b}	35.62±7.48^{b}	35.94±5.77^{b}
6 (DO < 2 มิลลิกรัม/ลิตร)	8.5	29.50±5.25^{a}	30.31±2.08^{b}	32.13±3.32^{b}	33.55±3.68^{b}	34.61±3.06^{b}	34.93±5.44^{b}	35.23±6.86^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลา 60 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 20 มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 29±1 องศาเซลเซียสโดยใช้ heater และความเค็มของน้ำประมาณ 25 พีพีที คุณสมบัติของน้ำที่ทำการวิเคราะห์ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นด่างรวม ความกระด้าง และไนไตรท์ แต่ในส่วนของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ พีเอช และแอมโมเนียรวม จะตรวจวัดทุกวันเพื่อให้ได้ค่าที่เป็นไปตามที่กำหนดไว้

ตารางที่ 20 คุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม 60 วัน ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมในระดับที่สูงประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง 1	2	3
		พิสัย	พิสัย	พิสัย
อุณหภูมิ	เช้า	29.10-30.00	28.70-29.90	28.80-29.90
(องศาเซลเซียส)	บ่าย	30.10-30.90	30.00-30.90	30.00-30.90
พีเอช	เช้า	7.50-7.59	8.50-8.59	7.49-7.56
	บ่าย	7.50-7.59	8.50-8.59	7.49-7.58
ออกซิเจนละลายน้ำ	เช้า	30.10-.93	30.00-30.97	30.00-32.30
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	บ่าย	31.30-32.10	31.00-32.10	31.20-32.10
ความเค็ม (พีพีที)		24.50-25.60	24.30-25.70	24.30-25.60
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		112-136	102-136	110-130
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5376-5676	5376-5676	5220-5708
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		3.22-3.85	3.09-3.73	3.12-3.69
อันอิออนไนซ์แอมโมเนีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.08-0.10	0.63-0.77	0.08-0.09
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.35-1.08	0.33-1.03	0.35-1.07

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 (ต่อ)

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลองที่ 4	5	6
		พิสัย	พิสัย	พิสัย
อุณหภูมิ	เช้า	28.80-29.90	28.70-29.90	28.70-30.10
(องศาเซลเซียส)	บ่าย	30.10-30.90	30.00-30.90	30.00-30.90
พีเอช	เช้า	8.50-8.59	7.50-7.59	8.50-8.59
	บ่าย	8.50-8.58	7.50-7.59	8.43-8.59
ออกซิเจนละลายน้ำ	เช้า	30.17-30.90	30.1-30.90	30.20-30.90
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	บ่าย	31.20-32.10	31.00-32.10	31.00-32.10
ความเค็ม (พีพีที)		24.50-25.60	24.30-25.70	24.30-26.10
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		102-128	112-128	112-128
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		5376-5676	5336-5676	5220-5708
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)		3.19-3.77	3.12-3.89	3.04-3.80
อันอิออนไนซ์แอมโมเนีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.65-0.75	0.08-0.10	0.62-0.78
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.35-1.05	0.36-1.12	0.35-1.12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

3.1 การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วัน

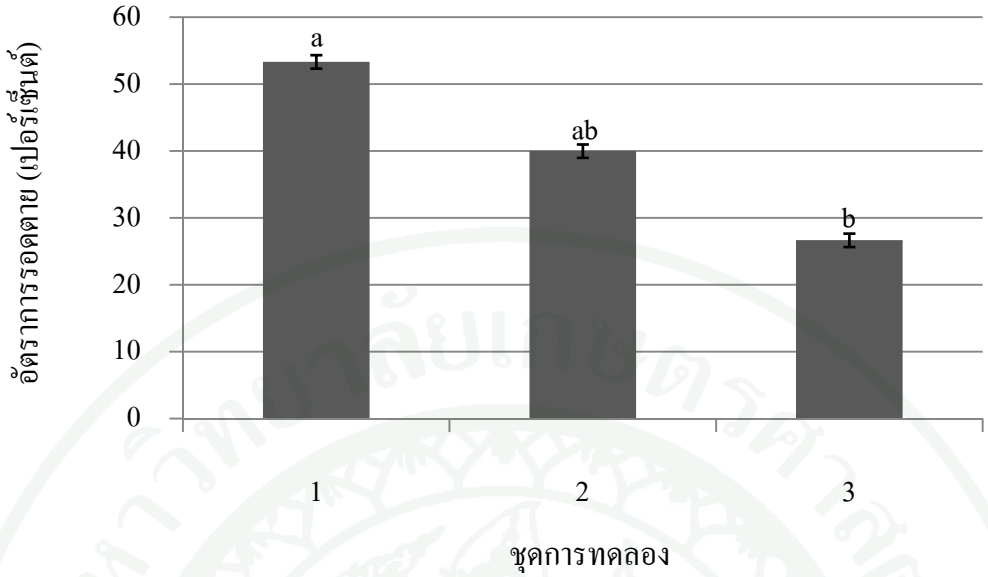
หลังจากเลี้ยงกุ้งที่ระดับออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับ เป็นระยะเวลา 60 วัน สุ่มกุ้งชุดการทดลองละ 30 ตัวมาฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้ากล้ามเนื้อลำตัวปล้องที่ 2 ปริมาณตัวละ 0.1 มิลลิลิตรซึ่งเป็นระดับที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรีย 9.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร บันทึกอัตราการรอดตายเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดที่ 53.33±0.58 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดตาย 40.00±1.00 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 26.67±0.58 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 21 และภาพที่ 24)

ตารางที่ 21 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* 9.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1 (DO>4 มิลลิกรัมต่อลิตร)	53.33 ± 0.58^{a}
2 (DO2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร)	40.00 ± 1.00^{ab}
3 (DO<2 มิลลิกรัมต่อลิตร)	26.67 ± 0.58^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนแตกต่างกัน 3 ระดับเป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* 9.6×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน

หลังจากเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกันในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน สุ่มกุ้งชุดการทดลองละ 30 ตัวมาฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้ากล้ามเนื้อลำตัวปล้องที่ 2 ของตัวกุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตรซึ่งเป็นระดับที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรีย 8.2×10^6 CFU/มิลลิลิตร บันทึกอัตราการรอดตายเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ในระดับ มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและควบคุมพีเอชที่ 7.5 และ 8.5 ตามลำดับ มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดเท่ากันที่ 43.33±0.58 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ซึ่งควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งสองระดับพีเอช มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 40.00±1.00 และ 36.67±0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำให้อยู่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

