



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตรการประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของสารเมทัลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกัน
แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of Metalloprotein on Growth, Survival and Non-Specific Immunity
of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นามผู้วิจัย นางสาวปณิดา ประถมยา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชุเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, ประ.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารเมทัลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกัน
แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of Metalloprotein on Growth, Survival and Non-Specific Immunity
of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นางสาวปณิดา ประถมยา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2554

ปณิศา ประถมยา 2554: ผลของสารเมทิลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง) สาขาวิทยาศาสตรการประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D. 89 หน้า

การศึกษาผลของเมทิลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้ กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาว่า 15 จำนวน 50 ตัว เลี้ยงในถังขนาด 500 ลิตร ให้อาหารวันละ 4 มื้อ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 5.72 ± 0.98 กรัม สูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารปกติ (3.52 ± 0.56 กรัม) แต่อัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่ผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและอัตราการรอดตายของกุ้งหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ พบว่ากุ้งชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กระบวนการทำลายแบคทีเรีย การกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase และอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* สูงกว่ากุ้งชุดที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีน ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว แวนนาไม ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกัน แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติหรือกลุ่มควบคุม, ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้กุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ย 7.5 ± 0.5 กรัม จำนวน 30 ตัว เลี้ยงเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 15.00 ± 1.36 กรัม สูงกว่าชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (12.11 ± 1.13 กรัม) และชุดที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (12.00 ± 2.85 กรัม) ($P < 0.05$) อัตราการรอดตายของกุ้งกลุ่มควบคุมเท่ากับ 84.44 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (61.11 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์) และอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (45.56 ± 3.85 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อพิจารณากลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารนี้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งชุดควบคุมและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) และสูงกว่าชุดที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ($P < 0.05$) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้สารเมทิลโลโปรตีนมีผลช่วยในการเสริมระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมได้ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งจะช่วยให้กุ้งมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น

Panita Prathomya 2011: Effect of Metalloprotein on Growth, Survival and Non-Specific Immunity of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 89 pages.

A study of the effects of metalloprotein on growth, survival and immune response in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was conducted under laboratory conditions. Laboratory tests were carried out in two treatments (with four replicates/treatment). Each replicate consisted of 50 shrimp (PL 15) in 500 liter fiberglass tanks. Shrimp were fed four times daily for 60 days with pelleted feed containing levels of metalloprotein (0 g and 1 g per kg of feed). After 60 days of dietary administration, shrimp fed with 1 g metalloprotein per kg of feed had an average body weight (5.72 ± 0.98 g) which was significantly higher ($P < 0.05$) than the control group (3.52 ± 0.56 g), but survival rate was not significantly different ($P > 0.05$). Total hemocyte count (THC), bactericidal activity, phagocytic activity, phenoloxidase activity superoxide dismutase activity and survival rate of shrimp after experimental infection with *Vibrio harveyi* revealed that shrimp fed with 1 g metalloprotein per kg of feed had significantly higher than control group ($P < 0.05$). A study of the effects of metalloprotein on growth, survival and immune response was conducted under different oxygen level. The experiment was carried out in three treatments (with three replicates per treatment). Each replicate consisted of 30 shrimp (7.5 ± 0.5 g) and rearing for 55 days. Treatment 1 or control group, shrimp were fed with pelleted feed with normal oxygen conditions. Treatment 2, 1g metalloprotein/kg of the feed was added and rearing in low oxygen conditions. Treatment 3, shrimp were fed with normal feed without metalloprotein also in low oxygen conditions. After 55 days of dietary administration, shrimp fed with normal feed with normal oxygen conditions had an average body weight (15.00 ± 1.36 g) which was significantly higher ($P < 0.05$) than shrimp fed with 1 g metalloprotein per kg of the feed in low oxygen conditions (12.11 ± 1.13 g) and the group that fed with normal feed in low oxygen conditions (12.00 ± 2.85 g) respectively. Survival rate of shrimp was significantly higher in the group that fed with normal feed in normal oxygen conditions (84.44 ± 1.92 percent) than that shrimp fed with 1g metalloprotein/kg of the feed in low oxygen conditions (61.11 ± 1.92 percent) and normal feed in low oxygen conditions (45.56 ± 3.85 percent) ($P < 0.05$) respectively. However, shrimp fed with 1 g metalloprotein per kg of the feed had significantly higher survival rate than the group without metalloprotein ($P < 0.05$). The immune characteristics revealed that THC, phagocytic activity, phenoloxidase activity and superoxide dismutase activity of shrimp from control group and shrimp fed 1 g metalloprotein per kg of the feed in low oxygen conditions were not significantly different ($P > 0.05$) but higher than the group without metalloprotein ($P < 0.05$). The present study indicate that oral administration of metalloprotein could increase immune response and survival rate of *L. vannamei* in low oxygen conditions.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลีมสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรียา ฐิวิโรจน์กุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิธิ
ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาแนะนำด้านการทดลองและตรวจแก้ไข
ข้อมูลต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง
ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบริษัท CISCHEM AGRICULTURE.CO.,LTD ประเทศไทย ที่ให้การ
สนับสนุนทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีรักษ์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์
และขอขอบพระคุณ ดร. เต็มดวง สมศิริ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่ให้คำแนะนำและตรวจ
แก้ไขให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ จุริย์ฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์กุ้งที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณ พี่ๆ ปริญาเอกและเพื่อนๆ ปริญาโททุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี
ในการเก็บตัวอย่าง การวิเคราะห์ข้อมูลตลอดจน คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง และผู้ใกล้ชิดทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน
การศึกษาและเป็นกำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ปณิดา ประถมยา

พฤษภาคม 2553

ผลของสารเมทัลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกัน
แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of Metalloprotein on Growth, Survival and Non-Specific Immunity
of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยทำเงินรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาทมาเป็นระยะเวลากว่า 20 ปี เนื่องจากเป็นผู้นำด้านการส่งออกมาโดยตลอดและในช่วง 4-5 ปีที่ผ่านมาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมได้ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มาเป็นระยะเวลานาน จึงเป็นกุ้งที่โตเร็ว เลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตสูง (ชลอ และพรเลิศ, 2547) เนื่องจากระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น เกษตรกรส่วนใหญ่จะปล่อยลูกกุ้งขาวในอัตราตั้งแต่ 100,000 ตัวต่อไร่ขึ้นไป ทำให้ในช่วงเดือนสุดท้ายของการเลี้ยง ปริมาณสิ่งขับถ่ายและอาหารที่เหลือจะมีปริมาณมากขึ้นจนถึงระดับที่ทำให้คุณภาพน้ำอยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยเฉพาะปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดต่ำลงและเพิ่มความเครียดให้กับกุ้งซึ่งจะทำให้กุ้งอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลง ในช่วงที่กุ้งอ่อนแอนี้เชื้อโรคจะเข้าทำอันตรายต่อกุ้งได้ง่ายและทำให้กุ้งเกิดโรคในที่สุด (บุญรัตน์, 2553)

สภาพการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบหนาแน่นและปัญหาที่พบในระหว่างการเลี้ยง ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่แก้ปัญหาโดยเพิ่มเครื่องให้อากาศ ซึ่งสามารถแก้ปัญหาต่างๆ ได้ในระดับหนึ่งแต่มีผลทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นด้วย เนื่องจากปริมาณออกซิเจนในระดับสูงมีความสัมพันธ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนา ในร่างกายสิ่งมีชีวิตจะมีสารชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ประกอบเซลล์และทำหน้าที่ต่างๆ อย่างหลากหลาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิก โปรตีนเป็นสารอาหารที่ร่างกายขาดไม่ได้ ร่างกายสิ่งมีชีวิตจะใช้โปรตีนเป็นส่วนประกอบของเซลล์และสังเคราะห์สาร ที่จำเป็นต้องใช้ในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อให้การทำงานของร่างกายดำเนินไปตามปกติ เช่น เอนไซม์และฮอร์โมน เป็นต้น หากแบ่งประเภทของโปรตีนด้วยองค์ประกอบทางเคมีจะพบว่ามิกกลุ่มของโปรตีนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ

รวม เรียกว่า เมทัลโลโปรตีน (metalloprotein) เมทัลโลโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มขนส่งออกซิเจน (dioxygen transport) มีความสำคัญในกึ่งทำหน้าที่ในการลำเลียงและเก็บกักออกซิเจน ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการหายใจ โดยมีเหล็กและทองแดงเป็นโลหะที่สำคัญในกลุ่มนี้ (อริป, 2536) การเลี้ยงกุ้งขาวอย่างหนาแน่นจำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพการลำเลียงกักออกซิเจน โดยต้องเพิ่มการทำงานของโปรตีนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบร่วมในเลือดกุ้ง ได้แก่ เมทัลโลโปรตีน

สารประกอบเมทัลโลโปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลในกลุ่มโปรตีนที่ผลิตขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลำเลียงและเก็บกักออกซิเจนที่มีความจำเป็นโดยเฉพาะ กุ้งจะสามารถอยู่ในสภาพการเลี้ยงที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงได้ ความเครียดที่เกิดจากปริมาณออกซิเจนที่ลดต่ำลงในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงเป็นสาเหตุทำให้กุ้งเกิดความอ่อนแอและง่ายต่อการติดเชื้อโรค ดังนั้นการให้กุ้งได้รับสารประกอบเมทัลโลโปรตีน จะทำให้กุ้งได้รับออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้อัตราการรอดตายสูงขึ้น ผลผลิตจากการเลี้ยงจะเพิ่มขึ้นสามารถลดปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารเมทัลโลโปรตีน ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาผลของสารเมทัลโลโปรตีน ต่อความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาผลของสารเมทัลโลโปรตีน ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) หรือที่เกษตรกรไทยนิยมเรียกกันว่า กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ (Holthuis, 1980) มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา สอนดรัส โคลอมเบีย และบราซิล เป็นต้น (Rosenberry, 1993; FAO, 1994) ในทวีปเอเชียมีการนำเข้ากุ้งชนิดนี้เข้ามาเลี้ยงครั้งแรกที่ประเทศไทยได้หวั่นในปี พ.ศ. 2539 สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2545 กรมประมงอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง รวมระยะเวลาที่อนุญาต 11 เดือน โดยอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวได้จากแหล่งที่กรมประมง รับรองแล้วเท่านั้น (มาลินีและสมยศ, 2548) เกษตรกรบางส่วนทดลองเลี้ยงกุ้งขาวให้ผลค่อนข้างดีทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น

2. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย

ประเทศไทยเริ่มมีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 หลังจากกรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อจากต่างประเทศมาทดลองเลี้ยง ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าว การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยประสบปัญหากุ้งโตช้า เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน ขณะเดียวกันมีเกษตรกรบางส่วนทดลองเลี้ยงกุ้งขาวให้ผลค่อนข้างดีทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น (ปิยนุช, 2550) ปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งขาวแวนนาไม เนื่องจากเป็นกุ้งที่โตเร็ว เลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตสูง สามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูงเพราะได้ผ่านการปรับปรุงคัดเลือกสายพันธุ์มาแล้วอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน (ชลอและพรเลิศ, 2547) ซึ่งอัตราความหนาแน่นแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์หรือเป้าหมายของการผลิตและความพร้อมของฟาร์ม ซึ่งแบ่งได้เป็น

2.1 ระบบพัฒนาหรือความหนาแน่นสูง (intensive system) ฟาร์มกุ้งที่ใช้ระบบนี้ส่วนใหญ่จะมีพื้นที่บ่อประมาณ 3-6 ไร่ การเตรียมบ่อและการจัดการมีความละเอียดมากขึ้น ฟาร์มส่วนใหญ่จะมีบ่อพักน้ำคิดเป็นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่บ่อเลี้ยง มีอัตราการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นระหว่าง 60-90 ตัวต่อตารางเมตรหรือมากกว่านี้ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละพื้นที่

และความพร้อมของแต่ละฟาร์ม โดยมีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปและมีการให้อากาศอย่างเพียงพอที่สามารถรวมตะกอนของเสียไว้รวมกันก้นบ่อ ลักษณะการเลี้ยงแบบนี้จะให้ผลผลิตสูง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

2.2 ระบบพัฒนาหรือความหนาแน่นสูงมาก (superintensive system) ฟาร์มเลี้ยงกุ้งในระบบนี้บางฟาร์มจะตั้งอยู่ในโรงเรือน (greenhouse) ผลผลิตต่อปีอาจสูงถึง 3.2-16 ตันต่อไร่หรืออาจสูงกว่านี้ แต่มีฟาร์มจำนวนน้อยในประเทศไทยและประเทศสหรัฐอเมริกาและในบางประเทศเท่านั้นที่ใช้ระบบการเลี้ยงกุ้งแบบนี้ ตัวอย่างของฟาร์มที่มีการพัฒนาและใช้เทคโนโลยีในการจัดการฟาร์ม คือบริษัท Belize Aquaculture Ltd. (BAL) ในประเทศเบลีซและฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม Ocean Boy Farms ที่มลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ระบบนี้จะไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ แต่มีปริมาณเครื่องให้อากาศจำนวนมาก จัดการระบบน้ำหมุนเวียนป้องกันน้ำเสียโดยใช้ผลผลิตจากธรรมชาติ (McIntosh, 2000)

ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เกษตรกรส่วนใหญ่จะนิยมปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่น มีการให้อาหารสำเร็จรูป มีสูตรการให้อาหารที่เพิ่มจำนวนมือและปริมาณอาหาร เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูงสุด ภายในระยะเวลาที่สั้นเท่าที่จะทำได้จึงทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ในพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นสาเหตุให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงเสื่อมถอยลงอย่างรวดเร็ว มีผลต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง การที่มีอินทรีย์สารหรือสารที่เป็นของเสียตกค้างอยู่ในบ่อเป็นจำนวนมาก จะมีผลต่อคุณสมบัติของน้ำโดยเฉพาะปริมาณออกซิเจนที่ลดต่ำลง จนถึงระดับที่กุ้งเกิดความอ่อนแอและเกิดโรคติดเชื้อตามมาในที่สุด ส่งผลให้ผลผลิตของการเลี้ยงไม่ได้ตามเป้าหมาย (วัฒนาและคณะ, 2549)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดต่อการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย ซึ่งพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ระดับต่ำกว่า 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ประสิทธิภาพการลอกคราบลดลงเนื่องจากในขณะที่กุ้งลอกคราบ การดูดซึมออกซิเจนของกุ้งจะมีประสิทธิภาพต่ำลง ถ้าออกซิเจนอยู่ในระดับต่ำอาจทำให้กุ้งตายได้ง่ายระหว่างลอกคราบ เนื่องจากอาการขาดออกซิเจน นอกจากนี้แล้วออกซิเจนยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและจุลินทรีย์ในน้ำ เพราะถ้าในสภาวะที่มีออกซิเจน สารอินทรีย์จะถูกใช้ไปโดยสภาพที่ใช้ออกซิเจนและเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่มีพิษแทน เช่น น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์และไนเตรท ถ้าหากออกซิเจนไม่เพียงพอ สภาพการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นแทน แล้ว

ได้ผลผลิตที่เป็นพิษต่อกุ้ง เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีเทน แอมโมเนียและกรดอินทรีย์ เป็นต้น อาหารที่เหลือเมื่อมีการสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาในการเลี้ยง จะมีผลทำให้มีการใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายมากขึ้น จนทำให้เปลี่ยนเป็นสภาพขาดออกซิเจนได้ (วัฒนา และคณะ, 2549)

3. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม arthropod มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Bachère *et al.*, 2000) โดยจะไม่มีการตอบสนองและการสร้างสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) (กิจการ และคณะ, 2543 ค) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด (open circulatory system) (Söderhäll *et al.*, 1996) ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue พบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหารและโคนขาเดิน พบอยู่เป็นชุด ๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ธาตุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ haemocyanin โดยมีประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด มีแร่ธาตุคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน (Djangmah, 1970) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดของตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง (Chen and Cheng, 1993) เม็ดเลือดของกุ้งจะมีหน้าที่หลักในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ปริมาณเม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา จะมีปริมาณลดลงเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาในปริมาณที่เหมาะสม เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ เกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย (Söderhäll and Cerenius, 1992) กลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอม สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลไก คือ

3.1 กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism)

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

3.2 กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

3.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular defence mechanism)

การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ที่มีบทบาทสำคัญมี 3 ชนิด คือ hyaline cell, semi-granular และ large granular (Martin and Graves, 1985; Hose *et al.*, 1987) กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อ ภายในกระแสน้ำเหลือง ต่อมมน้ำเหลือง (lymphoid organ) กล้ามเนื้อหัวใจ hepatopancreas และอวัยวะอื่นๆ จำแนกโดยอาศัยการมีหรือไม่มี จำนวน การย้อมสีและโครงสร้างของแกรนูลในไซโทพลาซึม ได้แก่