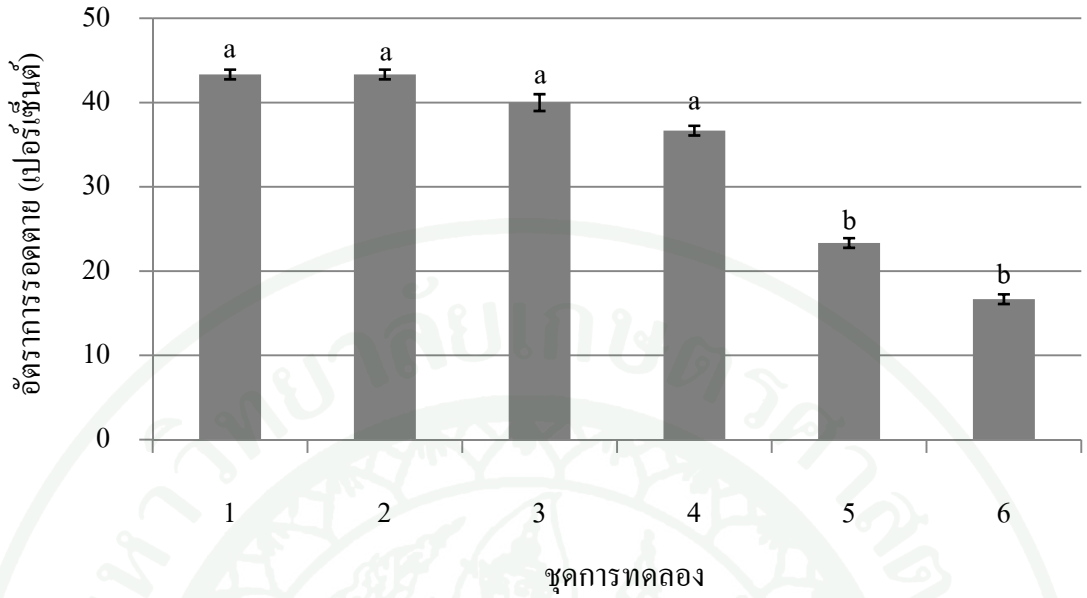
ลิตร (ชุดการทดลองที่ 5 และ 6) ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 23.33±0.58 และ 16.67±0.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 22 และภาพที่ 25)

ตารางที่ 22 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 8.2×10^6 CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1 (DO>4 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH7.5	43.33±0.58 [a]
2 (DO>4 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH8.5	43.33±0.58 [a]
3 (DO2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH7.5	40.00±1.00 [a]
4 (DO2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH8.5	36.67±0.58 [a]
5 (DO<2 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH7.5	23.33±0.58 [b]
6 (DO<2 มิลลิกรัมต่อลิตร) pH8.5	16.67±0.58 [b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

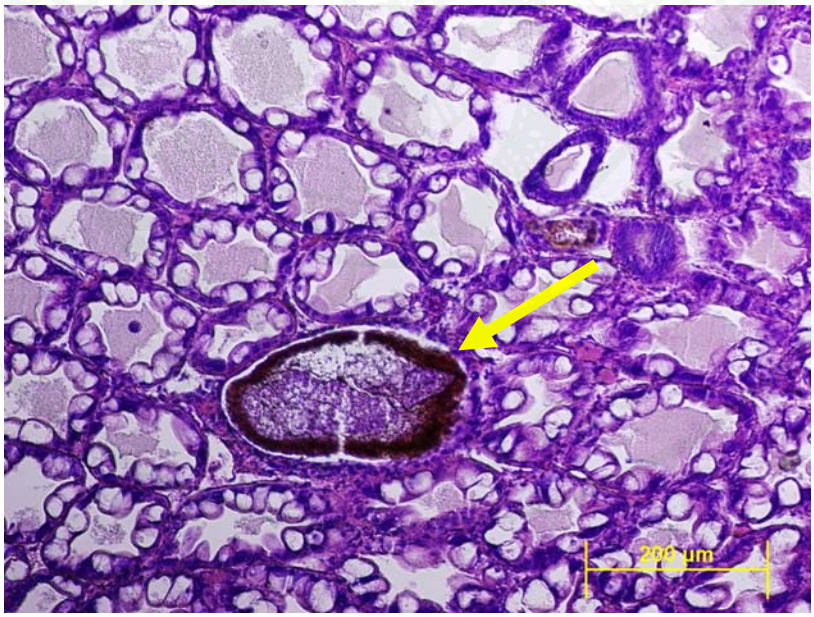


ภาพที่ 25 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและพีเอชแตกต่างกัน ในน้ำที่มีแอมโมเนียรวมประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน เมื่อได้รับแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 8.2×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ลักษณะภายนอกของกุ้งขาวแวนนาไมที่ถูกฉีดด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่ากุ้งจะเริ่มแสดงอาการป่วยหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกุ้งป่วยจะมีสีเข้มขึ้นกว่าปกติ และไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ ไม่ว่ายน้ำ และตายในที่สุด โดยจะสังเกตเห็นการเกิด melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อทั้งในบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไปและบริเวณกล้ามเนื้อด้านบนของตัวกุ้ง (ภาพที่ 26) และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อที่เกิด melanin สีดำแทรกอยู่รวมทั้งเนื้อเยื่อในส่วนตับและตับอ่อนของกุ้ง (hepatopancreas) มาศึกษาทางด้านพยาธิสภาพ พบการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมากล้อมรอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (ภาพที่ 27 และ 28)

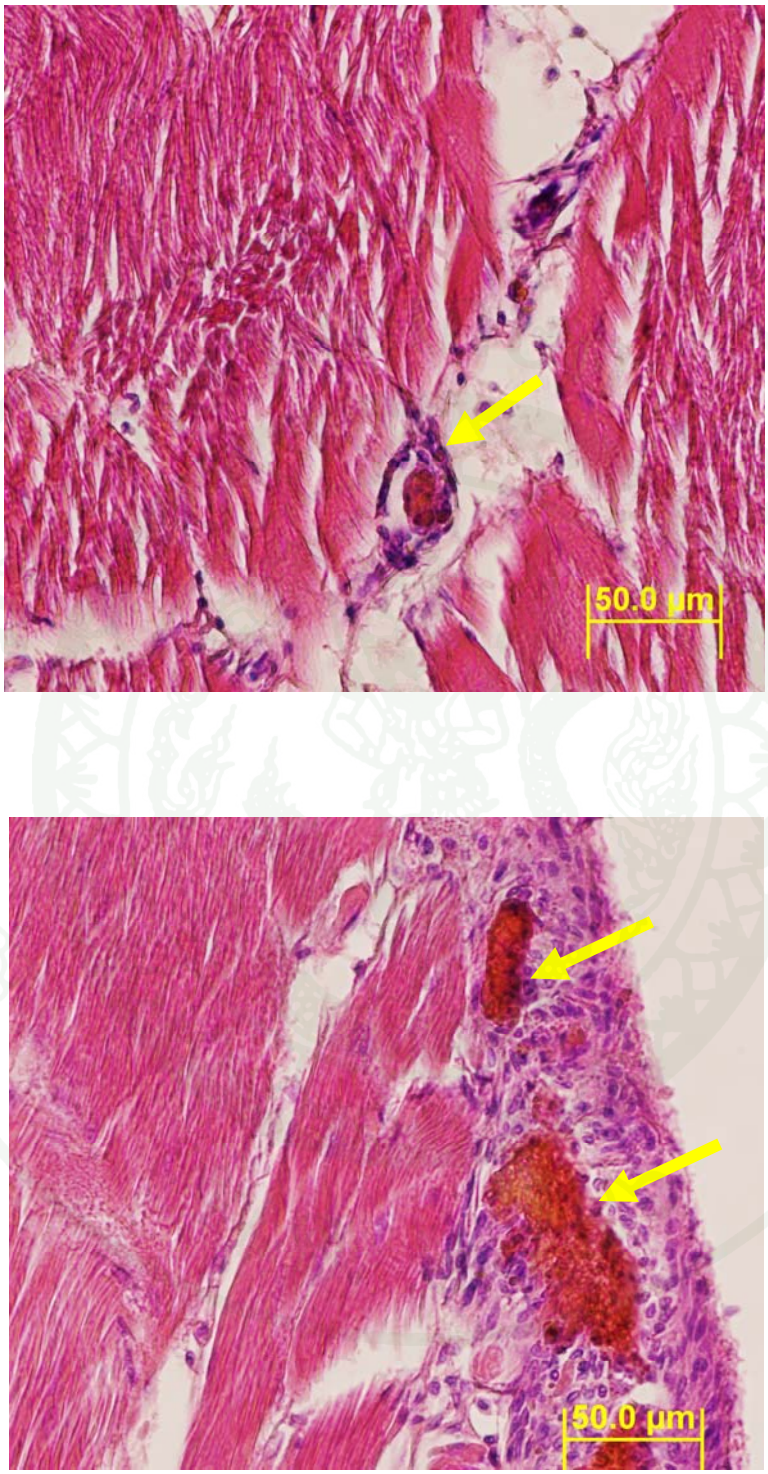
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 26 ลักษณะของเม็ดสี melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อทั้งในบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไปและบริเวณกล้ามเนื้อด้านบนของตัวกุ้ง (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 27 เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดกระบวนการ melanization ที่เนื้อเยื่อบริเวณ hepatopancreas (H&E, bar = 200 µm) (ลูกศรชี้)

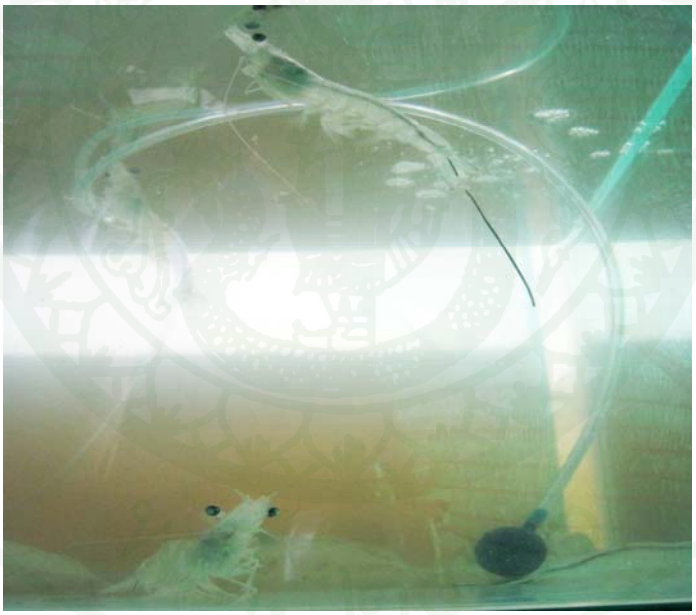
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 28 เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดกระบวนการ melanization ที่เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อ (H&E, bar = 50 µm) (ลูกศรชี้)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการศึกษาพฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะพบว่าในช่วงแรกที่ระดับออกซิเจนเริ่มลดต่ำลงกุ้งจะอยู่นิ่งบริเวณพื้นตู้ทดลอง ไม่ค่อยว่ายน้ำหรือเคลื่อนไหวมากเหมือนกับกุ้งในกลุ่มที่มีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า จากนั้นจะมีกุ้งบางส่วนว่ายน้ำขึ้นไปสู่บริเวณผิวน้ำซึ่งมีปริมาณออกซิเจนสูงกว่าด้านล่างและว่ายวนสลับกับลอยตัวอยู่บริเวณผิวน้ำ และจะพบว่ามีกุ้งบางส่วนที่อ่อนแอตายในที่สุด (ภาพที่ 29) นอกจากนี้ยังพบว่าในขณะที่กุ้งกินอาหารจะจับอาหารไว้และว่ายขึ้นไปกินอาหารบริเวณผิวน้ำด้วยเช่นกันและกุ้งส่วนใหญ่ในชุดการทดลองนี้จะกินอาหารน้อยทำให้มีอาหารเหลือเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 30) ซึ่งจะต่างจากพฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่สูงกว่า 4 และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งจะไม่พบลักษณะของการว่ายน้ำขึ้นมากินอาหารบริเวณผิวน้ำ แต่จะพบว่าเมื่อเริ่มให้อาหารกุ้งจะเข้าหาอาหารและกินอาหารอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 29 พฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะอยู่นิ่ง ไม่ว่ายน้ำหรือเคลื่อนไหวมาก และกุ้งบางส่วนจะว่ายน้ำขึ้นไปสู่บริเวณผิวน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ก)

(ข)

ภาพที่ 30 พฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ก) กุ้งจะจับอาหารไว้และว่ายขึ้นไปกินอาหารบริเวณผิวน้ำ

(ข) กุ้งส่วนใหญ่ในชุดการทดลองนี้จะกินอาหารน้อยทำให้มีอาหารเหลือเป็นจำนวนมาก

ภาพที่ 31 พฤติกรรมของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า 4 และอยู่ระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะเข้าหาอาหารและกินอาหารอย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งขาวแวนนาไมจะกินอาหารดีมาก ทำให้อาหารที่เหลือน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ระดับออกซิเจนระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกินอาหารช้าและน้อยที่สุด ในสภาวะที่ปริมาณออกซิเจนเท่ากันและแอมโมเนียรวมเท่ากันที่พีเอช 8.5 กุ้งจะกินอาหารน้อยกว่าที่พีเอช 7.5 ทั้งนี้เนื่องจากที่พีเอช 8.5 แอมโมเนียจะอยู่ในรูปอันอิออนไนซ์แอมโมเนียมากกว่าที่พีเอช 7.5 ซึ่งแอมโมเนียในรูปนี้จะมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (ชลอ และพรเลิศ, 2547; Boyd, 1982) ส่วนการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันให้ผลเป็นไปในแนวทางเดียวกันคือ กุ้งที่เลี้ยงในระดับออกซิเจนที่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันที่ดีสุด รองลงมาคือกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในระดับออกซิเจนระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ระดับออกซิเจนที่ต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และพบว่าในระหว่างกลุ่มที่มีระดับออกซิเจนเดียวกันแต่มีพีเอช 8.5 จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันต่ำกว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงที่พีเอช 7.5

ตามปกติในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโอกาสที่จะมีระดับออกซิเจนต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรจะพบบ่อยในบ่อที่มีกุ้งอย่างหนาแน่นมากแต่มีจำนวนเครื่องให้อากาศไม่เพียงพอ โดยเฉพาะช่วงท้ายของการเลี้ยงที่มีปริมาณแพลงก์ตอนพืชอย่างหนาแน่น ซึ่งสังเกตได้จากสีน้ำที่เข้มจัด มักจะพบว่าตั้งแต่ประมาณเที่ยงคืนจนถึงเช้ามืด ปริมาณออกซิเจนจะลดลงจนอยู่ในระดับที่ต่ำมาก มีผลต่อการกินอาหารและสุขภาพของกุ้ง ส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำ (ชลอ และพรเลิศ, 2547) แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้กุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงมาทำการทดลองในน้ำที่สะอาด เมื่อปรับให้ปริมาณออกซิเจนค่อย ๆ ลดลงมากุ้งก็สามารถปรับตัวได้และยังคงกินอาหารได้เกือบเท่ากับกลุ่มที่ออกซิเจนสูงกว่า ซึ่งในบ่อเลี้ยงจริงปริมาณออกซิเจนในระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในตอนเช้ามืด มักจะมีสภาพพื้นบ่อที่สกปรกมีการสะสมของสารอินทรีย์มาก กุ้งจะกินอาหารช้า และลดลงมาก มีผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายมากกว่าในการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ในการทดลองครั้งนี้มีความแตกต่างจากในบ่อเลี้ยงโดยเป็นการทดลองในตู้กระจก มีการดูดตะกอนและอาหารที่เหลือออกทุกครั้ง แต่ในสภาพบ่อเลี้ยงอาหารที่เหลือจะทำให้คุณสมบัติของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำเสื่อมลง โดยเฉพาะปริมาณแอมโมเนียและสารอินทรีย์จะเพิ่มขึ้นรวมทั้งปริมาณแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอด้วยซึ่งจะมีผลต่อสุขภาพของกุ้ง (ชลอ, 2543) กุ้งในบ่อจะอ่อนแอเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะหลังจากการลอกคราบในภาวะที่ออกซิเจนต่ำ กุ้งบางส่วนจะตายในลักษณะตัวนิ่มหรือลอกคราบไม่ออก ดังนั้นการที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำในบ่อเลี้ยงจะส่งผลรุนแรงต่อกุ้งมากกว่าสภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการ

กุ้งมีการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่มีออกซิเจนแตกต่างกันไป กุ้งที่อยู่ในน้ำที่มีออกซิเจนมากเพียงพอจะแข็งแรง เจริญเติบโตดี แต่ถ้ากุ้งอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีออกซิเจนน้อยกุ้งก็จะเครียด อ่อนแอทำให้ป่วยเป็นโรคง่าย ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งต้องมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำให้กุ้งเจริญเติบโตดีและสารอินทรีย์สลายตัวเร็ว ถ้าปริมาณออกซิเจนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้กุ้งตาย (พุทธ, 2544; ชลอ และ พรเลิศ, 2547; Chen, 1985) นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการย่อยอาหาร ดังนั้นหากมีปริมาณออกซิเจนต่ำทำให้กุ้งกินอาหารลดลง (กรมประมง, 2546) ในสภาวะที่ออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพฤติกรรมการดำรงชีวิต โดยกุ้งจะเคลื่อนที่ช้าลงเพื่อลดกิจกรรมการใช้ออกซิเจนในร่างกาย และจะว่ายน้ำสู่ผิวน้ำเพื่อรับออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลงส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลง (กิจการ และคณะ, 2543 ข; Martinez-Palacios *et al.,* 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลให้กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไมมีอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัวลดลงด้วย (Seidman and Lawrence, 1986)

ในบ่อเลี้ยงจริงซึ่งมักจะพบว่าปริมาณออกซิเจนในตอนกลางวันที่มีแสงแดดจะอยู่ในระดับที่เหมาะสมคือสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากการสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืช (Boyd, 1987) โดยเฉพาะบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีแพลงก์ตอนพืชหนาแน่น ซึ่งสังเกตจากสีน้ำที่เข้มมากปริมาณออกซิเจนในตอนบ่ายมักจะสูงกว่าจุดอิ่มตัว ซึ่งอาจจะสูงกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบได้ทั่วไปในบ่อที่มีกุ้งหนาแน่น สีน้ำเข้มมาก โดยเฉพาะบ่อที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ เกษตรกรจำนวนมากจะปิดเครื่องให้อากาศในตอนกลางวันเนื่องจากมีแสงแดดตลอดทั้งวัน บ่อที่มีระดับออกซิเจนสูงมากเช่นนี้ ในตอนกลางคืนหลังจากประมาณ 3 ทุ่มเป็นต้นไป ระดับออกซิเจนจะเริ่มลดต่ำกว่าระดับที่อิ่มตัวลงเรื่อย ๆ จากการหายใจของแพลงก์ตอนพืช กุ้งและกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ทำให้ระดับออกซิเจนตั้งแต่ประมาณเกือบเที่ยงคืนเป็นต้นไปจนถึงเช้ามืดอยู่ในระดับที่ต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาก แม้ว่าจะมีการเปิดเครื่องให้อากาศอย่างเต็มที่ตลอดเวลากลางคืนจนถึงเช้ามืดก็ตาม บางฟาร์มจะพบว่ามีออกซิเจนอยู่ในระดับประมาณ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร บางฟาร์ม 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร บางฟาร์มอาจจะต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในตอนเช้ามืด ซึ่งสถานการณ์ที่กล่าวมานี้จะพบได้ทั่วไป โดยฟาร์มที่มีปริมาณออกซิเจนในตอนกลางคืนถึงเช้ามืดอยู่ในระดับต่ำโดยเฉพาะประมาณ 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือต่ำกว่านี้กุ้งจะมีการเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำ อัตราแลกเนื้อสูง ในขณะที่บ่อที่มีระดับออกซิเจนสูงกว่าโดยเฉพาะมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า (ชลอ และพรเลิศ, 2547) จึงมีความจำเป็นในการเปิดเครื่องให้อากาศเพื่อช่วยในการเพิ่มออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมและช่วยทำให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้นด้วย (Madenjian, 1990)