1) hyaline cells หรือ hyaline hemocyte (hyalinocyte หรือ hyalocytes) หรือ non-granular cells เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ ไม่มีแกรนูล นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์มีขอบเขตของไซโทพลาซึมน้อย มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and Smith, 1986)

2) semi-granular cells หรือ semi-granular hemocyte (semigranulocyte) มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง hyaline cell และ granulocyte มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร ยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543ข) นิวเคลียสมีขนาดเล็กตรงกลางเซลล์หรือขอบเซลล์ ภายในไซโทพลาซึมมีแกรนูล (cytoplasmic granule) ขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย ลักษณะเซลล์ไม่แน่นอน มักแตกสลายตัวได้ง่าย เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่โดยตรงในการห่อล้อม และตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการ nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ phenoloxidase activating system นอกจากนี้ semi-granular cells ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกินได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) large granular cell หรือ large granular hemocyte (granulocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสมีขนาดเล็ก รูปร่างโค้งคล้ายไต เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8-10 ไมโครเมตร กว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร ยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543ข) ภายในไซโทพลาซึมมีแกรนูล (cytoplasmic granule) ขนาดใหญ่และพบจำนวนมาก เมื่อเทียบกับ semi-granular cell (Baucha, 1981) ลักษณะการยึดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ phenoloxidase activating system รวมทั้งยังสามารถทำการห่อล้อมและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation (Söderhäll and Cerenius, 1992)

ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรรณวไล, 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำจะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของกึ่ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

การศึกษาเม็ดเลือดของกึ่งโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular technique) ร่วมกับเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันมาศึกษาโปรตีนในเม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization (Keyser, 1999), enzyme activity (Söderhäll and Smith, 1983 a; Smith and Söderhäll, 1983; Sequeira *et al.*, 1996), immunogold (Liang *et al.*, 1992), immunofluorescence (Johansson *et al.*,

1999) และ immunoprecipitation (Liang *et al.*, 1992) พบว่าโปรตีนชนิด 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 semigranular cell แต่ไม่พบในเม็ดเลือดชนิด large granular cell เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย ปริมาณเม็ดเลือดภายในตัวกึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และจะมีปริมาณลดลง เมื่อกึ่งเกิดการติดเชื้อโรคจากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนเม็ดเลือดที่ตายไปในปริมาณที่เหมาะสม

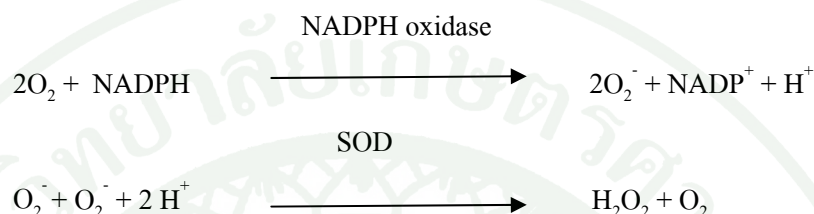
ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีกระบวนการหลักๆ 3 แบบ ได้แก่

1) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

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

การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด และมีการยื่นไซโทพลาซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจน (O_2) เข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่ง

ออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) ต่อจากนั้น superoxide anion จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยการเร่งปฏิกิริยาดูด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



superoxide anion อาจถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ และได้ออกซิเจน 1 โมเลกุล (singlet oxygen; 1O_2) เป็นผลผลิตร่วมกับ hydrogen peroxide นอกจากนี้ superoxide anion ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radicle (OH) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



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

2) กระบวนการ nodule formation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) โดยจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอม โดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็น nodule จะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย มักพบการสร้าง nodule ที่เหงือก และ hepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสี melanin ในกระบวนการ prophenoloxidase activating

system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือด ที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ semi-granular cell และ large granular cell (Johansson and Söderhäll, 1989)

3) กระบวนการ encapsulation

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

3.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

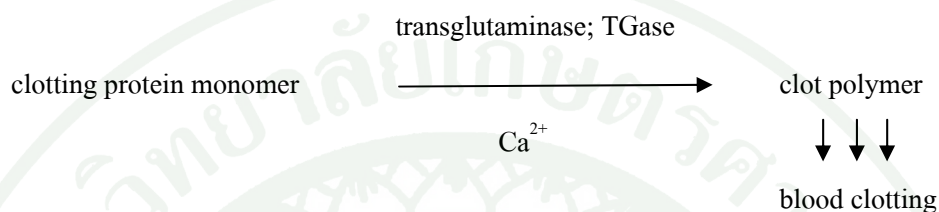
มีการทำงานต่อหรือพร้อมกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำและเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) มีน้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs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

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

1) กระบวนการแข็งตัวของเลือด

เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ transglutaminase จะไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่ง

ไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือดกึ่ง (วัชรียา, 2547) โดย transglutaminase จะทำงานร่วมกับ calcium ion (Ca^{2+}) กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการจับตัวเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้มีเลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting) ดังแสดงในสมการต่อไปนี้



2) การหลั่งสาร lectin

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

3) การหลั่งสารโปรตีนพวก peroxinectin

เป็นสารที่คล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factors) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ช่วยในการประสานงาน (พชรวิจิ, 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

และสารโปรตีนต่างๆ ภายในกรานูลถูกปล่อยออกมามากขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system

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

4) การหลั่งสารโปรตีน (protein released)

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

lysosome C type หน้าที่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลายระบบ osmoregulation ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

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

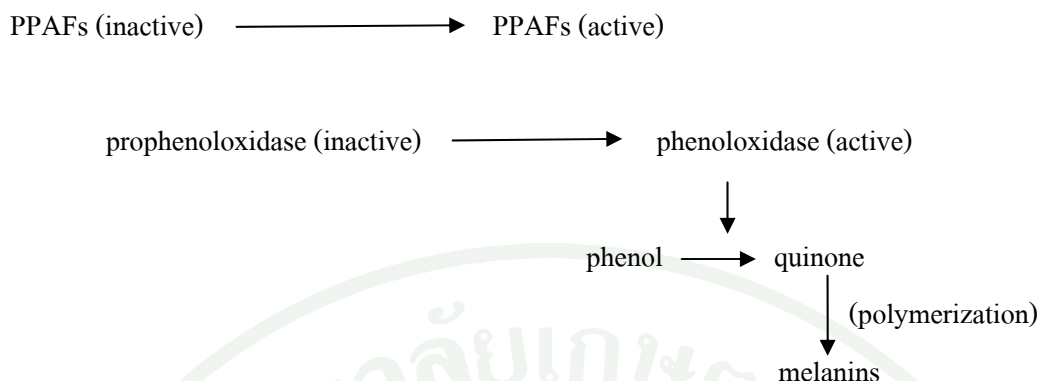
crustin หน้าที่เข้าไปเคลือบบนผนังเซลล์ทำให้เกิดการจับกันเป็น nodule เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย (Cuthbertson *et al.*, 2002)

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

สารโปรตีนพวก protein released สามารถพบได้ทั้งส่วนของน้ำ ซีรัมและในสารละลายเม็ดเลือดที่แตก (hemocyte lysate supernatant)

5) กระบวนการ prophenoloxidase activating system

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



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

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

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

การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายกุ้ง มีการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยจะตอบสนองทั้งภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดและภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ส่งผลให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับเชื้อก่อโรค โดยจำนวนเซลล์เม็ดเลือดจะลดลงทันทีในช่วงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงที่สองและที่สาม ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอยู่ในระดับต่ำคงที่หลังจากช่วงเวลาที่สี่ จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดใน

กุ้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (กิจการ และคณะ, 2543 ค) นอกจากนี้พบว่าอวัยวะ ได้แก่ หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดีและผลผลิตสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการ prophenoloxidase activating system

อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง คือ ต่อมน้ำเหลือง (Martin *et al.*, 1993) hemopoietic tissue ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิดโดยเซลล์เม็ดเลือดมีการกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร เซลล์เม็ดเลือดที่มักจะพบ คือ hyaline cell ซึ่งพบเศษเซลล์ และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และเกิด autophagic vacuoles (กิจการและคณะ, 2543 ค)

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

4. โรคและอาการผิดปกติของกุ้งขาวแอฟริกาที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

โรค Vibriosis

โรค Vibriosis มีสาเหตุจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งสั้น (short rod) สำหรับเชื้อ *Vibrio* ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแอฟริกา ได้แก่ *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* และ *Vibrio* sp. (Mohny *et al.*, 1994; Lightner, 1996; Gomez-Gil *et al.*, 1998) โรค Vibriosis เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในโรงเพาะฟัก เมื่อเกิดการระบาด ลูกกุ้งมักจะติดเชื้อเกือบทั้งหมด (Brock and Main, 1994; Hu and Tao, 2000)

โดยปกติ *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในการเลี้ยงกุ้ง สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในทางเดินอาหาร ตับและตับอ่อน และน้ำเลือดของกุ้งปกติ (Gomez-Gil *et al.*, 1998; Moss *et al.*, 2000) แต่จะก่อโรคเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมแล้วมีการเพิ่มจำนวนสูงขึ้น ซึ่งสาเหตุที่ทำให้กุ้งติดเชื้อส่วนใหญ่มาจากความเครียดอันเนื่องมาจากระบบการเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไป และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เนื่องจากกุ้งที่อยู่ในสภาวะเครียดจะมีภูมิคุ้มกันต่ำทำให้มีโอกาสติดเชื้อง่ายขึ้น (Burrell *et al.*, 1991; Nash *et al.*, 1992; Mohny *et al.*, 1994; Mikulski *et al.*, 2000; Labric, 2001) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกายเชื้อจะเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อหรือแพร่กระจายไปในระบบต่างๆ ทั้งร่างกาย เมื่อมีการติดเชื้อบริเวณเปลือกทำให้ปรากฏเป็นแผลสีดำหรือน้ำตาลที่บริเวณดังกล่าวเรียกว่า โรคจุดดำหรือน้ำตาล (black or brown spot disease) นอกจากนี้พบว่าถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดการตายถึง 70 เปอร์เซ็นต์ Lightner (1996) รายงานว่า กุ้งในบ่อคนที่ติดเชื้อ *Vibrio* spp. จะเจริญเติบโตช้าและมีอัตราการตายสูง สำหรับกุ้งขาวแปซิฟิกที่เป็นโรค Vibriosis พบว่าอาการของโรคมีทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยกุ้งจะแสดงลักษณะและพฤติกรรมภายนอกผิดปกติ ได้แก่ เบื่ออาหาร ว่ายน้ำไร้ทิศทาง และมักขึ้นมาอาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำและขอบบ่อเนื่องจากปริมาณออกซิเจนในเลือดต่ำ (hypoxia) (Robertson *et al.*, 1998) บริเวณเปลือก รยางค์และเหงือกจะเกิดการอักเสบ กล้ามเนื้อชूनกล้ามเนื้อตาย รยางค์ขาด (Takahashi *et al.*, 1985; Sindermann, 1990; Brock and Main, 1994) กรณีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. จะพบว่าบริเวณตับและตับอ่อนจะมีการสะสมไขมัน (liquid vacuolation) ที่เป็นพลังงานสำรองน้อยลง (Anderson *et al.*, 1988; Cuellar *et al.*, 1998) นอกจากนี้พบว่าเกิด septic hemocytic nodules ในต่อมน้ำเหลือง หัวใจ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ตับและตับอ่อน antennal gland ปมประสาท แพนหาง และกล้ามเนื้อ (Anderson *et al.*, 1988; Jiravanichpaisal and Miyazaki, 1994; Mohny *et al.*, 1994) สำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยความเสียหายจากเชื้อ *Vibrio* ส่วนใหญ่เกิดจาก *V. harveyi* ซึ่งทำให้เกิดโรคเรืองแสง ทำให้ลูกกุ้งในโรงเพาะฟักมีอัตราการตายสูงมากและทำให้กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงเสียหายเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในช่วงที่น้ำมีความเค็มสูง (ชลอ, 2543)

5. ปริมาณออกซิเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันและปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโตและสุขภาพกุ้ง ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำเกินไป อาจมีผลทำให้กุ้งตายได้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในบ่อจะเปลี่ยนแปลงคล้ายกับพีเอชคือมีค่าต่ำในตอนเช้าและสูงสุดในช่วงบ่ายที่มีแสงแดด ในสภาวะที่ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

Ocampo *et al.* (2000) พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับออกซิเจน 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 19, 23 และ 27 องศาเซลเซียส กุ้งขาวแวนนาไมจะมีการเจริญเติบโตเท่ากับ 4, 17 และ 26 มิลลิกรัมต่อวัน สูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีค่าเพียง 2, 12 และ 24 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อศึกษาอัตราการรอดตายพบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับออกซิเจน 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 77-82 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับออกซิเจน 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเพียง 68-85 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Jiang *et al.* (2005) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจน 7.5 และ 5.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดรวม แต่เมื่อกุ้งได้รับออกซิเจนระดับต่ำกว่าเท่ากับ 3.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังคงที่หลังจาก 24 ชั่วโมง และเมื่อศึกษากิจกรรม phenoloxidase, bacteriolytic activity และ antibacterial activity ของกุ้งที่เลี้ยงในปริมาณออกซิเจน 7.5 และ 5.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งในปริมาณออกซิเจน 3.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะพบว่า กิจกรรม phenoloxidase เพิ่มขึ้น, bacteriolytic activity และ antibacterial activity ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Cheng *et al.* (2002) ทำการศึกษากุ้งก้ามกรามโดยการฉีดเชื้อ *Enterococcus* และเลี้ยงที่ระดับออกซิเจนต่างกัน พบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งที่ระดับ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะตายหลังจาก 6 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงที่ระดับออกซิเจนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.75 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะตายหลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลาเพิ่มขึ้นเท่ากับ 12 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกัน โดยเลี้ยงกุ้งที่ระดับออกซิเจนต่างกันเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ไม่มีความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ

granular cell แต่เมื่อเลี้ยงในปริมาณออกซิเจน 2.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลง 39 เปอร์เซ็นต์ และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรม phenoloxidase และ respiratory burst ลดลง 33 เปอร์เซ็นต์ และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ากระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และประสิทธิภาพการกำจัดแบคทีเรียลดลง 44 เปอร์เซ็นต์ และ 54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Moullac *et al.* (1998) ทำการทดลองศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของ *Penaeus stylirostris* ที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนอยู่ในระดับต่ำ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ hyaline cell ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้มีการลดลงของกิจกรรม respiratory burst ในทางตรงกันข้าม กิจกรรม phenoloxidase เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสัมพันธ์กับการยับยั้งแบคทีเรียของ plasma ในกระบวนการ prophenoloxidase เมื่อทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ได้กลัมนื้อกุ้ง พบว่า กุ้งที่ได้รับสภาวะขาดแคลนออกซิเจนนี้ มีการตาย 48 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีการตายเพียง 32 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Cheng *et al.* (2003) ศึกษาปริมาณของฮีโมไซยานินเพื่อหาปริมาณออกซิฮีโมไซยานิน (oxyhemocyanin) และโปรตีนที่ละลายในน้ำเลือดที่ระดับออกซิเจนต่างกัน พบว่า ค่าฮีโมไซยานินมีค่าระหว่าง 65.46-65.84 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการเพิ่มปริมาณออกซิฮีโมไซยานินและโปรตีนในน้ำเลือด หลังจากอยู่ในสภาวะขาดแคลนออกซิเจน (2.75, 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่าสูงสุดหลังจาก 48 ชั่วโมง จากการศึกษา Cheng *et al.* (2003) พบว่า การตอบสนองเพื่อชดเชยสภาวะที่ขาดออกซิเจนของกุ้ง คือการเพิ่มการดึงออกซิเจนโดยการเพิ่มปริมาณฮีโมไซยานิน โดยปริมาณฮีโมไซยานินที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลให้ความสามารถในการจับออกซิเจนเพิ่มขึ้น ในทำนองเดียวกัน ผลผลิตที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ, PCO_2 และไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากอยู่ในสภาวะขาดแคลนออกซิเจน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เป็นผลให้เลือดมีปริมาณไบคาร์บอเนตมากผิดปกติ (alkalosis)

6. สารชีวโมเลกุล

ในร่างกายสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ จะมีสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์และทำหน้าที่ต่างๆ อย่างหลากหลาย สารดังกล่าวประกอบด้วย polymer ของหน่วยย่อย (subunit หรือ monomer) แบ่งได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก สารชีวโมเลกุลเหล่านี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ กรดอะมิโน กรดไขมัน น้ำตาล และนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ การรวมตัวกันของหน่วยย่อยเล็กๆ ต้องอาศัยคุณสมบัติทั้งทางเคมีและฟิสิกส์ของสารแต่ละโมเลกุล

สารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อให้การทำงานในส่วนต่างๆ ของร่างกายดำเนินไปตามปกติ ได้แก่ โปรตีน ร่างกายจะใช้โปรตีนเป็นส่วนประกอบของเซลล์ จึงเป็นสารอาหารสำคัญที่ร่างกายจะขาดไม่ได้ โปรตีนเป็นโพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโน 50 ตัวขึ้นไป โดยทั่วไปโปรตีนจะมีการขดตัวให้มีรูปร่าง (conformation) ต่างๆ กัน เพื่อให้เหมาะสมกับหน้าที่

ความสำคัญของโปรตีน

โปรตีนมีบทบาทที่สำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่หลากหลายที่สุด เช่น ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในเซลล์ เป็นฮอร์โมน หรือเป็นตัวขนส่งสารต่างๆ ในร่างกาย ในทางการแพทย์จะมีการวิเคราะห์โปรตีน หรือเอนไซม์บางชนิดใน biological fluids ต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัย หรือติดตามอาการหรือการรักษาโรคหนึ่งๆ ได้ เช่น การวิเคราะห์ลิโปโปรตีนในพลาสมาจะช่วยวินิจฉัยภาวะไขมันในเลือดสูงหรือต่ำ (hyperlipoproteinemia หรือ hypolipoproteinemia) การหาปริมาณเอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่มีหลาย isozyme จะบ่งบอกถึงภาวะ myocardial infraction ได้ เป็นต้น

ประเภทของโปรตีน

โปรตีนสามารถแบ่งออกได้หลายประเภท ดังนี้ (อริป, 2536)

1. การแยกประเภทตามรูปร่าง

1.1 โปรตีนที่มีรูปร่างเป็นสายยาวหรือสานกันเป็นร่างแห (fibrous protein) มักเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำยากและให้ความเหนียว (tough) จึงเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เช่น collagen ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue), elastin, keratin เป็นโปรตีนที่พบที่ผิวหนัง ผม และเล็บ เป็นต้น

1.2 โปรตีนที่มีรูปร่างกลมหรือรี (globular protein) เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี ทำหน้าที่ต่างๆ เช่น เป็นเอนไซม์ ฮอร์โมน อิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารต่างๆ ในร่างกาย เช่น ฮีโมโกลบิน ทำหน้าที่ขนส่ง O_2 ในเลือด และแอลบูมินทำหน้าที่ขนส่งกรดไขมัน เป็นต้น

โปรตีนบางชนิดมีทั้งส่วนที่เป็นทั้ง fibrous และ globulin อยู่ด้วยกัน เช่น myosin ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนของกล้ามเนื้อ

2. การแยกประเภทตามการละลาย

2.1 แอลบูมิน (albumin) เป็นโปรตีนที่พบในซีรัมและไข่ขาว ละลายในน้ำ ตกตะกอนได้ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวและแข็งตัวเป็นลิ่มได้ด้วยความร้อน

2.2 โกลบูลิน (globulin) เป็นโปรตีนที่พบในซีรัม ละลายในน้ำเกลือเจือจาง ตกตะกอนได้ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตครึ่งอิ่มตัว แข็งตัวเป็นลิ่มได้ถ้าถูกความร้อน

2.3 ฮิสโตน (histone) เป็นโปรตีนที่รวมกับ DNA ในสัตว์ชั้นสูงเป็นโครโมโซม ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และไม่แข็งเป็นลิ่มด้วยความร้อน

2.4 โปรตามีน (protamine) เป็นโปรตีนที่พบในส่วนหัวของ sperm ละลายในน้ำและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ไม่แข็งตัวเป็นลิ่มด้วยความร้อน

2.5 โปรลามีน (prolamines) ละลายในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช่น zein ในข้าวโพด

2.6 สเคลอโรโปรตีน (scleroproteins) หรือ albuminoids เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดใดเลย ได้แก่ collagen, elastin และ keratin เป็นต้น

3. การแยกประเภทตามส่วนประกอบทางเคมี

3.1 Simple proteins เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนล้วนๆ ไม่มีสารอื่นปนอยู่เลย เช่น แอลบูมิน keratin

3.2 Complex หรือ Conjugated proteins ประกอบด้วย simple protein และสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน (prosthetic group) รวมอยู่ด้วย เรียกว่า holoprotein แต่ถ้าขาด prosthetic group ไป โปรตีนส่วนที่เหลือมีชื่อเรียกว่า apoprotein สำหรับ prosthetic group นี้จะมีความสำคัญที่ทำให้ conjugated protein มีหน้าที่ต่างๆ ตัวอย่าง prosthetic group ที่จับอยู่กับโปรตีน ได้แก่

<u>Prosthetic group</u>	<u>Conjugated protein</u>
กรดนิวคลีอิก	นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein)
ไขมัน	ลิพोโปรตีน (lipoprotein)
คาร์โบไฮเดรต	ไกลโคโปรตีน (glycoprotein)
หมู่โลหะ (metal ion)	เมทัลโลโปรตีน (metalloprotein)
ฮีม	ฮีโมโปรตีน (hemoprotein)
ฟอสเฟต	ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein)

4. การแยกประเภทตามคุณค่าทางโภชนาการ

4.1 Complete proteins เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสมบูรณ์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็นครบทุกชนิด ได้แก่ โปรตีนจากสัตว์ (ยกเว้นเจลาติน) และถั่วเหลือง

4.2 Incomplete proteins เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพไม่สมบูรณ์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็นไม่ครบทุกชนิด ได้แก่ โปรตีนจากพืชต่างๆ ยกเว้นถั่วเหลือง

5. การแยกประเภทตามหน้าที่ในร่างกาย

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีหน้าที่หลากหลายที่สุดในสิ่งมีชีวิต จึงอาจแยกโปรตีนเหล่านี้ตามลักษณะการทำหน้าที่ต่างๆ ได้ดังนี้

5.1 เป็นเอนไซม์ ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในร่างกาย

5.2 เป็นโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ทำให้เกิดความแข็งแรง เช่น collagen, elastin และ fibroin ซึ่งเป็นโปรตีนของเส้นไหม (silk) เป็นต้น

5.3 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว ในช่วงที่เซลล์กำลังมีกิจกรรมต่างๆ เช่น การแบ่งเซลล์ endocytosis, exocytosis การเคลื่อนที่แบบ amoeboid ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ตัวอย่างของโปรตีนชนิดนี้ เช่น actin, tubulin เป็นต้น

5.4 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายที่อาจจะเกิดกับเซลล์ของร่างกาย เช่น fibrinogen และ thrombin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด อิมมูโนโกลบูลิน หรือแอนติบอดี ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

5.5 เป็นฮอร์โมน ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานต่างๆ ของร่างกายให้เป็นปกติ เช่น insulin glucagon ทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด growth hormone ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย

5.6 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารต่างๆ ในร่างกาย เช่น ฮีโมโกลบิน ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนจากปอดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ไคโปโปรตีน ทำหน้าที่ขนส่งไขมันจากตับและลำไส้ไปยังอวัยวะต่างๆ transferrin ขนส่งเหล็ก เป็นต้น

5.7 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สะสม เช่น ferritin ทำหน้าที่สะสมเหล็กไว้ในเนื้อเยื่อ, thyroglobulin ทำหน้าที่เก็บรักษารอยด์ฮอร์โมนไว้ในต่อมธัยรอยด์ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะอีกมาก ตลอดจนยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่ทำหน้าที่ได้หลายอย่าง (conjugated protein) ประกอบด้วย simple protein และสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน (prosthetic group) รวมอยู่ด้วย เรียกว่า holoprotein แต่ถ้าขาด prosthetic group ไป โปรตีนส่วนที่เหลือมีชื่อเรียกว่า apoprotein

Prosthetic group ที่จับอยู่กับโปรตีน เช่น หมู่โลหะ (metal ion) จะทำให้เกิด conjugated protein ที่เรียกว่า เมทัลโลโปรตีน ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบร่วม

เมทัลโลโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่

1. Hydrolytic enzyme ได้แก่ carbonic anhydrase (Zn ใน Carbonic anhydrase)

- Zn^{2+} เป็น active metal center ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O และ CO_2 ให้เป็นกรดคาร์บอนิก



ก่อนทำปฏิกิริยา Zn^{2+} เกิดพันธะโมเลกุลน้ำ เกิดเป็น tetrahedral coordination (x-ray structure) และหลังจากทำปฏิกิริยาเกิด ligand chelate complex: Zn^{2+} สร้างพันธะกับ HCO_3^-

2. Dehydrogenase : Alcohol dehydrogenase

Dehydrogenase ทำหน้าที่เปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นอัลดีไฮด์ ดังสมการ



Zn^{2+} จำนวน 2 ไอออนซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกัน โดย Zn^{2+} ตัวที่หนึ่งมีบทบาทโดยตรงในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ catalytic domain ส่วน Zn^{2+} ตัวที่สองเกี่ยวข้องกับการ stabilize โครงสร้างของโปรตีนอยู่ที่ dimer interface, Liver alcohol dehydrogenase ขนาด 40 kDa ทำงานในสภาพเป็น dimer

3. nitrogenase : การตรึงไนโตรเจนด้วยเอนไซม์ nitrogenase

ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) เป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ที่มีการถ่ายเท 8 อิเล็กตรอน ดังสมการ $N_2 + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2$ ซึ่งปฏิกิริยานี้ใช้เอนไซม์ nitrogenase ช่วยในการทำปฏิกิริยา มีโลหะ คือ Fe และ Mo โดยกลุ่มของ Fe จะจับกับ S จำนวนหนึ่งสร้างเป็นคลัสเตอร์ เรียกว่า Iron-sulfur cluster และมี molybdenum ที่มีส่วนช่วยในการทำปฏิกิริยา

4. เมทัลโลโปรตีนในกลุ่มขนส่ง O_2 (Dioxygen Transport) รับผิดชอบในการลำเลียงและเก็บก๊าซออกซิเจนซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการหายใจ มี Fe และ Cu เป็นโลหะที่สำคัญในกลุ่มนี้ dioxygen transport ได้แก่

1. Hemoglobin-myoglobin family
2. Hemocyanins
3. Hemoerythins

5. เมทัลโลโปรตีนในกลุ่มถ่ายโอนอิเล็กตรอน (Electron transfer)

เป็นตัวกลางถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากโปรตีนหนึ่งไปสู่อีกโปรตีนหนึ่ง โดยเป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ซึ่งในระบบชีววิทยาส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน และการสังเคราะห์ เป็นต้น เมทัลโลโปรตีนในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะใช้ Fe^{2+} เป็น active center

6. เมทัลโลโปรตีนในกลุ่ม Ion channels

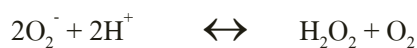
ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณไอออนอัลคาไล และอัลคาไลเอิร์ทของเซลล์ แทรกอยู่บริเวณเซลล์เมมเบรน มีความจำเพาะต่อชนิดของสาร โดยมีบทบาทที่สำคัญในระบบประสาท การตอบสนองและการส่งสัญญาณของเซลล์ประสาท การควบคุมสมดุลของปริมาณสารภายในเซลล์

7. เมทัลโลโปรตีนในกลุ่มขนส่งและกักเก็บโลหะ (Transport and Storage of Metal-Ion)

ทำหน้าที่ขนส่งและกักเก็บโลหะ โดยเฉพาะเหล็ก ซึ่งเป็นชนิดที่มีการศึกษามากที่สุด นอกจากนี้ยังควบคุมปริมาณโลหะในเซลล์และการใช้ประโยชน์จากโลหะ (transferrin และ ferritin) เช่น transferrin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งเหล็กในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ในแบคทีเรียเรียก siderophores) ส่วนโปรตีนที่ทำหน้าที่กักเก็บเหล็กเรียกว่า ferritin ในกรณีที่มีปริมาณเหล็กมากเกินไป metallothionein จะเข้ามาทำหน้าที่กำจัดออก ลดความเป็นพิษต่อเซลล์

8. Cu-Zn superoxide dismutase (สารต้านอนุมูลอิสระ)

เป็นเมทัลโลเอนไซม์กำจัดสาร (O_2^-) ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย disproportionation of superoxide ion ดังสมการ



9. Photosystem II เมทัลโลเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง



7. ความสำคัญของทองแดง (คอปเปอร์) ต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง

ทองแดงเป็นแร่ธาตุที่มีปริมาณต่ำมากในน้ำทะเล จึงทำให้กุ้งได้รับไม่เพียงพอต่อความต้องการเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการทางสรีรเคมีภายในร่างกายกุ้ง ทองแดงทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างเม็ดเลือด (haematopoiesis) โดยกุ้งต้องใช้ทองแดงเพื่อเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่เกี่ยวกับการหายใจ (respiratory pigment) ฮีโมไซยานินผลิตจาก mid gut (Mangum, 1989) ทำหน้าที่หลักในการจับออกซิเจน (oxygen affinity) (Mangum, 1989) และลำเลียงออกซิเจน (Dallinger, 1997) โปรตีนในเลือดกุ้งที่เป็น macrocrustacean จะมีฮีโมไซยานินเป็นส่วนประกอบถึง 80-95 เปอร์เซ็นต์ (Claybook, 1983) และฮีโมไซยานิน เป็นรงควัตถุที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งประกอบด้วยทองแดง 0.17 เปอร์เซ็นต์, carbohydrate น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ และมี lipid, polypeptide เล็กน้อยในโครงสร้างที่มีรูปแบบ hexamer ซึ่งมีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงในการจับออกซิเจน นอกจากนี้ทองแดงยังมีการใช้ในกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) หลายชนิด เช่น lysyl oxidase, cytochrome c oxidase (CCO), ferroxidase, tyrosinase และ superoxide dismutase (SOD) (O'Dell, 1976)

จากการทดลองที่มีการเสริมทองแดงที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ให้กับกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ากุ้งชุดที่ได้รับทองแดง ที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ในอัตราที่เหมาะสม สามารถทนต่อสภาพที่ขาดออกซิเจนที่ต่ำและระยะเวลานานขึ้นกว่าชุดควบคุมถึงเท่าตัว (บุญรัตน์, 2553) จึงทำให้กุ้งมีโอกาสรอดตายสูงขึ้น ในการเลี้ยงจริงในฟาร์มที่มักประสบปัญหาออกซิเจนต่ำในช่วงเช้ามืดหรือในสภาวะพื้นบ่อเสื่อมโทรมหลังจากการเลี้ยงไปแล้วประมาณ 2 เดือน จากการทดลองพบความเข้มข้นของโปรตีนและทองแดง ในเลือดกุ้งสูงขึ้น (บุญรัตน์, 2553) จึงเป็นไปได้ว่ากุ้งกลุ่มดังกล่าวสามารถจับออกซิเจนและลำเลียงออกซิเจนได้มีประสิทธิภาพสูงกว่า

เมื่อกุ้งได้รับทองแดงในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (immune enhancement) ในตัวกุ้งได้ เนื่องจากไปกระตุ้นการสร้างจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดให้สูงขึ้น เพราะเม็ดเลือดกุ้งส่วนหนึ่งจะช่วยในกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย คล้ายกับการทำงานของเม็ดเลือดขาวในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate leukocyte) ยังส่งผลให้เลือดกุ้งมีการผลิต superoxide anion (O_2^-) ภายในเซลล์ให้สูงขึ้นด้วย (Lee and Shiau, 2002) ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการตายสูงขึ้น เพราะขาดปัจจัยเสี่ยงของความเครียดที่เกิดขึ้นจากการขาดออกซิเจนแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง

Lee and Shiau (2002) พบว่า ความเข้มข้นของทองแดงที่เหมาะสมต่อน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพการกินอาหาร เท่ากับ 15-21 มิลลิกรัมทองแดงต่อกิโลกรัมของอาหารและระดับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เท่ากับ 10-30 มิลลิกรัมทองแดงต่อกิโลกรัมของอาหาร

จากเหตุผลที่กุ้งมีประสิทธิภาพการรับออกซิเจนได้ดีขึ้น จึงน่าจะส่งผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารและการลำเลียงสารอาหาร เพราะว่ากระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องใช้ ออกซิเจน เมื่อมีประสิทธิภาพในการลำเลียงออกซิเจนได้ดีก็ย่อมส่งผลต่อกระบวนการนี้ จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (ลด feed conversion rate (FCR)) และเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เพราะสามารถจัดสรรพลังงานมาดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากกุ้งได้รับทองแดงในอาหารตามความต้องการแล้ว จะไปมีผลต่อการเจริญเติบโต (บุญรัตน์, 2553; Lee and Shiau, 2002) เนื่องจากทองแดงเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อและเปลือก (soft and hard tissue mineralization) (Davis and Lawrence, 1997) ออกซิเจนที่ต่ำในร่างกายกุ้งยังส่งผลต่อการกินอาหาร (feed ingestion) และการเจริญเติบโตของกุ้งน้ำจืดและกุ้งทะเลหลายชนิด เช่น กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) (Llobera, 1983) กุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งกุลาดำ (Seidman and Lawrence, 1985) แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารรวมไขมันและโปรตีน แต่น่าจะมีผลต่อการใช้กรด อะมิโนบางชนิดเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน (Pouliot and de la Noue, 1989)

ออกซิเจนที่มากเพียงพอในร่างกายกุ้งนั้นยังส่งผลต่อความสำเร็จในการลอกคราบของกุ้งอีกด้วย เนื่องจากช่วงที่กุ้งลอกคราบ กำลังลอกคราบและหลังจากลอกคราบนั้น กุ้งจะมีการใช้พลังงานอย่างมากในการควบคุมสมดุลเกลือแร่และการสร้างแรงดันน้ำภายในร่างกาย (hydrostatic pressure) ช่วยก่อนลอกคราบ และต้องมีพลังงานมากในการปรับสมดุลเกลือแร่ภายหลังลอกคราบ ซึ่ง Mangum (1989) พบว่า ฮีโมไซยานินมีประสิทธิภาพต่ำสุดในการจับออกซิเจนหลังลอกคราบใหม่ๆ จึงเป็นวิกฤติมากสำหรับการดำรงชีวิตของกุ้ง ซึ่งกุ้งต้องเผชิญอย่างต่อเนื่อง ซึ่งกิจกรรม

ทั้งหมดนี้ต้องใช้พลังงานและต้องการออกซิเจนสูง ดังนั้นเมื่อกุ้งมีออกซิเจนในร่างกายมากพอ ส่งผลให้กุ้งมีโอกาสรอดตายมากขึ้นในกระบวนการลอกคราบรวมถึงการเจริญเติบโตด้วย

อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการจับออกซิเจนของฮีโมไซยานินจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่ออุณหภูมิ น้ำลดลง, มีปริมาณ Ca^{2+} , Mg^{2+} จากโซเดียมคลอไรด์ (NaCl), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ในน้ำที่เพียงพอและเหมาะสม (Mangum, 1989) ขณะที่ความเค็มลดลงจะส่งผลต่อการจับออกซิเจนในเลือดด้วย (Truchot, 1973; Mangum, 1989)

นอกจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำแล้ว ควรคำนึงถึงออกซิเจนในร่างกายกุ้ง หากกุ้งมีข้อจำกัดในการรับออกซิเจน การเติมออกซิเจนลงในน้ำไปมากเพียงใด ก็ไม่เป็นผลดีต่อกุ้ง และที่สำคัญทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นอีก ดังนั้นควรให้ความสำคัญในเรื่องการสร้างกลไกสร้างตัวรับออกซิเจน คือ ฮีโมไซยานิน ซึ่งทำให้กุ้งมีประสิทธิภาพในการรับและลำเลียงออกซิเจนไปใช้ในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (บุญรัตน์, 2553)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีนในสถานะที่ได้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำปกติ ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาครั้งนี้ใช้ผลิตภัณฑ์เมทิลโลโปรตีน จากบริษัท CISCHEM AGRICULTURE จำกัด ประเทศไทย ลักษณะของเมทิลโลโปรตีน เป็นผงละเอียดสีขาวผสมกับฟอสเฟต มีส่วนประกอบหลักได้แก่ โปรตีนและทองแดง (Cu^{2+})

1. การวางแผนการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ชุดของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับสารเมทิลโลโปรตีน ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 10 จากโรงเพาะฟักในจังหวัดฉะเชิงเทรา มาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 5 วัน ในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร บรรจุน้ำความเค็ม 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น., 12.00 น., 16.00 น. และ 20.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 3 วัน เมื่อกุ้งได้ระยะโพสลาร์วา 15 คัดเลือกลูกกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกัน สุ่มลูกกุ้งบางส่วนนำมาชั่งน้ำหนักก่อนการทดลอง นำลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่คัดเลือกมาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร บรรจุด้วยน้ำความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 100 ลิตร จำนวน 8 ถังและใส่กุ้งจำนวนถึงละ 50 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 10 วัน

3. การเลี้ยงและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดของอาหารควบคุม เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ชุดของอาหารสำเร็จรูปผสมกับสารเมทัลโลโปรตีน ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

เตรียมอาหารทดลองในชุดการทดลองที่ 2 โดยนำสารเมทัลโลโปรตีน ละลายในน้ำ นำไปคลุกกับอาหารเม็ดและเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก ส่วนอาหารทดลองในชุดการทดลองที่ 1 จะคลุกกับน้ำมันปลาหมึกเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2

ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ที่เวลาประมาณ 08.00 น., 12.00 น., 16.00 น. และ 20.00 น. ปรับปริมาณการให้อาหารตามน้ำหนักของกุ้ง ตามวิธีของ ชลอ และพรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกมื้อ

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

- บันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ในวันที่ 0, 20, 40 และ 60 วัน
- สุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งเมื่อกุ้งมีอายุ 40 วัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน
- วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ในระหว่างทำการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์โดยค่าพารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้

1. วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่ละลายในน้ำ และวัดอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง YSIDO200-4M
2. วัดพีเอชของน้ำโดยใช้ pH meter ORION Model Sa520
3. วัดความเค็มโดย salinometer
4. แอมโมเนียรวม (Total ammonia nitrogen:TAN) ใช้วิธี phenol-hypochloride ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)

5. ไนไตรท์ (nitrite-nitrogen) ใช้วิธี Colorimetric Method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)

6. ความกระด้างรวม (Total Hardness) ใช้วิธี Titration Method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)

7. ความเป็นด่างรวม (Total Alkalinity) ใช้วิธี Titration Method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)

6. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลอง ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ซ้ำละ 10 ตัว โดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันเลือดแข็งตัว เท่ากับ 1:2) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activating system) และการผลิต superoxide dismutase ด้วยวิธีดังนี้

6.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (Total Hemocyte Count)

6.1.1 คูดเลือดจากแอ่งเลือด โดยในหลอดนิตยารบรรจุสารป้องกันเลือด (อัตราส่วน เลือดต่อสารป้องกันเลือดแข็งตัว เท่ากับ 1:2) นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่า เชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

6.1.2 ใช้ micropipette คูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับ จำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

6.1.3 คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

6.2 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543ก)

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

บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สามารถนำไปละลายในน้ำเกลือได้ง่ายกว่าเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร TCBS จึงนิยมใช้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA)

6.2.2 เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอสำหรับการทดลองครั้งนั้นๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08-0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้

6.2.3 เจาะเลือดกึ่งจากแองเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกึ่ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดนิตยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

6.2.4 นำมาแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดกึ่งโดยนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสด้านบนมาใช้

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

6.2.6 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 6.2.2 มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรัม ในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6.2.7 นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละหลอด โดยใช้ น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร รวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

6.3 กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) ของเม็ดเลือดกึ่งตามวิธีของ Itami *et al.* (1994)

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

6.3.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

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

6.3.4 ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

6.3.5 นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตรและสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเม็ดเลือดกึ่งใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

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

6.3.7 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6.3.8 หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.3.9 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

6.3.10 หยดสารละลาย fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

6.3.11 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

6.3.12 ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

6.3.13 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตั้งทิ้งให้แห้งข้ามคืน

6.3.14 ปิดสไลด์ด้วย permount

นำข้อมูลไปวิเคราะห์โดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินยีสต์ และไม่กินยีสต์เข้าไป คำนวณค่าได้จาก

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

กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% phagocytosis)

6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกึ่งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543ก)

6.4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cystein 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวจนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

6.4.2 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

6.4.3 นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลาย K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4

6.4.4 ทำให้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ Sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

6.4.5 นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4.6 แยกส่วนใสด้านบนออก ซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase คัดแปลงจากวิธีการของ Söderhäll and Hall (1984)

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) นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัว สารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cystein 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับทริปซิน L-dihydroxyphenylalanine และ cacodylatebuffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

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

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta \text{ OD}_{490} / \text{นาที่} / \text{มิลลิกรัมโปรตีน}$$

6.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

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

6.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน S₁-S₆ จากสารละลาย CAL standard และสารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซ็นต์

6.5.2 นำสารละลายมาตรฐาน S₁-S₆ เตรียมให้ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมกับ R₁ 1,700 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย R₂ 250 ไมโครลิตร มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A₁ ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A₂ ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

1) เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cystein 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวจนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิตร

2) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

3) นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ

4) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

5) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง (ทำซ้ำข้อ 3-4) นำสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง

6) ละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิตร

- 7) นำสารละลายเม็ดเลือดที่เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร
- 8) นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank
- 9) นำค่า A_1 และ ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition โดยคำนวณหาค่าดังนี้

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

$$\% \text{ inhibition} = \frac{B_n}{B_{s_1}} \times 100$$

- 10) นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของสารละลายมาตรฐาน S_1-S_6 มาสร้างกราฟ log ฐาน เพื่อ นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของตัวอย่างเลือดกึ่งมาหาค่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ใน หน่วยเอนไซม์ superoxide dismutase units ต่อมิลลิลิตร (SOD units/ml)

7. การศึกษาความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

การทดลองนี้ใช้กุ้งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 60 วัน มาทดสอบทำให้ติดเชื้อ *V. harveyi* โดยจะทำการศึกษถึงอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

7.1 ทำการทดลองโดยปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 3 วัน เลี้ยงกุ้งทดลองชุดการทดลองละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อาหารตลอดเวลา คัดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

7.2 ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายลง 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ฉีดสารละลายเชื้อในกุ้งชุดการทดลองทุกตัว โดยฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุมซึ่งใส่กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ 1 ตู้ ทำการฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์

7.3 จดบันทึกการตายของกิ้งก่าทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกิ้งก่าที่แสดงอาการป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียนี้

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารผสมเมทิลโลโปรตีน ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกิ้งก่า กิจกรรมของขบวนการกลืนกิน สิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกิ้งก่า กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

2. การศึกษาผลของสารเมทิลโพรตีนในสถานะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกัน ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยมี 3 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม (control) กุ้งได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำสภาพปกติ คือสูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดเวลา

ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควบคุมให้อยู่ในระดับ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร รักษาระดับออกซิเจน โดยวัดออกซิเจนที่ละลายในน้ำในช่วงเช้าและเย็น ปรับให้ได้ระดับ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 กุ้งได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมกับสารเมทิลโพรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควบคุมให้อยู่ในระดับ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร รักษาระดับออกซิเจน เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 7.5 ± 0.5 กรัม มาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 5 วัน นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตรในน้ำความเค็ม 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น., 12.00 น., 16.00 น. และ 20.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 3 วัน เมื่อครบกำหนด 5 วัน คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกัน สุ่มกุ้งบางส่วนนำมาชั่งน้ำหนักก่อนการทดลอง นำกุ้งขาวแวนนาไมที่คัดเลือกมาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร บรรจุด้วยน้ำความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 300 ลิตร จำนวน 9 ถังและใส่กุ้งจำนวนถังละ 30 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 10 วัน

3. อาหารและการให้อาหาร

นำสารเมทัลโลโปรตีนที่ใช้ในชุดการทดลองละลายน้ำ และสเปรย์ลงบนอาหาร รอให้แห้ง และนำอาหารในทุกชุดการทดลองคลุกกับน้ำมันปลาหมึกและให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ที่เวลาประมาณ 08.00 น., 12.00 น., 16.00 น. และ 20.00 น. ปรับปริมาณการให้อาหารตามน้ำหนักของกุ้งตามวิธีของ ชลอและพรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 55 วัน อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการเตรียมใหม่ทุกเมื่อ

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

ทำการบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ในวันที่ 0, 40 และ 55 ของการทดลองและสุ่มชั่งน้ำหนักกุ้งเมื่อกุ้งมีอายุ 25 วัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 55 วัน หลังสิ้นสุดการทดลองวิเคราะห์ความแตกต่างทางด้านสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

5. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ในระหว่างทำการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์โดยค่าพารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ ได้ระบุไว้ในตารางทดลองที่ 1

6. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลอง ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 3 ตัว โดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันเลือดแข็งตัวเท่ากับ 1:2) หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิต superoxide dismutase ตามวิธีการที่ระบุไว้ในตารางทดลองที่ 1

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปปกติ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำสภาพปกติ, ชุดการทดลองที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปปกติ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควบคุมให้อยู่ในระดับ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตรและชุดการทดลองที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับสารเมทิลโดโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควบคุมให้อยู่ในระดับ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 – มิถุนายน พ.ศ. 2553

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยกุ้งขาวแวนนาไมควรจะมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และ/หรือมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้นกว่าการเลี้ยงแบบปกติ ซึ่งจะมีผลให้เกษตรกรมีรายได้และผลกำไรมากขึ้น ทำให้อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีการพัฒนาต่อไปได้อย่างยั่งยืน

แหล่งทุนสนับสนุน

บริษัท CISCHEM AGRICULTURE.CO.,LTD ประเทศไทย

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีนในสถานะที่ได้รับออกซิเจนที่ละลายในน้ำปกติ ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

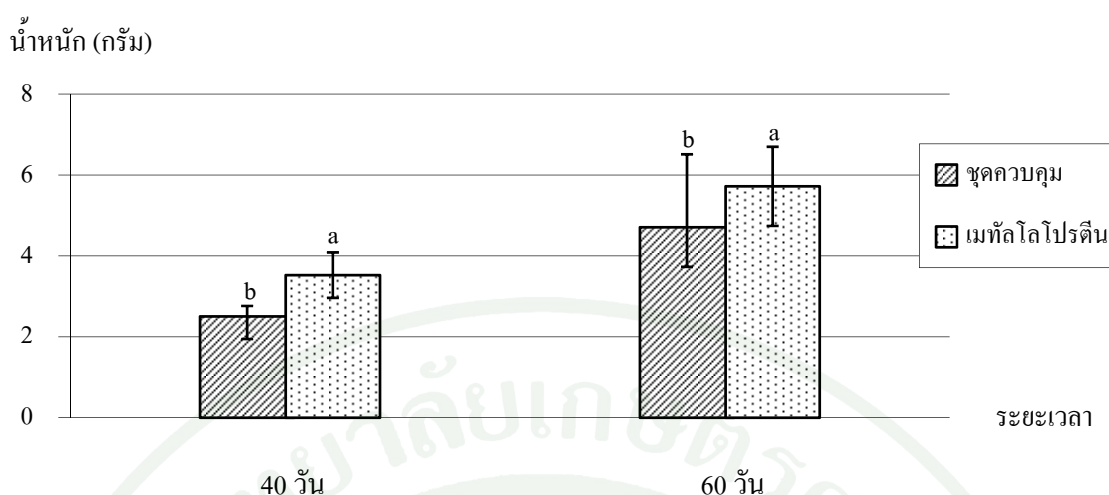
1.1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 15 ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่า หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 40 วัน กุ้งในชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.52 ± 0.56 กรัม มากกว่ากุ้งในชุดควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 2.51 ± 0.26 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนมีน้ำหนักเฉลี่ย 5.72 ± 0.98 กรัม มากกว่ากุ้งในชุดควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 4.71 ± 1.80 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนหลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 40 และ 60 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	
	ชุดควบคุม	ชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน
40	2.51 ± 0.26^b	3.52 ± 0.56^a
60	4.71 ± 1.80^b	5.72 ± 0.98^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกึ่งขาวแวนนาไมในชุดควบคุม และชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 40 และ 60 วัน