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจะมีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูงมาก ปริมาณการให้อาหารจึงสูงตามไปด้วย ทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลง ตามระยะเวลาในการเลี้ยง เนื่องมาจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งและอาหารที่กุ้งกินไม่หมด บ่อที่ไม่สามารถควบคุมให้ปริมาณออกซิเจนอยู่ในระดับที่เหมาะสม กุ้งจะโตช้า มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการเลี้ยงกุ้งต่ำอีกด้วย (Briggs and Funge-smith, 1994; Paez-Osuna *et al.,* 1997; Burford and Williams, 2001; McIntosh *et al.,* 2001) จากการศึกษาการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นในประเทศไทยพบว่า ในอาหารกุ้งที่ใช้ในการเลี้ยงมีเพียง 48 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอาหารแห้งที่กุ้งนำมาใช้ในการย่อยสลายสารอาหารให้เป็นพลังงานและในการลอกคราบ 17 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนไปเป็นเนื้อกุ้ง 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารที่เหลือ และ 20 เปอร์เซ็นต์เป็นขี้กุ้ง (McIntosh and Phillips, 1992) การย่อยสลายของขี้กุ้งและอาหารกุ้งที่เหลือมีผลโดยตรงที่ทำให้น้ำในบ่อด้อยคุณภาพลง (Boyd, 1992) ดังนั้นอาหารกุ้งจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงไม่ดี นอกจากนี้สารอาหารอนินทรีย์ที่มาจากอาหารกุ้งยังมีผลทางในการเพิ่มสารอินทรีย์คาร์บอนจำนวนมากให้กับน้ำ ซึ่งต้องใช้ออกซิเจนจำนวนมากในการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์

การย่อยสลายของอาหารกุ้งในบ่อถูกควบคุมด้วยปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ พีเอช ออกซิเจน ความเค็ม และส่วนประกอบของอาหารกุ้ง การย่อยสลายสารอินทรีย์ในอาหารกุ้งเกิดขึ้นได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสม (15-35 องศาเซลเซียส) และพีเอชที่เป็นกลางซึ่งแบคทีเรียทั่วไปเจริญได้ดี การย่อยสลายของสารอินทรีย์เกิดทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจนสารอินทรีย์คาร์บอนส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และมีเทน การย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์กว่าแบบไม่ใช้ออกซิเจน อาหารกุ้งที่มีจำหน่ายทั่วไป ประกอบด้วยโปรตีน 35-45 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัส 1.3-1.8 เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายอาหารกุ้ง จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสออกมาเป็นจำนวนมาก (McIntosh *et al.*, 2001) ปริมาณสารอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในบ่อเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นพบว่า 92 เปอร์เซ็นต์ ของไนโตรเจนในอาหารกุ้ง เปลี่ยนไปเป็นเนื้อกุ้งเพียง 21 เปอร์เซ็นต์ ของไนโตรเจนทั้งหมด ตกค้างอยู่ในตะกอน 31 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเปลี่ยนถ่ายระหว่างการเลี้ยง 22 เปอร์ซ็นต์ และในน้ำปล่อยทิ้งในการจับกุ้ง 13 เปอร์เซ็นต์ (Briggs and Funge-Smith, 1994) แหล่งสำคัญของสารไนโตรเจนในน้ำมาจากการขับถ่ายทางเหงือกของกุ้ง การละลายของอาหารกุ้ง และจากการละลายของขี้กุ้ง (Avnimelech, 1996; Funge-Smithand and Briggs, 1998; Burford and Williams, 2001)

การที่มีพีเอชของน้ำสูงขึ้น แอมโมเนียจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่เป็นพิษมากขึ้น คือ NH_3 (Losordo *et al*., 1992; Masser *et al*., 1992) เช่น ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ปริมาณแอมโมเนียที่อยู่ในรูปที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำจะสูงถึง 14.95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระดับพีเอช 7.4 มีค่าเท่ากับ 1.73 เปอร์เซ็นต์ แต่ และเมื่อนำมาเปรียบกันพบว่าที่พีเอช 8.4 มีค่าแอมโมเนียที่เป็นพิษมากกว่าพีเอช 7.4 ถึง 8 เท่า ในขณะที่ปริมาณแอมโมเนียรวมมีค่าเท่ากัน แอมโมเนียที่เป็นพิษขึ้นกับปริมาณ ammonia-N, พีเอช, ความเค็ม และอุณหภูมิ (Warren, 1962; Trussell, 1972; Whitfield, 1974; Emerson *et al.,* 1975; Armstrong *et al.,*1978; Bower and Bidwell, 1978; Chen and Lei, 1990) แอมโมเนียจะเกิดขึ้นจากกระบวนการ ammonification ในบ่อจากการย่อยสลายสารอาหารที่เหลือและสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำโดยจุลินทรีย์พวกเฮทเธอโรโทรพ (heterotroph) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Boyd, 1992) แอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้กุ้งตายได้ภายใน 10 ชั่วโมง (Chen, 1993) นอกจากนี้ปริมาณแอมโมเนียส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมด้วย (Liu and Chen, 2004) กุ้งขาวแวนนาไมเมื่ออยู่ในน้ำที่มีปริมาณ ammonia-N มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมงสามารถทำให้กุ้งตายได้ (Frías-Espericueta *et al.* 1999; Lin and Chen, 2001) ถ้าพีเอชของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงมากในรอบวันหรือมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (กิจการ และคณะ, 2543 ง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นในการเลี้ยงกุ้งในช่วงท้ายของการเลี้ยงปริมาณของเสียและสารอินทรีย์มีการสะสมมากขึ้นส่งผลให้มีแอมโมเนียในปริมาณมากเนื่องจากการย่อยสลายของเศษอาหารที่เหลือและซากแพลงก์ตอนที่ตาย ดังนั้นเกษตรกรควรมีการควบคุมระดับพีเอช ไม่ให้สูงมากเพื่อป้องกันความเป็นพิษจากแอมโมเนีย และจะต้องควมคุมปริมาณแอมโมเนียไม่ให้สูงเกินไป โดยการควบคุมปริมาณการให้อาหารที่เหมาะสมไม่ให้มีอาหารเหลือ นอกจากนั้นอาจจะมีการเติมจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียที่สามารถนำแอมโมเนียไปใช้ ในขณะเดียวกันแบคทีเรียในกลุ่มนี้ต้องการใช้ออกซิเจนเพื่อการเผาผลาญและสร้างพลังงาน ถ้าในน้ำขาดออกซิเจนหรือปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่เพียงพอจะทำให้แอมโมเนียเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และไนเตรทไม่สมบูรณ์ (ชลอ และพรเลิศ, 2547; Boyd, 1982; Wickins, 1985) ดังนั้นควรจะมีเครื่องให้อากาศในช่วงท้ายของการเลี้งอย่างเพียงพอด้วย เพื่อช่วยให้กระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนเตรทเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งไนเตรทไม่เป็นพิษต่อกุ้ง (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีความสำคัญอย่างมากในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยเฉพาะถ้าต้องเลี้ยงอย่างหนาแน่น ซึ่งระดับออกซิเจนที่สูงมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดเวลา นอกจากจะทำให้กุ้งเจริญเติบโตดีมีระดับภูมิคุ้มกันสูง ยังส่งผลให้มีอัตราการรอดตายสูงด้วย ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งควรจะให้ความสนใจในการควบคุมระดับออกศซิเจนให้อยู่ในระดับที่สูงและเหมาะสมตลอดเวลา ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงกุ้งประสบความสำเร็จตามเป้าหมาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผล

จากการศึกษาผลของระดับออกซิเจน ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการพบว่า กุ้งที่เลี้ยงภายใต้ระดับออกซิเจนที่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอาหารเหลือน้อยที่สุด รวมถึงมีการเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ในส่วนของการศึกษาผลของระดับออกซิเจน แอมโมเนีย และ พีเอช ต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการพบว่า กุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและควบคุมพีเอชที่ 7.5 จะมีอาหารเหลือน้อยที่สุด รวมถึงมีการเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณระดับออกซิเจนระหว่าง 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร และต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งสองระดับพีเอช (พีเอช 7.5 และ 8.5) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงภายใต้ระดับออกซิเจนที่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรและควบคุมพีเอชที่ 8.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

ในการเลี้ยงกุ้งปริมาณออกซิเจนละลายน้ำถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง จึงควรมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมตลอดการเลี้ยงโดยเฉพาะช่วงท้ายของการเลี้ยง ซึ่งจะมีปริมาณของเสียสะสมเพิ่มขึ้นและส่งผลให้มีปริมาณแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้น เกษตรกรควรจะมีการติดตั้งเครื่องให้อากาศให้พอเพียง ที่สามารถควบคุมปริมาณออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ตลอดเวลา นอกจากนั้นจะต้องควบคุมปริมาณการให้อาหาร เพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย และควรจะควบคุมพีเอชของน้ำในตอนเช้ามืด หรือจุดต่ำสุดให้อยู่ที่ประมาณ 7.5 ซึ่งพีเอชในระดับนี้แอมโมเนียจะอยู่ในรูปแบบที่เป็นพิษต่ำ และพีเอชสูงสุดในตอนบ่ายไม่ควรจะสูงกว่า 8.3 โดยที่ความแตกต่างของพีเอชในรอบวันไม่ควรจะมากกว่า 0.5

ในตอนกลางวันที่อากาศดีมีแสงแดดจัด ไม่ควรจะปิดเครื่องให้อากาศทั้งหมดเป็นเวลานาน แม้ว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะอยู่ในระดับที่สูงก็ตาม ควรจะเปิดเครื่องให้อากาศบางส่วน เพื่อทำให้อุณหภูมิของน้ำในทุกระดับเท่ากัน และทำให้ปริมาณออกซิเจนในระดับพื้นบ่ออยู่ในระดับที่สูงด้วย นอกจากนั้นการเปิดเครื่องให้อากาศบางส่วน จะทำให้น้ำในบ่อเคลื่อนไปในทิศทางที่ต้องการ กุ้งจะมีการเคลื่อนไหวไปในทิศทางเดียวกัน โอกาสที่จะเกิดแผล รอยขีดข่วน บนลำตัวมีน้อยกว่าการปิดเครื่องให้อากาศทั้งหมด และเมื่อเปิดเครื่องให้อากาศอีกครั้งกุ้งจะตกใจ เคลื่อนไหวทุกทิศทาง บางส่วนจะมีรอยขีดข่วนตามเปลือก และบางส่วนอาจจะเป็นตะคริว และตายในเวลาต่อมาได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

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

_____, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 605-613.

_____, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543 ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำบนพื้นฐานของเพศและวงจรการลอกคราบ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 623-632.

_____, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. 2543 ง. ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 581-588.

_____, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกสรจันทร์. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ)**: 567-580.

กรมประมง. 2546. **ระเบียบและการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามตามมาตรฐาน จี เอ พี พ.ศ. 2546**. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ. 102 หน้า.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรมประมง. 2547. **โครงการประเมินผลกระทบการนำกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เข้าประเทศไทย**. หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

คณะแพทย์ศาสตร์. 2518. **หลักโภชนศาสตร์**. โรงพยาบาลรามาธิบดี, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

จรีพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, สุณีย์ หวันเหล็ม, อนิดา สงนุ้ย, สุพัตรา อรุณรัตน์, นพรัตน์ แท่นมาก, จิราพร เพชรรัตน์ และ กิจการ ศุภมาตย์. 2546. การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* จากตอนใต้ของไทยในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26 (ฉบับที่ 1)**: 43-54.

จารุมาศ เมฆสัมพันธ์. 2548. **ดินตะกอน**. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 146 หน้า.

ชยพร ทิพย์ศรีมงคล. 2552. **ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชวลิต อัครคหสิน. 2552. **ประสิทธิภาพของระบบฉีดออกซิเจนแบบใหม่ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. **กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม**. โรงพิมพ์เจริญรัตน์การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 260 หน้า.

_____ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.** บริษัทเมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ. 206 หน้า.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, ภิญโญ เกียรติภิญโญ และบริษัท ซายอาคควา สยาม จำกัด. 2548. **รายงานการวิจัยการศึกษาการขยายพันธุ์พ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อ**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

_____, นิติ ชูเชิด, สุธี วงศ์มณีประทีป, สาธิต ประเสริฐศรี, เกศินี หลายสุทธิสาร, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์, จริยาวดี สุริยพันธ์ และแก้วตา ลิ้มเฮง. 2552. **ผลของอุณหภูมิต่อพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopeneus vannamei*)**, น. 337-345. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47.

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

ดารุณี แซ่อุ่ย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และลิลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*). **เอกสารวิชาการฉบับที่ 6** กรมประมง, กรุงเทพฯ.

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

ธรณ์ธันย์ สว่างวรรณ์. 2546. **การผลิตอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจากของเหลือทิ้งปลาทูน่า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2535. **หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 81 หน้า.

นิรนาม. 2545. **เอกสารประกอบการสัมมนาเทคนิคฝ่าวิกฤตกับหลากสไตล์การเลี้ยงกุ้ง**. 19 กันยายน 2545. โรงแรมมารวยการ์เดน, กรุงเทพฯ.

พยุง ภัทรกุลชัย. 2543. เกจิฯ กุ้งกุลาดำแนะเลี้ยงผ่านหนาว ชี้ต้องคุมอาหาร. **สัตว์น้ำ** 12(136): 3-10.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2544. **การจัดการสารประกอบไนโตรเจนและออกซิเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด**. กลุ่มวิจัยวิศวกรรมการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย กรมประมง, สงขลา. 14 หน้า.

เพิ่มพูน กีรติกสิกร. 2528. เคมีของดิน. ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 249 หน้า.