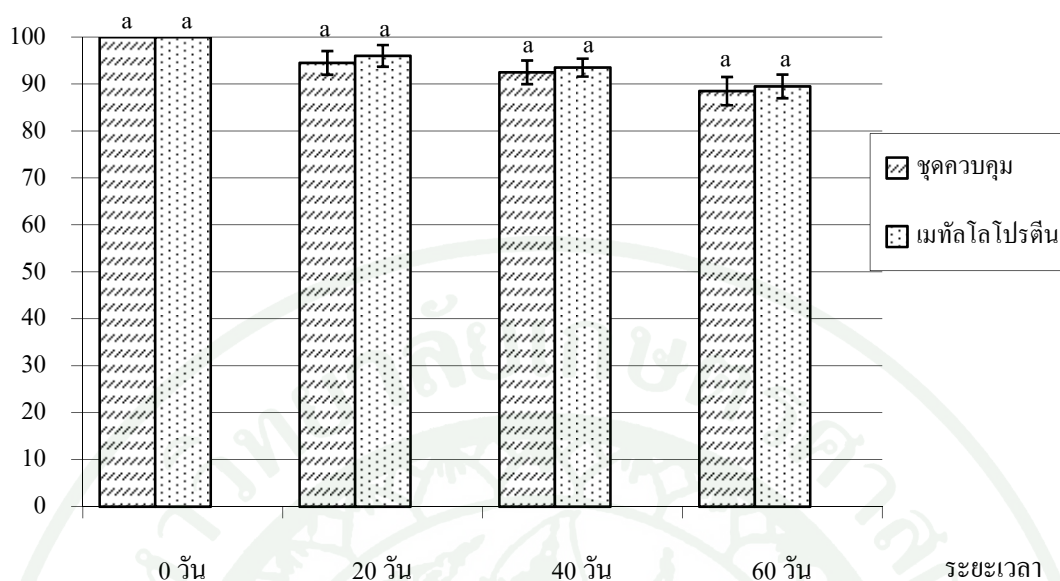
กึ่งขาวแวนนาไมชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนและกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2 โดยอัตราการรอดตายในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมที่เวลา 20, 40 และ 60 อยู่ในระดับที่สูงมาก คือมีกึ่งตายเพียงเล็กน้อยและค่อยๆเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงทั้งสองกลุ่มทดลอง โดยที่ระยะเวลา 60 วัน ชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 88.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดทดลองมีอัตราการรอดตาย 89.50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 อัตราการรอดตายของกึ่งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนหลังจากเลี้ยงกึ่งขาวเป็นระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

เวลาเลี้ยง(วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดควบคุม	ชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน
0	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
20	94.50 ± 2.52 ^a	96.00 ± 2.31 ^a
40	92.50 ± 2.52 ^a	93.50 ± 1.91 ^a
60	88.50 ± 3.00 ^a	89.50 ± 2.52 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 2 อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุม และชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

1.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสตาว่า 15 ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 60 วัน ศึกษาระดับภูมิคุ้มกันโดยวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม การทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิต superoxide dismutase มีผลการทดลองดังนี้

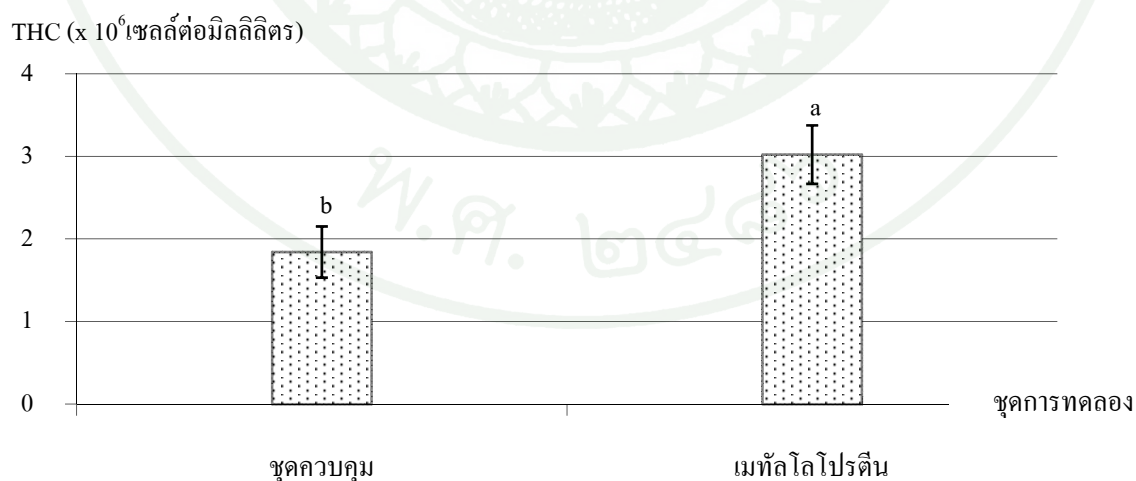
1) ปริมาณของเม็ดเลือดรวม

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีปริมาณเม็ดเลือดรวม $3.02 \pm 0.35 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีค่าสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมซึ่งได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ มีปริมาณเม็ดเลือดรวม $1.84 \pm 0.31 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
ชุดควบคุม	1.84 ± 0.3^b
ชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน	3.02 ± 0.35^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

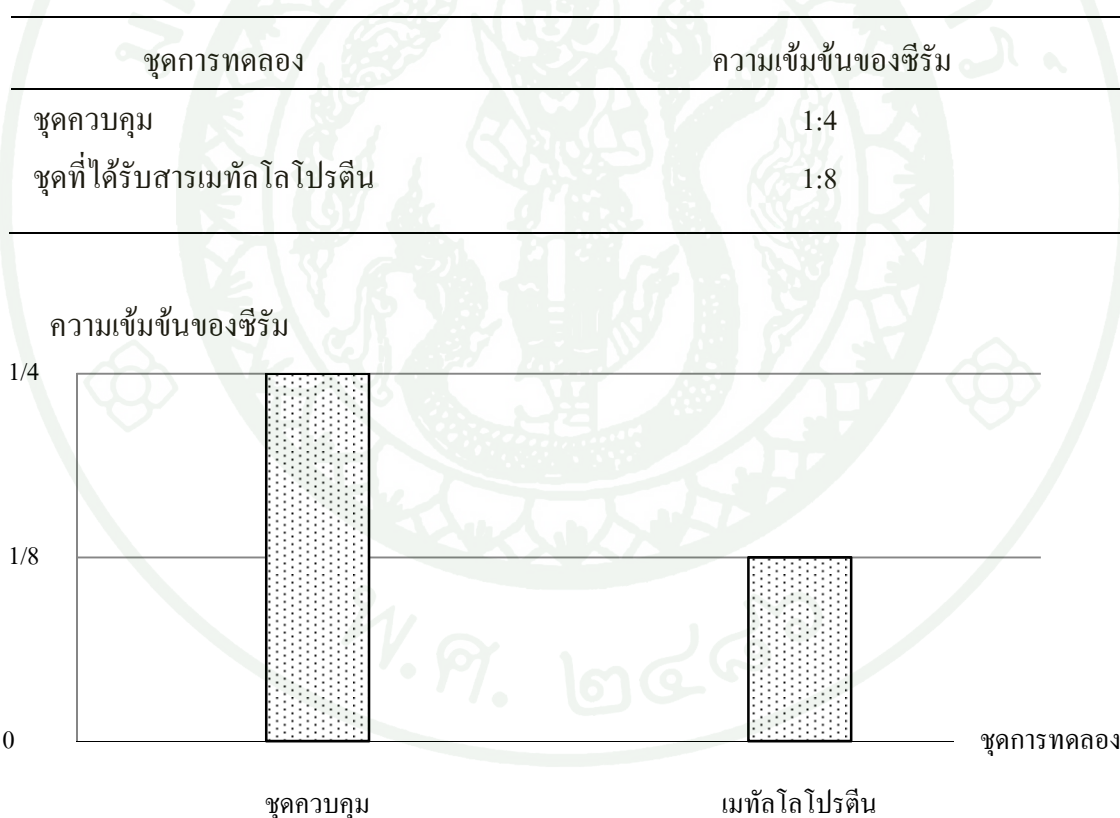


ภาพที่ 3 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

2) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลื้อยกุ้ง

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีน เป็นเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีน มีระดับการเจือจางของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1:8 ส่วนกุ้งในชุดควบคุมซึ่งได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ มีอัตราส่วนความเข้มข้นของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1:4 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 60 วัน



ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสาร เมทัลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

3) กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็คลีอดกุ้ง

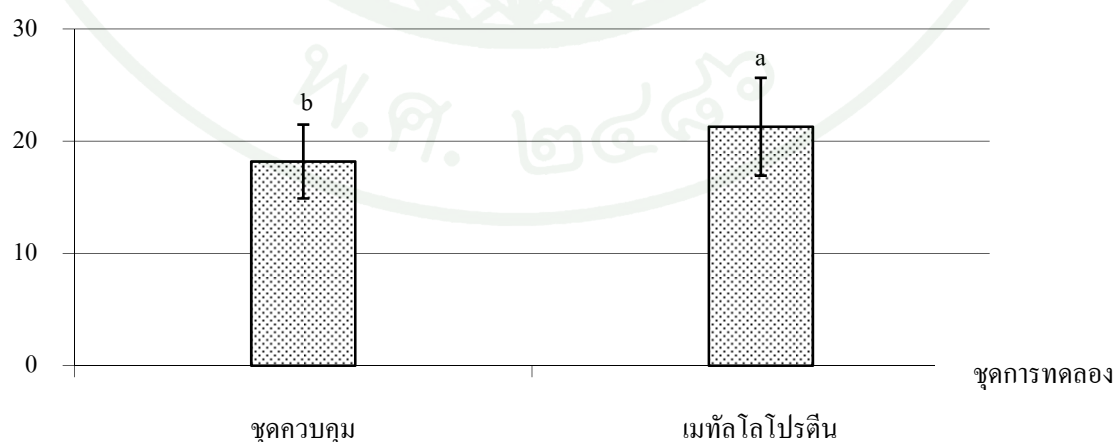
หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งชุดที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีน มีร้อยละของเม็คลีอดขาวที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 21.30 ± 4.36 สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ ซึ่งมีร้อยละของเม็คลีอดขาวที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 18.20 ± 3.29 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 5

ตารางที่ 5 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	ร้อยละของเม็คลีอดขาว ที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม
ชุดควบคุม	18.20 ± 3.29^b
ชุดที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน	21.30 ± 4.36^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เม็คลีอดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 5 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

4) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 312.65 ± 6.71 หน่วยต่อนาทิต่อมิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมซึ่งได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติเท่ากับ 272.85 ± 5.42 หน่วยต่อนาทิต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 และภาพที่ 6

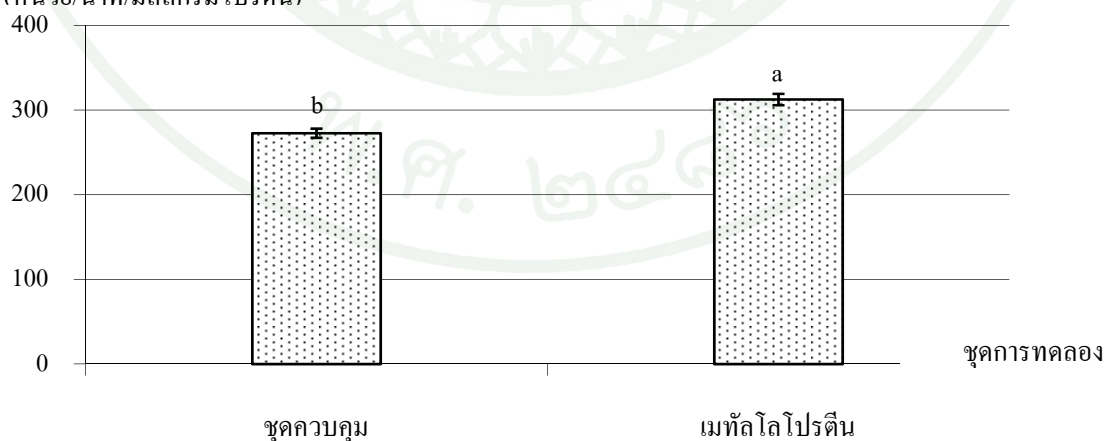
ตารางที่ 6 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	Phenoloxidase activity หน่วย/นาทิต่อมิลลิกรัมโปรตีน
ชุดควบคุม	272.85 ± 5.42^b
ชุดที่ได้รับสาร เมทิลโลโปรตีน	312.65 ± 6.71^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

(หน่วย/นาทิต่อมิลลิกรัมโปรตีน)



ภาพที่ 6 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

5) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

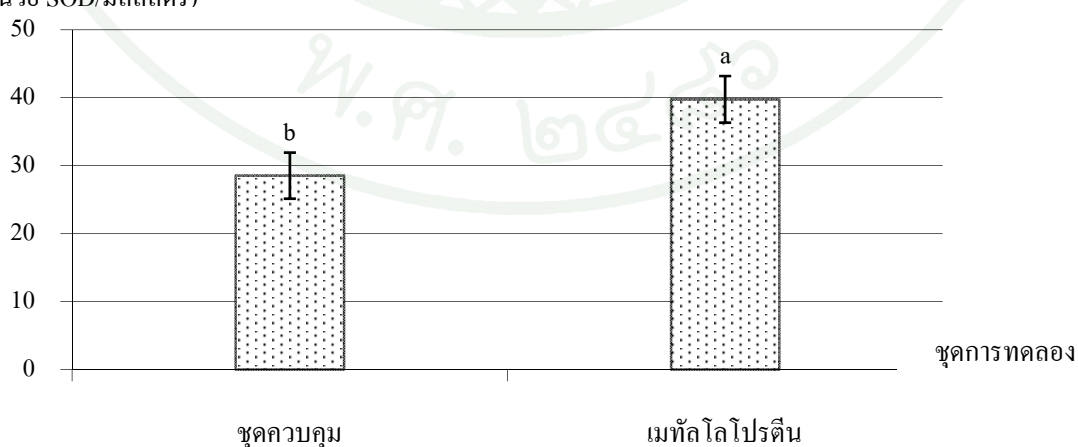
หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 39.75 ± 3.43 หน่วย SOD ต่อ มิลลิตร สูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมซึ่งได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ เท่ากับ 28.52 ± 3.39 หน่วย SOD ต่อ มิลลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7 และภาพที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 60 วัน

ชุดการทดลอง	การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase หน่วย SOD ต่อ มิลลิตร
ชุดควบคุม	28.52 ± 3.39^b
ชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน	39.75 ± 3.43^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase
(หน่วย SOD/มิลลิตร)



ภาพที่ 7 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

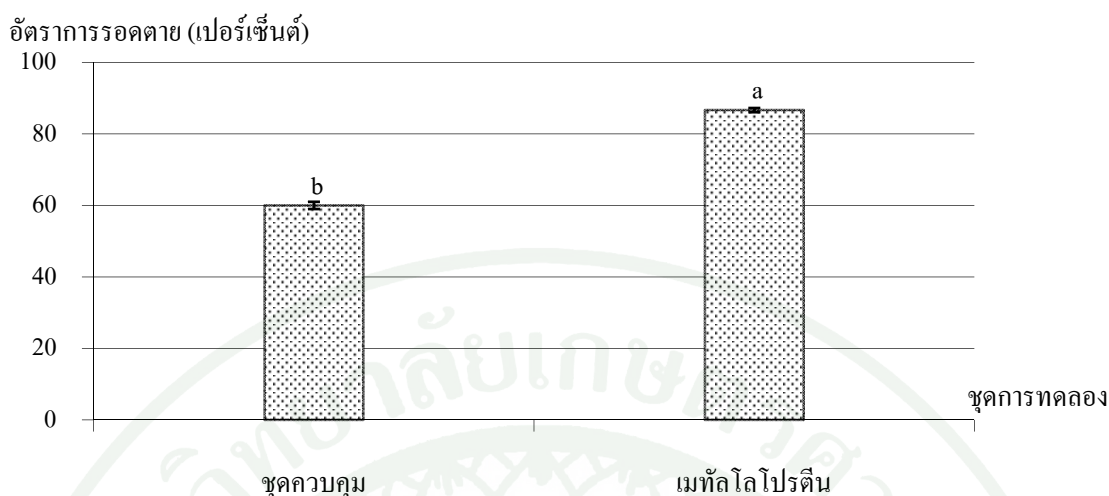
6) การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติและอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน เมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียโดยการฉีด *V. harveyi* ปริมาณ 5.3×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 60.00 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการรอดเท่ากับ 86.67 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8, ภาพที่ 8

ตารางที่ 8 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 60 วันเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 5.3×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
ชุดควบคุม	60.00 ± 1.00^b
ชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน	86.67 ± 0.58^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 8 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 5.3×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 60 วัน

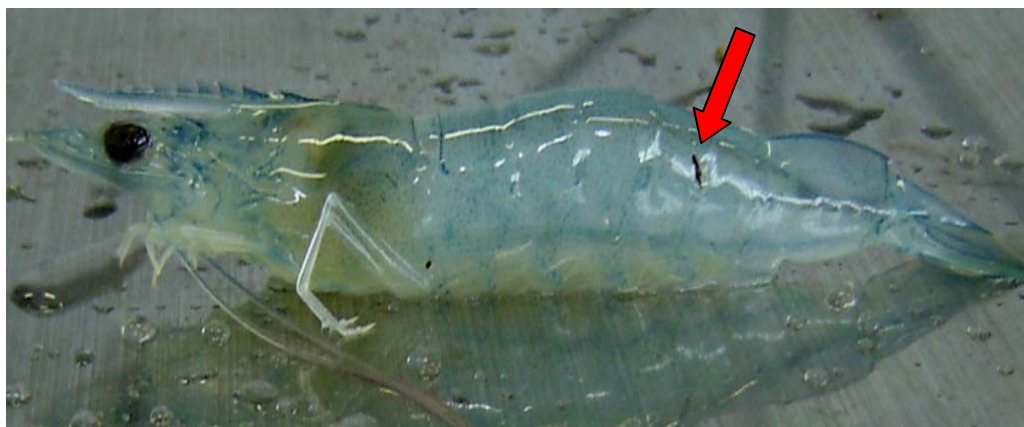
อาการภายนอกของกุ้งที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* พบว่ากุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยภายหลังจากได้รับเชื้อ 48 ชั่วโมง โดยกุ้งไม่มีการเคลื่อนไหวและไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่างๆ และตายในที่สุด กุ้งในชุดควบคุมตายมากกว่ากุ้งในชุดที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน เมื่อเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกุ้งที่แสดงอาการป่วย พบเชื้อแบคทีเรียขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะกับแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp. จากการสังเกตกุ้งที่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 10) และฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ พบการเกิด melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีดด้วยเข็มฉีดยา (ภาพที่ 11) สอดคล้องกับการศึกษาของ Fontaine and Lightner (1975) พบว่าเมื่อกุ้งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม ปฏิกริยาแรกที่กุ้งมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม คือ เซลล์เม็ดเลือดจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บและเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมขึ้น หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกริยา nodule formation และ encapsulation สังเกตได้จากจะพบเซลล์เม็ดเลือดมาล้อมรอบบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บ และจะมี cellular infiltration และ encapsulation เกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้น และมี collagen like fibers เกิดเป็นแผลถาวรขึ้น



ภาพที่ 9 โคโลนีของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่แยกได้จากกุ้งที่แสดงอาการป่วย หลังจากฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi*



ภาพที่ 10 การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* เข้าทางกล้ำมเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว



ภาพที่ 11 ลักษณะของเม็ดสี melanin ที่ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริเวณที่ถูกฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว (ลูกศรชี้)

คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 9 โดยทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวมและไนไตรท์พบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกชุดการทดลองอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

ตารางที่ 9 คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารเมทัลโล
โปรตีนและกลุ่มควบคุม นาน 60 วัน

คุณสมบัติของน้ำ		ชุดการทดลอง			
		ชุดควบคุม		เมทัลโลโปรตีน	
		พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิ					
(องศาเซลเซียส) เข้า		27.4-29.3	28.4±0.7 ^a	28.6-29.3	28.9±0.2 ^a
บ่าย		29.4-31.3	30.8±1.1 ^a	27.2-31.3	29.5±1.4 ^a
พีเอช					
เข้า		8.0-8.4	8.2±0.1 ^a	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a
บ่าย		8.0-8.4	8.2±0.1 ^a	8.0-8.4	8.2±0.1 ^a
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ					
(มิลลิกรัมต่อลิตร) เข้า		6.2-7.8	6.9±0.5 ^a	6.0-7.9	6.9±1.3 ^a
บ่าย		6.9-8.3	7.5±0.6 ^a	6.5-8.2	7.5±0.4 ^a
ความเค็ม (พีพีที)					
		24.8-26.0	25.2±0.5 ^a	25.1-26.2	25.3±0.5 ^a
การนำไฟฟ้า					
(มิลลิซีเมนต์ต่อ					
เซนติเมตร)		41.8-48.6	42.1±2.0 ^a	38.9-41.1	39.8±0.7 ^a
ความเป็นด่างรวม					
(มิลลิกรัมต่อลิตร)		84.7-147.3	97.8±28.0 ^a	88.7-128.7	99.9±13.4 ^a
ความกระด้างรวม					
(มิลลิกรัมต่อลิตร)		4081.2-5939.7	5010.5±1558.5 ^a	4356.0-5849.2	5103.0±1193.2 ^a
แอมโมเนียรวม					
(มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.1-0.7	0.4±0.2 ^a	0.2-0.7	0.4±0.2 ^a
ไนโตรัส					
(มิลลิกรัมต่อลิตร)		0.01-0.03	0.02±0.01 ^a	0.01-0.03	0.02±0.01 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2. การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีน ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม ในสภาพที่ออกซิเจนอยู่ในระดับต่ำ

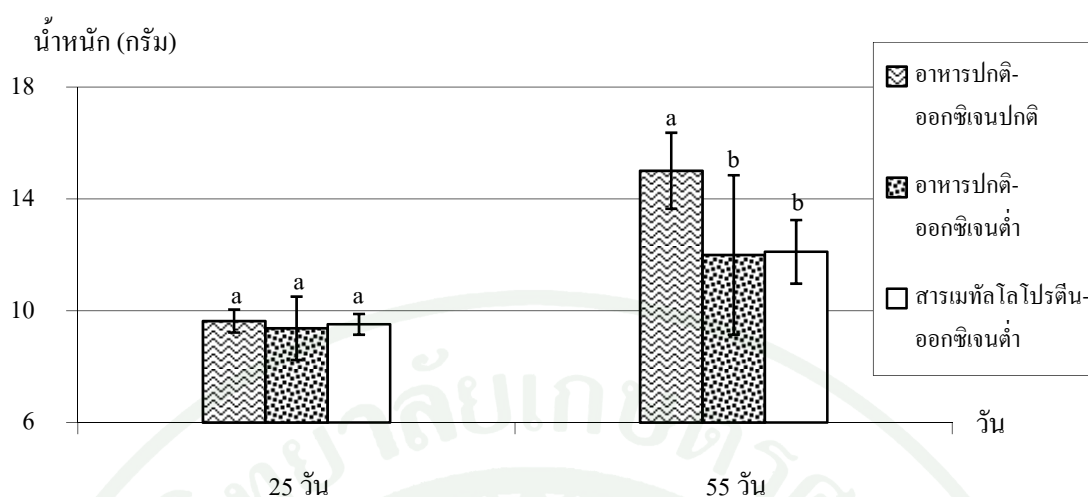
2.1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ย 7.5 ± 0.5 กรัม โดยให้อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน ในการเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 55 วัน กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ-ออกซิเจนปกติมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุด 15.00 ± 1.36 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดที่ได้รับออกซิเจนต่ำ-อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 12.11 ± 1.13 กรัม และชุดที่ได้รับออกซิเจนต่ำ-อาหารปกติ ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 12.00 ± 2.85 กรัม (ตารางที่ 10, ภาพที่ 12)

ตารางที่ 10 น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารและออกซิเจนปกติและชุดที่ได้รับอาหารปกติและสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะออกซิเจนระดับต่ำ ที่ระยะเวลา 25 และ 55 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
	อาหารปกติ, ออกซิเจนปกติ	อาหารปกติ ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน, ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร
0	7.35 ± 0.5^a	7.39 ± 0.45^a	7.35 ± 0.59^a
25	9.63 ± 0.41^a	9.37 ± 1.13^a	9.52 ± 0.37^a
55	15.00 ± 1.36^a	12.00 ± 2.85^b	12.11 ± 1.13^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 12 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) กุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารและออกซิเจนปกติ และชุดที่ได้รับอาหารปกติและสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะออกซิเจนระดับต่ำ ที่ระยะเวลา 25 และ 55 วัน

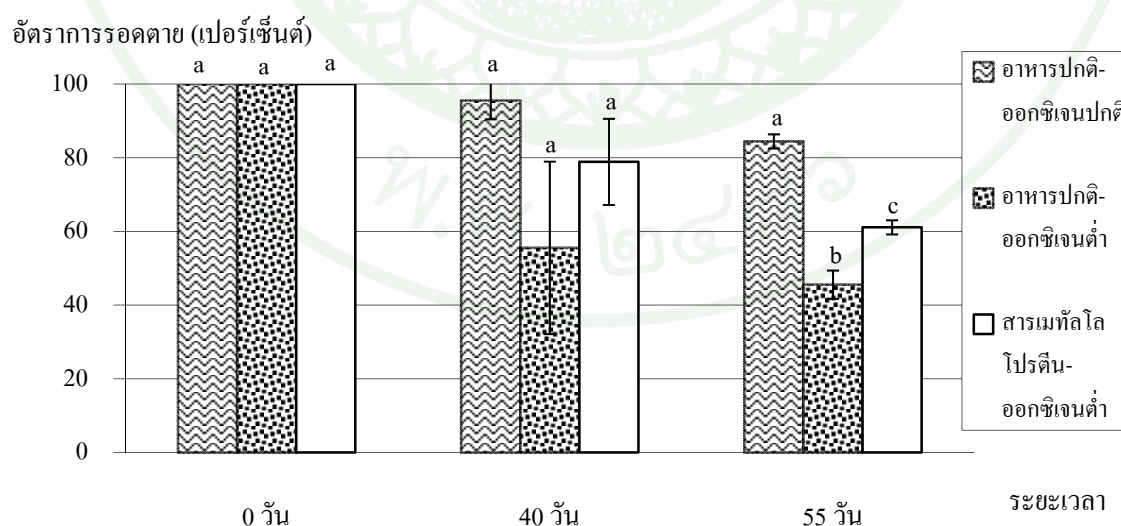
หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 40 วัน พบว่า กุ้งที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ และได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย (78.89 ± 11.71 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าชุดทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ที่สภาวะเดียวกัน (55.56 ± 23.41 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนปกติและได้รับอาหารปกติ พบว่ามีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 95.56 ± 5.09 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่ากุ้งชุดการทดลองที่ให้อาหารปกติ ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนปกติ มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 84.44 ± 3.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำและได้รับสารเมทิลโลโปรตีน ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ 61.11 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ชุดการทดลองนี้มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มที่ให้อาหารปกติในสภาวะเดียวกัน ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเพียง 45.56 ± 3.85 เปอร์เซ็นต์ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 11, ภาพที่ 13) อัตราการรอดตายของกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนปกติ สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆที่เลี้ยง ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนต่ำ เนื่องจากออกซิเจนในระดับที่สูงกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรตลอดระยะเวลา กุ้งจะมีการเจริญเติบโตดีและแข็งแรงทำให้มีอัตราการรอดตายสูง สอดคล้องกับการทดลองของ Ocampo *et al.* (2000) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับออกซิเจน 5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีอัตราการรอดตาย 77-82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่ได้รับออกซิเจน 2.6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 68-85 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ กลุ่มที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนจะมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ เนื่องจากสารนี้เป็นเมทิลโลโปรตีนที่สำคัญในกลุ่มขนส่งออกซิเจนซึ่งพบในตัวกุ้ง ทำหน้าที่ในการลำเลียงและเก็บกักออกซิเจนซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในกระบวนการหายใจ กุ้งที่ได้รับสารนี้จะมีอัตราการรอดตายสูง เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ

ตารางที่ 11 อัตราการรอดตายกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารและออกซิเจนปกติและชุดที่ได้รับอาหารปกติและสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะออกซิเจนระดับต่ำ ที่ระยะเวลา 40 และ 55 วัน

เวลาเลี้ยง (วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)		
	อาหารปกติ ออกซิเจนปกติ	อาหารปกติ ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร
0	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
40	95.56 ± 5.09 ^a	55.56 ± 23.41 ^a	78.89 ± 11.71 ^a
55	84.44 ± 1.92 ^a	45.56 ± 3.85 ^b	61.11 ± 1.92 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 13 อัตราการรอดตายกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารและออกซิเจนปกติและชุดที่ได้รับอาหารปกติและสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะออกซิเจนระดับต่ำ ที่ระยะเวลา 40 และ 55 วัน

2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารและออกซิเจนปกติ รวมทั้งกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่ำ เป็นระยะเวลา 55 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม การทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง เอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ในระหว่างการทดลองมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 29 ± 1 องศาเซลเซียส ด้วย heater รักษาระดับพีเอชของน้ำที่ 7.8-8.0 ความเค็มของน้ำประมาณ 25 พีพีทีให้อากาศในชุดควบคุมอย่างเพียงพอ และควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำในชุดที่ได้รับออกซิเจนต่ำให้อยู่ระดับ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตลอดระยะเวลา

1) ปริมาณของเม็ดเลือดรวม

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 55 วันด้วยอาหารปกติและออกซิเจนปกติและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนต่ำ พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ออกซิเจนปกติ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุดเท่ากับ $25 \pm 2.40 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ $24.22 \pm 2.91 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติในสภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากับ $19.74 \pm 3.43 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 12, ภาพที่ 14) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีความสำคัญเกี่ยวข้องต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโตและสุขภาพกุ้ง หากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในระดับปกติ กุ้งจะแข็งแรงและเจริญเติบโตดี แต่เมื่อปริมาณออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งอยู่ในระดับที่ต่ำ ซึ่งมักจะพบในบ่อที่มีการปล่อยกุ้งหนาแน่น มีเครื่องให้อากาศไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในช่วงท้ายของการเลี้ยง การสะสมจากเศษอาหารที่เหลือและของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา จุลินทรีย์จะมีการใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (ชโล, 2543) ทำให้ปริมาณออกซิเจนลดลงอาจถึงสภาวะการขาดออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งจะพบในบริเวณที่มีการสะสมตะกอนเลนกลางบ่อและบริเวณชานเลน มีผลทำให้สุขภาพกุ้งอ่อนแอ ระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของเม็ดเลือดจะลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ

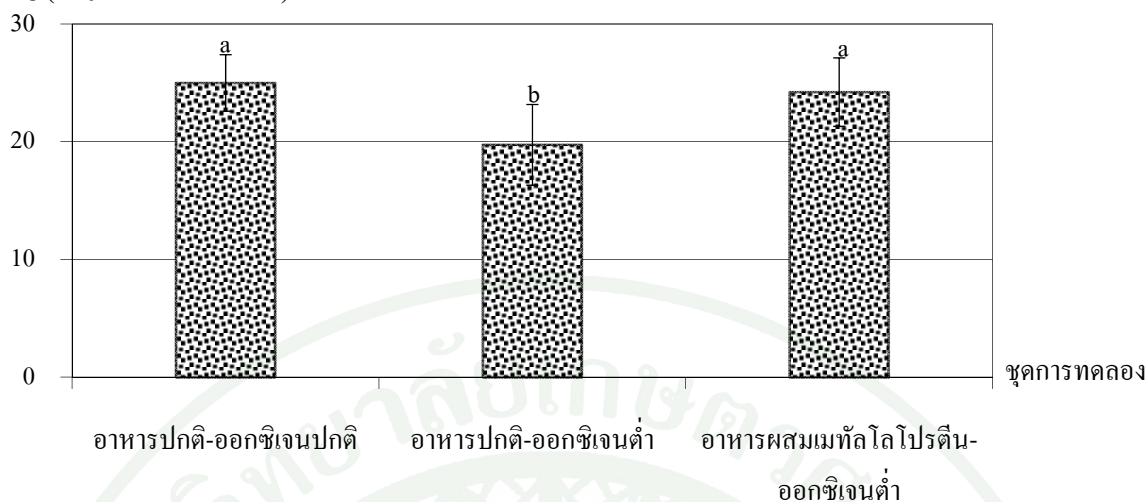
Jiang *et al.* (2005) ซึ่งพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มที่อยู่ในสภาวะขาดแคลนออกซิเจน (hypoxia) จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงอย่างมีนัยสำคัญและคงที่หลังจาก 24 ชั่วโมงและกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนในปริมาณเพียงพอจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเม็ดเลือดรวม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตามรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการหายใจในตัวกุ้งซึ่งทำหน้าที่หลักในการจับออกซิเจน ได้แก่ ฮีโมไซยานิน ซึ่งมีโลหะที่เป็นองค์ประกอบรวมได้แก่ ทองแดง (Cu) มีหน้าที่ในการลำเลียงและเก็บกักออกซิเจนซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการหายใจก็จัดอยู่ในกลุ่มของเมทัลโลโปรตีนเช่นกัน เมทัลโลโปรตีนเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ เมื่อกุ้งได้รับเมทัลโลโปรตีนซึ่งมีทองแดงเป็นองค์ประกอบรวมเพิ่มเข้าไปในร่างกาย จะเป็นหนทางที่จะช่วยให้กุ้งมีความสามารถในการดึงออกซิเจนจากน้ำและลำเลียงไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในช่วงที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย และยังช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้ง เนื่องจากไปกระตุ้นการสร้างจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดให้สูงขึ้น