มะลิ บุณยรัตผลิน. 2531. อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ. น. 108-141. *ใน* **การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2536. **การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ เล่ม 1 การจัดการคุณภาพน้ำ.** ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 319 หน้า.

มาลินี วิชชาวุธ และ สมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรมประมง. **วารสารการประมง** 58(2): 170-171.

ยนต์ มุสิก. 2539. **คุณภาพน้ำและกำลังผลิตของบ่อปลา.** ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 180 หน้า.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. 2547. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง, น. 48-64. *ใน* **การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคสัตว์น้ำ**. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทยา มะเสนา. 2526. **จุลวิทยาทางดิน.** ภาควิชาปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 228 หน้า.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2531. **การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.** ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน, ชลบุรี. 23 หน้า.

วรณัฏฐ์ อนันตศิลป์. 2545. **การศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactobacillus* ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2543. **โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศรายุทธ์ เมธินาพิทักษ์. 2547. **พลวัตของออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2543. **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 125 หน้า.

สมพร ธนวิริยะกุล. 2535. **การคัดเลือกแบคทีเรียเฮตเทอโรโทรปจากธรรมชาติและความสามารถในการย่อยสลายอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันตชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 350 หน้า.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Alday de Graindorge, V. and T.W. Flegel. 1999. **Diagnosis of Shrimp Disease with Emphasis on the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon***. Multimedia Asia.

Alexander, M. 1961. **Introduction to Soil Microbiology.** John Wiley & Sons Inc., New York. 472 pp.

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

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

Armstrong, D.A., D. Chipendale, D.W. Knight and J.E. Colt. 1978. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. **Biol. Bull**. 154:15-31.

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

Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture** 176: 227-235.

Bachère, 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.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Baticados, M.C.L., E.R. Lavill-Pitogo, L.D. Cruz-Lacierda, L.D. de la Pena and N.A. Sunaz. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. **Dis. Aquat. Org.** 9: 133-139.

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. United States of America by Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas. 114 pp.

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

_____. 1987. **Evaluation of Water Quality and Water Quality Management Techniques for Backishwater Aquaculture in Ponds in Thailand**. Report for the Asian Development Bank, Manila, Philippines. 29 pp.

_____. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming**. Fisheries and Allied Aquacultures Departmental Series No. 2. Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama.

_____. 1995. **Bottom Soils, Sediment and Pond Aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA. 347 pp.

_____ 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.

_____ and C.S. Tucker. 1998. **Pond Aquaculture Water Quality Management**. Kluwer Academic Publishers, Massachusettes.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bower, C.E. and J.P. Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater. effects of temperature, pH and salinity. **J. Fish. Res. Board Can**. 35:1012-1016.

Briggs, M.R.P. and S.J. Funge-Smith. 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. **Aquaculture** 25: 789-911.

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.

Buchanan, R.E., N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Rawin and R.Y. Stanier. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. The William and Wikins Co., Baltimore.

Burford, M.A. and K.C. Williams. 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. **Aquaculture** 198: 79-93.

Chen, H.C. 1985. Water quality criteria for farming the grass shrimp *Penaeus monodon*, pp. 165. *In* **Proceeding of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimps. 4-7 December 1981**, SEAFDEC, Iloilo, Philippines.

Chen, J.C. and S.C. Lei. 1990. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. **J. World Aquac. Soc**. 21: 300-306.

Chen, S.N., S.L. Huang and G.H. Kou. 1992. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan, pp. 195-205. *In* W. Fulks and K.L. Main , eds. **Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States Hawaii.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.

Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunologenetics** 54: 442-445.

Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A.V. Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem**. 272: 28398-28406.

Dieguez-uribeondo, J. and J. Cerenius. 1998. The inhibition of extracelluar proteinase from *Aphanomyces* spp. by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. **Mycol. Res**. 120: 820-824.

Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). **Comp. Biochem. Physiol.** 32: 709-731.

Emerson K., R.L. Russo and R.V. Thurston. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effects of pH and temperature. **J. Fish. Res. Board Can.** 32: 2379-2388.

Fieber, L.A. and P.L. Lutz. 1982. Calcium requirements for molting in *Macrobrachium rosenbergii*. **J. World Maricul**. **Soc.** 13: 21-27.

Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp, *Penaeus setiperus*. **J. Invertebr. Pathol.** 24: 141-148.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-19.

Frías-Espericueta M.G., M. Harfush-Melendez, J.I. Osuna-LÓpez and F. Páez-Osuna. 1999. Acute toxicity of ammonia to juvenile *Penaeus vannamei* Boone. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 62: 646-652.

Funge-Smith, S.J. and M.R.P. Briggs. 1998. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. **Aquaculture** 164: 117-133.

Halver, J.E. 1972. **Fish Nutrition**. Academic Press, New York. 712 p.

Hose, J.E., G.E. Matin, V.A. Nguyen, J. Lucus and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. **Biol. Bull. Mar. Biol**. 173(1): 178-187.

Huang, C.C., K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll and Y.L. Song. 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 279-294.

Itami,T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β–1,3-glucan (Schizophyllan). *In* **Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992**. The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.

Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. **Curr. Opin. Immunol.** 5: 74-82.

Jiravanichpaisan, P., T. Miyazaki and C. Limsuwan. 1994. Histophatology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **J. Aquat. Anim. Health**. 6: 27-35.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Johansson, M.W. and K. Söderhäll. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cell. **Insect. Biochem**. 19: 183-190.

_____, M.W., T. Holmblad, P.O. Thornqvist, M. Cammarata, N. Parrinello and K. Soderhall. 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell adhesive peroxidase in crayfish. **J. Cell Sci**. 112: 917–925.

Johnson, P.T. 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 11: 679-704.

Keyser, P. 1999. **Crustacean immunity: Characterization of some crayfish blood proteins**. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.

Khoo, L., D.W. Robinette and E.J. Noga. 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Mar. Biotechnol**. 1: 44-51.

Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology** 80: 393-412.

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.

Lavilla-Pitogo, C.R., L.J. Albright, M.G. Paner and N.A. Sunaz. 1992. Studies on the sources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries, pp. 157-164. *In* I.M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur, eds. **Disease in Asian Aquaculture.** Fish Health Section. Asian Fish Soc. Manila, Philippines.

Lee, K.K., F.R. Chen and P.C. Lui. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol**. 5(5): 385-387.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Liang, Z., P. Lindblad, A. Beauvais, M.W. Johansson, J.P. Latge´, M. Hall, L. Cerenius and K. Söderhäll. 1992. Crayfish a-macroglobulin and 76 kD protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kD protein. **J. Insect Physiol**. 38: 987–995.

Lightner, D.V. 1988. Disease of cultured penaeid shrimp and prowns, pp. 8-127. *In* C.S. Sinderman and D.V. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture.** Elsevier, Amsterdam.

Lin, Y.C. and J.C. Chen. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol**. 259:109-119.