ตารางที่ 12 ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีน เป็นระยะเวลา 55 วัน

ชุดการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
อาหารปกติ-ออกซิเจนปกติ	25.00 ± 2.40^a
อาหารปกติ-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	19.74 ± 3.43^b
อาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีน-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	24.22 ± 2.91^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

THC ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

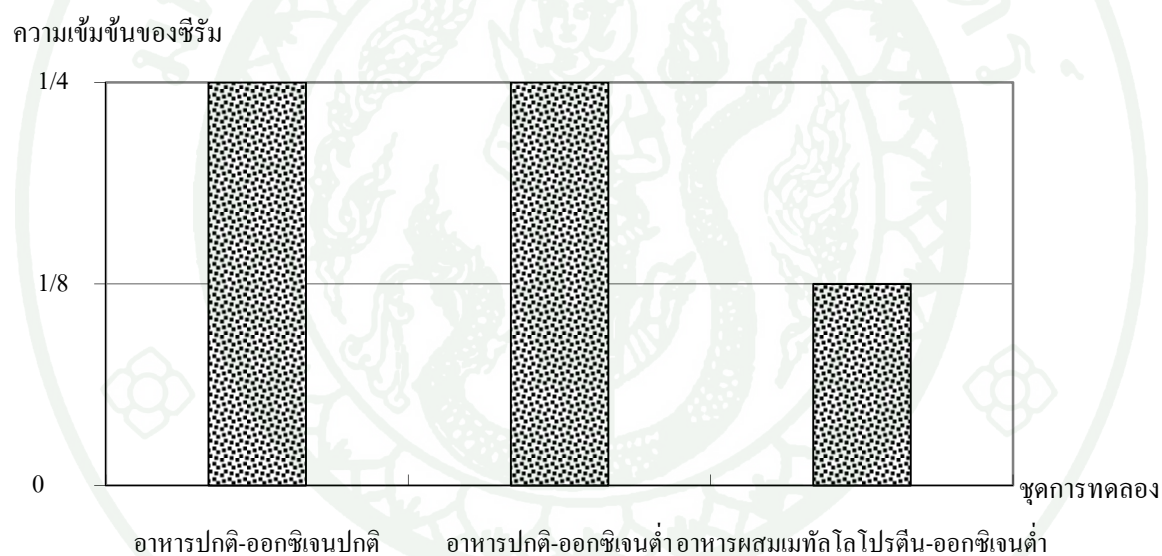
ภาพที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกึ่งขาวแวนนานาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 55 วัน

2) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่ง

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งขาวแวนนานาไม เมื่อทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนต่ำ มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1 : 8 แตกต่างจากชุดการทดลองที่ไม่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน ซึ่งเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนปกติและเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1 : 4 (ตารางที่ 13 และภาพที่ 15) เมื่อเลี้ยงกึ่งในสภาวะออกซิเจนต่ำ กึ่งที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน มีกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งสูงกว่ากึ่งที่ได้รับอาหารปกติและมีค่าสูงกว่ากึ่งที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนเพียงพอด้วย โดยกึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียด้วยโปรตีนที่พบในเม็ดเลือดได้ดีกว่า เนื่องจากสารเมทิลโลโปรตีนมีองค์ประกอบของแร่ธาตุทองแดง โดยกึ่งต้องใช้ทองแดงเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน เพื่อจับและลำเลียงออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เมื่อกึ่งรับทองแดงในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับออกซิเจนของฮีโมไซยานิน ทำให้กึ่งมีสุขภาพแข็งแรง มีผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้น เม็ดเลือดชนิด granular cell และ semi-granular cell จะบรรจุสารโปรตีนหรือเอนไซม์ซึ่งใช้ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค จะมีการหลั่งอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ของเซลล์เม็ดเลือดและมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อแบคทีเรีย

ตารางที่ 13 ความเข้มข้นของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของ กุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสม สารเมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 55 วัน

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้นของซีรัม
อาหารปกติ-ออกซิเจนปกติ	1:4
อาหารปกติ-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	1:4
อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	1:8



ภาพที่ 15 ความเข้มข้นของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ของ กุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสาร เมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 55 วัน

3) กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) ของเม็ดเลือดกึ่ง

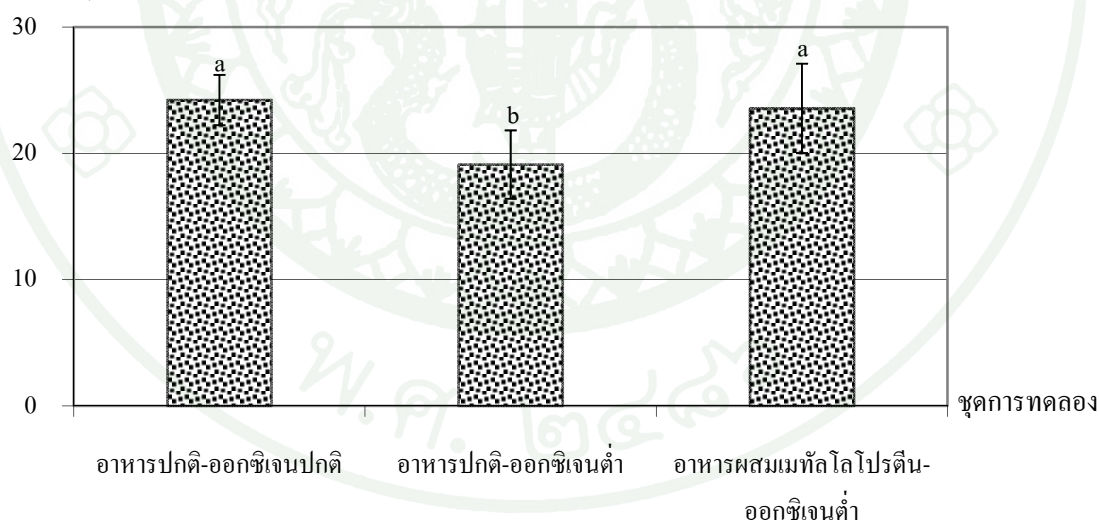
หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารปกติและอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีน ในสถานะที่กุ้งได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่ากุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารปกติในสถานะออกซิเจนปกติมีค่ากิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดสูงที่สุดเท่ากับ 24.22 ± 1.99 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีนในสถานะออกซิเจนต่ำซึ่งมีค่าเท่ากับ 23.56 ± 3.54 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ไม่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน และเลี้ยงในสถานะออกซิเจนต่ำซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.11 ± 2.71 (ตารางที่ 14, ภาพที่ 16) กุ้งที่อยู่ในสถานะออกซิเจนต่ำ แต่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน ปริมาณเม็ดเลือดรวมจะใกล้เคียงกับกุ้งที่เลี้ยงในสถานะที่มีออกซิเจนปกติ ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด สอดคล้องกับการศึกษา Cheng *et al.* (2002) พบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งที่ระดับออกซิเจนสูง (7.75 และ 4.75 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมภายหลังสิ้นสุดการทดลอง ที่ 72 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งที่ระดับออกซิเจนต่ำ (2.75 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในออกซิเจนสูง ภายหลังการทดลองที่ 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามสารเมทัลโลโปรตีนที่ผสมในอาหาร มีองค์ประกอบของแร่ธาตุทองแดง โดยกุ้งต้องใช้ทองแดงเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานินในการจับออกซิเจน ดังนั้นสารเมทัลโลโปรตีนที่กุ้งได้รับจะช่วยเสริมสร้างฮีโมไซยานิน สอดคล้องกับการศึกษาของ บุญรัตน์, 2553 พบว่า กุ้งที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน มีความเข้มข้นของออกซิฮีโมไซยานินสูงกว่าชุดควบคุม หลังจากเลี้ยงนาน 4, 8 และ 16 สัปดาห์ โดยสูงขึ้น 14.2 %, 23.2 % และ 56 % ตามลำดับ กุ้งสามารถดึงออกซิเจนจากน้ำและลำเลียงไปใช้ประโยชน์ในสถานะที่ออกซิเจนขาดแคลนในช่วงท้ายๆ ของการเลี้ยงได้ (บุญรัตน์, 2553)

ตารางที่ 14 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 55 วัน

ชุดการทดลอง	ร้อยละของเม็ดเลือดขาว ที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม
อาหารปกติ-ออกซิเจนปกติ	24.22 ± 1.99^a
อาหารปกติ-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	19.11 ± 2.71^b
อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	23.56 ± 3.54^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม
(เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 16 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนใน สภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกัน เป็นระยะเวลา 55 วัน

4) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารปกติและอาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีนในสภาวะออกซิเจนต่ำมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 296.58 ± 28.73 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับกุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติในสภาวะออกซิเจนปกติซึ่งมีค่าเท่ากับ 287.04 ± 12.40 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติในสภาวะออกซิเจนต่ำซึ่งมีค่าเพียง 265.48 ± 17.05 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 15, ภาพที่ 17) กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ และได้รับสารเมทิลโดโปรตีน จะมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ใกล้เคียงกับกลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนเพียงพอ โดยในสภาวะที่กุ้งได้รับออกซิเจนเพียงพอจะมีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ phenoloxidase เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng *et al.* (2002) พบว่า ในสภาวะออกซิเจนเพียงพอ กุ้งจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่ออกซิเจนลดต่ำลงที่ 4.75, 2.75 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase มีความสำคัญมากในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากเกี่ยวข้องกับระบบ phenoloxidase activating system เป็นการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้งโดยเอนไซม์ phenoloxidase (PO) ที่อยู่ในรูป pro-enzyme ที่เรียกว่า prophenoloxidase (proPO) และเอนไซม์กลุ่ม serine protease (Perrazzolo and Barracco, 1997) จะทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ โดยเริ่มจาก prophenoloxidase เปลี่ยนเป็น phenoloxidase จะไปออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนเป็นเมลานินในที่สุด หน้าที่ของเมลานินจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเติบโตของแบคทีเรีย โดยไปล้อมรอบอนุภาคของแบคทีเรียไม่ให้เจริญเติบโต สารประกอบสุดท้ายของกระบวนการนี้ได้สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substance) (Hose *et al.*, 1987) โดยเอนไซม์ prophenoloxidase อยู่ในกรานูลในไซโทพลาซึมของเม็ดเลือดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงในซีรัมของกุ้ง (Perrazzolo and Barracco, 1997)

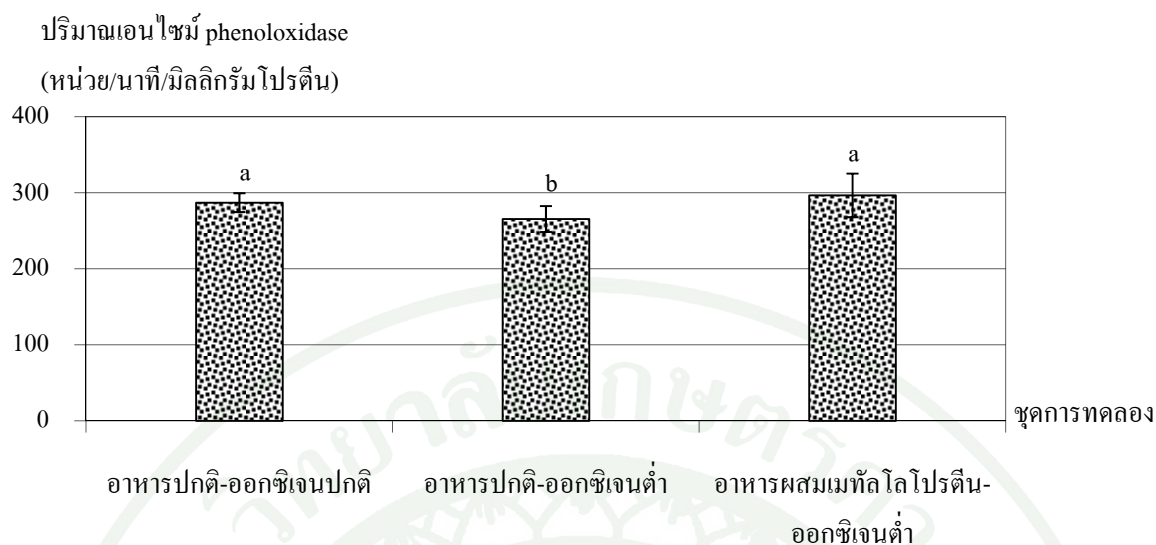
จากการศึกษาของ Söderhäll and Smith (1983 b) ได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean หลายชนิดโดยใช้สารละลาย Percoll 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase สูงถึง $1,249.51 \pm 313.36$ หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนใน hyaline cell มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase ค่อนข้างต่ำ คือ 198.95 ± 78.75 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีนแต่การทำงานของ hyaline cell มีหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกิน (Söderhäll and Smith, 1986)

Moullac *et al.* (1998) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ ProPO ในพวกครัสเตเชียนลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด คุณภาพน้ำก็มีผลเกี่ยวเนื่องด้วยเช่นกันเนื่องจากกุ้งขาวเป็นสัตว์เลือดเย็นดังนั้นคุณภาพน้ำมีผลกระทบต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกัน

ตารางที่ 15 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วัน

ชุดการทดลอง	Phenoloxidase activity (หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน)
อาหารปกติ-ออกซิเจนปกติ	287.04 ± 12.40^a
อาหารปกติ-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	265.48 ± 17.05^b
อาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีน-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	296.58 ± 28.73^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 17 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วัน

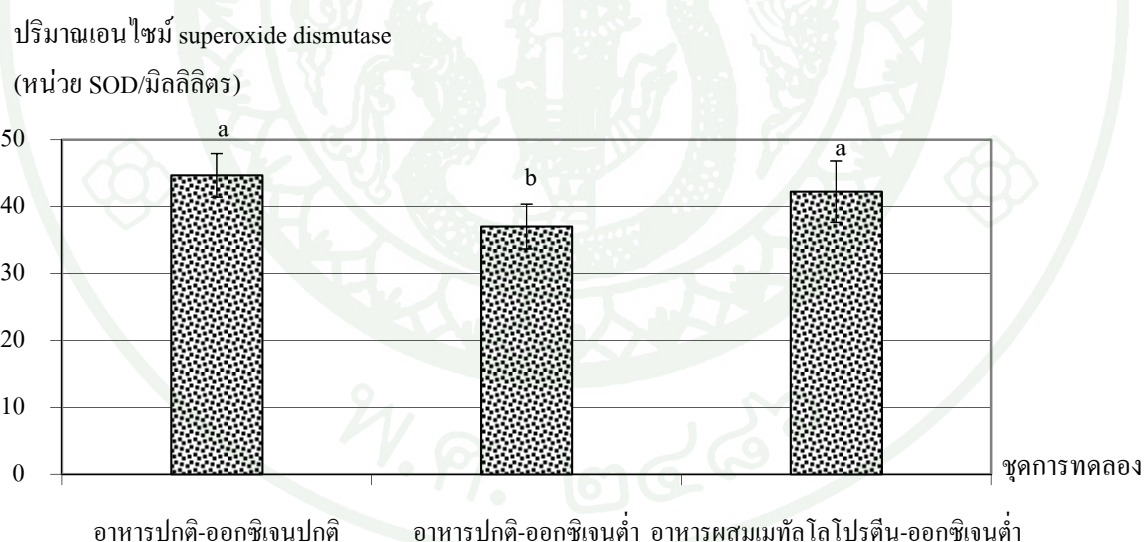
5) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารปกติและอาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วันพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนปกติ มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 44.68 ± 3.26 หน่วย SOD ต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโดโปรตีน และเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำซึ่งมีค่าเท่ากับ 42.25 ± 4.59 หน่วย SOD ต่อ มิลลิลิตร ($P > 0.05$) และปริมาณเอนไซม์ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนต่ำซึ่งมีค่าเท่ากับ 37.03 ± 3.35 หน่วย SOD ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 16, ภาพที่ 18) ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน superoxide anion ที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดไปเป็น hydrogen peroxide ซึ่งสามารถทำลายเชื้อโรคได้ กุ้งจะผลิตเอนไซม์นี้ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากกระบวนการที่ไม่พึงปรารถนา เช่น ความเครียด เชื้อโรคหรือสิ่งที่ทำให้เกิดโรค เอนไซม์ superoxide dismutase มีความสำคัญต่อกุ้ง จึงใช้เป็นเครื่องหมายในการประเมินถึงประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิด ดังนั้น superoxide dismutase จึงเป็นเอนไซม์หลักสำหรับกุ้ง

ตารางที่ 16 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วัน

ชุดการทดลอง	การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/ มิลลิลิตร)
อาหารปกติ-ออกซิเจนปกติ	44.68 ± 3.26^a
อาหารปกติ-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	37.03 ± 3.35^b
อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน-ออกซิเจน 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร	42.25 ± 4.59^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 18 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและชุดที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่างกันเป็นระยะเวลา 55 วัน

จากการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมพบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนปกติ จะมีระดับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ เนื่องจากปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญกับภูมิคุ้มกันกุ้ง สอดคล้องกับการทดลองของ Cheng *et al.* (2002) พบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ออกซิเจนปริมาณ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง กุ้งจะมีความไวต่อการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Enterococcus* sp. สูงกว่าปริมาณออกซิเจนที่ระดับ 2.75 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อกุ้งได้รับออกซิเจนที่ระดับดังกล่าว เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง กุ้งก้ามกรามจะมีปริมาณเม็ดเลือดรวม, เม็ดเลือดชนิด hyaline cell และกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ลดลง เมื่อเทียบกับปริมาณออกซิเจน 4.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อกุ้งในชุดการทดลองที่เลี้ยงในปริมาณออกซิเจนต่ำ ได้รับสารเมทัลโลโปรตีนจะพบว่ามีระบบภูมิคุ้มกันใกล้เคียงกับกุ้งขาวที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนปกติ เนื่องจากสารเมทัลโลโปรตีนที่ใช้ในการทดลองเป็นสารประกอบเมทัลโลโปรตีนในกลุ่มขนส่งออกซิเจน ประกอบด้วย โลหะทองแดง เมื่อกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำได้รับสารนี้ จะใช้เป็นแหล่งของแร่ทองแดงในโปรตีนที่พบในน้ำเลือดกุ้ง ทำหน้าที่ขนส่งและลำเลียงก๊าซออกซิเจน จากผลการศึกษา Lee and Shiau (2002) พบว่า เมื่อให้อาหารผสมทองแดงกับกุ้ง *Penaeus monodon* ที่ระดับ 10-30 มิลลิกรัมทองแดงต่ออาหาร 1 กิโลกรัมกุ้งจะมีน้ำหนักตัว, ประสิทธิภาพการกินอาหาร, ปริมาณเม็ดเลือดรวม และอัตราการผลิต superoxide anion ดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมทองแดงที่ระดับมากกว่า 40 มิลลิกรัมทองแดงต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสมทองแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการศึกษาการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 55 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 17 โดยทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์

ตารางที่ 17 คุณสมบัติของน้ำ ในห้องปฏิบัติการของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน ในระดับต่างกัน ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 55 วัน

คุณสมบัติของน้ำ	ชุดการทดลอง					
	อาหารปกติ, ออกซิเจนปกติ		เมทัลโลโปรตีน, ออกซิเจนต่ำ		อาหารปกติ, ออกซิเจนต่ำ	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิ						
(องศาเซลเซียส)						
เช้า	28.3-29.3	28.9±0.3 ^a	28.6-29.3	28.6±0.4 ^a	29.0-29.5	29.3±0.1 ^a
บ่าย	28.8-30.1	29.5±1.2 ^a	28.2-30.1	29.5±1.5 ^a	28.2-30.3	28.9±1.1 ^a
พีเอช						
เช้า	7.9-8.3	7.9±0.4 ^a	8.1-8.5	8.4±0.1 ^a	8.2-8.6	8.5±0.1 ^a
บ่าย	8.0-8.5	8.3±0.4 ^a	8.1-8.5	8.3±0.2 ^a	8.3-8.5	8.4±0.1 ^a
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)						
เช้า	6.2-7.8	6.9±0.5 ^a	3.0-3.9	3.5±1.0 ^b	3.2-4.1	3.6±0.8 ^b
บ่าย	5.9-7.8	6.8±1.0 ^a	3.4-4.2	3.8±0.4 ^b	3.5-4.1	3.7±0.3 ^b
ความเค็ม (พีพีที)						
การนำไฟฟ้า	25.2-25.9	25.5±0.4 ^a	25.3-25.9	25.5±0.1 ^a	24.9-25.4	25.2±0.5 ^a
(มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร)						
เช้า	42.0-47.4	42.6±1.0 ^a	39.4-40.0	39.8±0.4 ^a	39.1-40.2	39.8±0.5 ^a
ความเป็นด่างรวม						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	85.3-139.2	97.8±27.0 ^a	89.7-118.5	101.2±15.3 ^a	91.1-119.9	109.3±12.6 ^a
ความกระด้างรวม						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	4070.9-5850.3	5019.7±1467.3 ^a	4279.1-5473.0	4010±1098.7 ^a	4339.7-5601.4	5124.2±1002.6 ^a
แอมโมเนียรวม						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.2-0.8	0.5±0.1 ^a	0.1-0.6	0.6±0.1 ^a	0.3-0.6	0.4±0.1 ^a
ไนไตรท์						
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.02-0.04	0.02±0.007 ^a	0.02-0.03	0.02±0.009 ^a	0.01-0.03	0.02±0.01 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การทดลองให้อาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนแก่กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาเป็นเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่ากุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีอัตราการรอดตาย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่า กุ้งที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการทำลายแบคทีเรียและกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase มีสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. การทดลองพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนเป็นระยะเวลา 60 วัน มีอัตราการรอดตายหลังได้รับการฉีดเชื้อ *V. harveyi* สูงกว่าชุดควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ เพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. การทดลองให้อาหารปกติที่ระดับออกซิเจนปกติและกลุ่มที่ผสมสารเมทิลโลโปรตีนแก่กุ้งขาวแวนนาไม ในสภาวะที่ได้รับออกซิเจนที่ระดับต่ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่ากุ้งชุดควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยและอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งทุกชุดการทดลองแต่ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่ากุ้งชุดควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติและชุดที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนและเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน และเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำมีค่าดีที่สุด (1:8) ดังนั้น การเสริมสารเมทิลโล

โปรตีนในอาหารสำเร็จรูปปกติ สามารถช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำได้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการใช้สารเมทัลโลโปรตีน ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่อัตราการปล่อยลูกกุ้ง ในระดับความหนาแน่นต่างๆ กัน เพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางในการแนะนำการใช้สารเมทัลโลโปรตีนให้เหมาะสมกับสภาพการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ สุขุมาศัย, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543 ก.

ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและ

องค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว.สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

22 (ฉบับพิเศษ) : 567-580.

_____, จิราพร เรืองศรี, สุภฎา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 605-613.

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

_____, จิราพร เรืองศรี, สุภฎา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำบนพื้นฐานของเพศและวงจรการลอกคราบ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 623-632.

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

ชลอ ลีมสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000 คู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

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

ชลอ ลีมสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชเนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิม พระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิก พับลิเคชันจำกัด, กรุงเทพฯ.

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

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2553. ออกซิเจนขุมพลังของกุ้งขาวขุมทรัพย์ของผู้เลี้ยง. ภาควิชาวาริช ศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

ปิยบุษ พรมภมร. 2550. โรคสำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญา โท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พชรวดี เลาหะมงคลรักษ์. 2549. การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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

วัฒนา วัฒนกุล, อุไรวรรณ วัฒนกุล, จิโรจน์ พิระเกียรติขจร และ กิตติกร ชันแก้ว. 2549. การวิจัยเพื่อพัฒนาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบหนาแน่นสูงโดยใช้โปรไบโอติก ร่วมกับระบบการให้อากาศ. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏศรีวิชัย, ตรัง.

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

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

อชิป ลิขิตลิลิต. 2536. สารชีวโมเลกุล. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เล่ม 1. บริษัท พรประเสริฐพริ้นติ้ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

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

Anderson, I.G., M. N. Shamsudin and M. Shariff. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackish water ponds. **Asian Fish Sci.** 2: 93-108.

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

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

Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J.D. Lorgetil, J. Garnier and B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaei shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.** 198: 149-68.

- Bauchau, A.G. 1981. **Crustacean**, pp 385-420 *In* N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley, (eds.),
Invertebrate Blood Cell. Academic Press. London.
- Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured
*Penaeus vannamei***. Publ. By the Oceanic Institute, Makapu point, Honolulu, HI, USA.
- Burrell, V.G. Jr., J. Sample, C. Batey and M.Y. Bobo. 1991. Concentration of *Vibrio vulnificus*
in oysters, *Crassostrea virginica*, grown in ponds with Pacific white shrimp, *Penaeus
vannamei*. **Shellfish Res.** 10: 1-277.
- 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.
- Cheng, W., C. H. Liu, J. P. Hsu and J.C. Chen. 2002. Effect of hypoxia on the immune
response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to
pathogen *Enterococcus*. **Fish Shellfish Immunol.** 13: 351-365.
- Cheng, W., C. H. Liu and C. M. Kuo. 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph
parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man).
Aquaculture 220 : 843-856.
- Claybook, D.L. 1983. Nitrogen metabolism, pp. 163-213. *In* **The Biology of Crustacean** Vol
5 Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, New York.
- Cuellar, A.J., J.A. Brock, J.A. Suarez and L.F. Aranguren. 1998. **A Survey of the Pathogens
and Diseases in Penaeid Shrimp Farmed in Colombia**. World Aquacult. Soc., Baton
Rouge, Louisiana, USA.

- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics** 54: 442-445.
- Davis, D.A. and A.L. Lawrence. 1997. Mineral. **Crustacean Nutrition Advance in World Aquaculture** 6: 150-159.
- Dallinger, R. 1997. The flow of copper through a terrestrial food chain, III. Selection of an optimum copper diet by isopods. **Oecologia** 30: 273-277.
- 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.
- 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.
- Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4 – 19.
- FAO. 1994. **Aquaculture Production 1986-1992**. FAO Fisheries Circular 815 (Re v. 6). FAO, Rome.
- Freire Marques, M.R. and M.A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture** 191: 23–44.
- Gomez-Gil, B., M.A. Herrera-Vega, F.A. Abreu-Grobois and A. Roque. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemis Franciscans*). **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2318-2322.

- Hikima, S., J.I. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. **Gene**. 316: 187-195.
- Holthuis, L.B. 1980. **FAO Species Catalogue Vol. 1, Shrimps and Prawns of the World**. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Hose, J.E., G.E. Matin, V.A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.
- Hu, C. and B. Tao. 2000. Penaeid shrimp vibriosis and immune prevention: a review. **Tropic Oceanol; Redai Haiyang** 19: 84-94.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsushihira, 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 (Scizophellan), pp. 142-151. **In Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992**. The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.
- Jiravanichpaisan, P., B.L. Lee and K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunology** 211: 213-236.
- Jiang, L., L. Pan and F. Bo. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 18:185-188.
- Jiravanichpaisal, P. and T. Miyazaki. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infection black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Aquat. Anim. Health** 6: 27-35.

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.

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

Keyser, P. 1999. **Crustacean Immunity: Characterization of Some Crayfish Blood Proteins.** Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.

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

Klein, J. 1982. **Immunology: The Science of Self-nonsel Discrimination.** USA: A Wiley interscience publication.

Labric, L. 2001. **Effect of Methylparathion on the Susceptibility of Shrimp to Bacterial Challenge.** Toulouse France Ecole Natl. Veterinaire ENVT 2001. 101 p.

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

Lee, M.H. and S.Y. Shiau. 2002. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune response. **Fish Shellfish Immunol.** 13: 259-270.

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

- Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Liu, C.-H., W. Cheng, C. M. Kuo, J.-C. Chen. 2004. Molecular cloning and characterization of a cell adhesion molecule, Peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 13–26.
- Llobera, J.A. 1983. **Effect of hypoxia on feed digestibility in *Macrobrachium rosenbergii*** Ph.D. dissertation, Texas A&M University, College station, Texas, USA.
- 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.
- Mangum, C.P. 1989. Oxygen transport in the blood. pp. 373-430. *In* L.H. Mantel (Ed). **The biology of Crustacean. Internal Anatomy and Physiological Regulation vol.5**. Academic Press, New York.
- 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. Inver. Pathol.** 62: 308-315.
- McInotosh, A.R. 2000. Towards a network theory of cognition. **Neural Netw.** 13: 861-870
- Mikulski, C.M., L.E. Burnett and K.G. Burnett. 2000. The effects of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Shellfish Res.** 19: 301-311.

- Mohney, L.L., D.V. Lightner and T.A. Bell. 1994. **An Epizootic due to *Vibrio* spp. In Pond Reared *Penaeus vannamei* in Ecuador**, p. 45. Book of Abstracts, World Aquaculture Meeting. Puerto Rico.
- Moullac, G.L., C. Soyeux, D. Saulnier, D. Ansquer, J. Avarre and P. Levy. 1998. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish Shellfish Immunol.** 8: 621 - 629.
- Moss, S.M., B.R. LeaMaster and J.N. Sweeney. 2000. Relation abundance and species composition of gram negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. **J. World Aquac. Soc.** 31: 255-263.
- Nash, G., C. Nithimathachoke, C. Tungmandi, A. Arkarjamom, P. Prathanpipat and P. Ruamthveesub. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand, pp. 143-155. In M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur, eds. **Proceedings First Symposium on Disease in Asian Aquaculture**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Ocampo, L., H. Villarreal, M. Vagas, G. Portillo and F. Magallon. 2000. Effect of dissolved oxygen and temperature on growth, survival and composition of juvenile *Farfantepenaeus californiensis*. **Aquaculture Res.** 31:167-171
- O'Dell, B.L. 1976. Biochemistry of copper. Symposium on trace elements. **Medical Clinicals of North America** 60: 697-703.
- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxiase activating system of the shrimp *penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.

- Pouliot, T. and J de la Noue. 1989. Feed intake, digestibility and brain neurotransmitters of rainbow trout under hypoxia. **Aquaculture** 79: 317-327.
- 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.
- Robertson, P. A. W., J. Calderon, L. Carrera, J. R. Stark, M. Zherdmant and B. Austin. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infection in *Penaeus vannamei* larvae. **Dis. Aquat. Org.** 32: 151-155.
- Rosenberry, R. 1993. **World Shrimp Farming 1993**. Aquaculture Digest, December 1993.
- Schnapp, D., G.D. Kemp and V.J. Smith. 1996. Purification and characterization of a prolinerich antibacterial peptide, with Sequence similarity to batenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 240: 532-539.
- Seidman, E.R. and A.L. Lawrence. 1985. Growth feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. **J. World Mar. 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.
- Sindermann, C.J. 1990. Bacteria. **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish** 2: 41-74.
- 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.

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

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

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

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

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

_____, L. Cerenius and M.W. Johansson. 1996. **The Prophenoloxidase Activating System in Invertebrates.** pp. 229-253. *In* New directions in invertebrate immunology. SOS publications, Fair Harven.

Song, Y.L. and Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 201-209.

- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23(3): 179 - 186.
- Sung, H.H. and Y.L. Song. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 145: 41-45.
- Sung, H.H., Y.L. Yung and Y.L. Song. 1996. Enhancement of microcidal activity in the black tiger shrimp prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16(2): 278-284.
- Takahashi, Y., Y. Shimoyama and K. Momoyama. 1985. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio* sp. isolated from diseased postlarvae of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 51: 721-730.
- Truchot, J.P. 1973. Fixation et transport de l'oxygène par le sang de *Carcinus maenas*: variation en rapport avec diverses conditions de température et de salinité. **NETH. J. Sea Res.** 7: 482-495.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.
- Vasta, G. R., H. Ahmed, N.E. Fink, M.T. Elola, A.G. Marsh, A. Snowden and E. W. Odom. 1994. Animal lectin as self/non-self recognition molecules. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 715: 55-73.



ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

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

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน	50 มิลลิลิตร
Salt mixture	10 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10 มิลลิลิตร
CaCl ₂ . 2H ₂ O	10 มิลลิลิตร
L-glutamine	1 มิลลิลิตร
Hepes	0.238 กรัม
L-cystein	5 กรัม
De-ionized water ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายสาร (ทุกตัวที่ใช้เตรียมสารเคมี)	

วิธีการเตรียมสารเคมีแต่ละตัว คือ

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

1.2 Salt mixture ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4 กรัม
MgCl . 6 H ₂ O	3.3 กรัม
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3.0 กรัม
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	0.05 กรัม
ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้ 100 มิลลิลิตร	

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 11 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

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

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

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

L-glutamine 0.015 กรัม ผสมกับน้ำ De-ionized water 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 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 ผสมกัน ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ De-ionized water ปรับพีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้พีเอชอยู่ในช่วง 7.3-7.6 กรองด้วยหัวกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใน Laminar flow

2. Shrimp saline

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

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

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker's yeast

0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์

shrimp saline

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

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

KH_2PO_4

1.3609 กรัม

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

5. การเตรียมสารในชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD® Superoxide dismutase

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

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

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

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาวปณิดา ประถมยา
เกิดวันที่	14 กรกฎาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอพญาไท จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-