Liu, C.H. and J.C. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol**. 16: 321-334.

Losordo, T.M., M.P.Masser and J. Racocy. 1992. Recirculating aquaculture tank production systems. A overview of critical conservations. **Southern Regional Aquaculture Centre Publication** no: 45. Stoneville, MS, 6 pp.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Luo, R. 1996. Study on the contents of serum protein and glucose in the hemolymp of the shrimp *Penaeus chinensis*. Oceanol. Limnol. **Sin Haiyang Yu Huzhao**. 27: 476-480.

Madenjian, C.P. 1990. Patterns of oxygen production and consumption in intensively managed marine shrimp ponds. **Aquacult. Fish. Manage**. 21: 407-417.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Martin, G.G. and L.B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocyte. **J. Morphol**. 185: 339-349.

_____, D. Poole, C. Poole, J. E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Invertebr. Pathol.** 62: 308-315.

Martinez-Palacios, C.A., L.G. Ross and V.L. Jimenez. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei* Boone, 1931. **J. Aquacult. Trop**. 11(1): 59-65.

Masser, M.P., J. Rakocy and T.M. Losordo. 1992. Recirculating aquaculture tank production system. Management of recirculating systems. **Southern Regional Center Publication** no: 452 Stoneville, MS, 12 p.

Maynard, L.A. and J.D. Loosli. 1969. **Animal Nutrition**. McGraw-Hill Book Company, New York.

McIntosh, D.J. and M.J. Phillips. 1992. Environmental consideration in shrimp farming. **Infofish International** 6: 38-92.

McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, S. Horowitz and A. Horowitz. 2001. Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 31%) on water and sediment quality and on the production of *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. **Aquacult. Eng.** 25: 69-82.

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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Paez-Osuna, F., S.R. Guerrero-Galvan, A.C. Fernamdez and R. Espinoza-Angulo. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in north-western Mexico. **Marine Poll. Bull.** 34(5): 290-297.

Patrick, R. 1977. Ecology of freshwater diatoms-diatom communities, pp. 284-332. *In* D. Werener, eds. **The Biology of Diatoms**. University of California Press, Berkeley.

Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxiase activating system of yhe shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol**. 21: 385-395.

Persson, M., A. Ver and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by seprated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. **Cell. Tiss. Res**. 247: 409-415.

Prosser, J.I., K. Killham, L.A. Glove and E.A.S. Rattray. 1996. Luminescence-base system for detection of bacteria in the environment. **Critical Rev. Biotechnology.** 16(2): 157-163.

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.

Ruangpan, L., R. Tabkaew and K. Sangrungruang. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp *Penaeus monodon*, pp. 141-149. *In* **Fisheries Health Section, Asian Fisheries Soc.** Manila, Philippines.

Santos, E.A. and L.E.M. Nary. 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulate* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol**. 87A(4): 1033-1035.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schnapp, D., G.D. Kemp and V.J. Smith. 1996. Purification and characterization of a prolinerich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem**. 240: 532-539.

Schnutt, A.S.C. and E.A. Santos. 1999. Haemolymph nitrogenous constituents and nitrogen efflux rates of juvenile shrimp, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante), exposed to ambient ammonia N. **Aquaculture** 30: 1-11.

Seidman, E.R. and A.L. Lawrence. 1986. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. **J. World Maricult. Soc.** 16: 333-346.

Sequeira, T., D. Tavares and M. Arala-Chaves. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Dev. Comp. Immunol**. 20: 97–104.

Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. **Cell Tissue Res**. 233: 295–303.

_____ and K. Söderhäll. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacean. **Symposium of the Zoological Society of London**. 56: 59-79.

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

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

_____ and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol**. 10: 23-28.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Söderhäll, K., L. Cerenius and M.W. Johasson. 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates, pp. 229-253. *In* **New Directions in Invertebrate Immunology**. SOS publications, Fair Harven.

_____ and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.

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

_____ and V.J. Smith. 1983 b. The prophenoloxidase activating system a complement-like pathway in arthropod, pp. 160 - 167. *In* J. Asit and D.W. Roberts, eds. **Infection Processes of Fungi**. Rockfeller Foundation, New York.

_____ and V.J. Smith. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition in arthropod**,** pp. 251-258. *In* A.P. Gupta, ed. **Hemolytic and Humoral Immune Response in Arthropod.** John Wiley & Sons, Inc., New York.

Sung, H.H., Y.L. Yung and Y.L. Song. 1996. Enhancement of microcidal activity in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16(2): 278 – 284.

Terry, T. 2001. **Phagocytosis and bacterial pathogens**. Available Source: http://www.sp.uconn.edu/~terry/Common/phago053.html, September 6, 2011.

Trussell, R.P. 1972. The percent un-ionized ammonia in aqueous ammonia solutions at different pH levels and temperatures. **J. Fish. Res. Board Can**. 29:1505-1507.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular response. **J. Mar. Biotechnol.** 3: 153-156.

_____ and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.

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

Wang, Y.C., P.S. Chang and H.Y. Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei.* **Fish Shellfish Immunol.** 20: 414-418.

Warren K.S. 1962. Ammonia toxicity and pH. **Nature** 195: 47-49.

Wickins, J.F. 1985. Ammonia production and oxidation during the culture of marine prawns and lobsters in laboratory recirculation systems**. Aquac. Eng**. 4: 155-174

Whitfield, M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water-a theoretical study. **J. Mar. Biol. Ass. U. K.** 54: 565-580.

Yeh, M.S., Y.L. Chen and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable protein of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comp. Biochem. Physiol.** 121: 169-176.

Yu, J. 1993. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Ocean-Univ.** 23(1): 107-114.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารเคมี

1. ส่วนผสม M-199 (อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด) (กิจการ และคณะ, 2543 ฉ) จำนวน 100 มิลลิลิตร

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน	50 มิลลิลิตร
Salt mixture	10 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (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 ละลายด้วยน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.2 Salt mixture ปริมาตร10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

โพแทสเซียมคลอไรด์ (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

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์11 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2 . 2 H_2O$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย $CaCl_2 . 2 H_2O$ 0.9 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

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

1.6 Hepes จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cystein จำนวน 5 กรัม

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

2. Shrimp saline

โซเดียมคลอไรด์	28.4	กรัม
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	1.0	กรัม
$MgSO_4 \bullet 7H_2O$	2.0	กรัม
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	2.25	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.7	กรัม
Glucose (Dextrose)	1.0	กรัม
Hepes	2.38	กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker's yeast

0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์

shrimp saline

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

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

KH_2PO_4 1.3609 กรัม

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5. การเตรียมสารในชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD@ Superoxide dismutase

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

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

5.3) สารละลายมาตรฐาน CAL standard (S_6) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-สกุล	นางสาวทัศนีย์ นลวชัย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 กันยายน 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดสระบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
	วท.ม (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์