ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ — **สาขา**

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ — **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของเบทาอีนต่อสมดุลออสโมซิส องค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) จากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

The Effect of Betaine on Osmoregulation, Blood Components and Immune System of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius) in a Environmental Change

นามผู้วิจัย นายสุทิน สมบูรณ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, Doctorat de 3 cycle)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์อรพินท์ จินตสถาพร, วท.ด.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ส่งศรี มหาสวัสดิ์, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของเบทาอีนต่อสมดุลออสโมซิส องค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) จากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

The Effect of Betaine on Osmoregulation, Blood Components and Immune System of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon,* Fabricius) in a Environmental Change

โดย

นายสุทิน สมบูรณ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2552

สุทิน สมบูรณ์ 2552: ผลของเบทาอีนต่อสมดุลออสโมซิส องค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) จากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, Doctorat de 3 cycle. 98 หน้า

การศึกษาผลของการเสริมเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำต่อสมดุลออสโมซีส องค์ประกอบของเลือด และระบบภูมิคุ้มกัน ทดลองในกุ้งกุลาดำขนาด 4 กรัม เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนในระดับ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ อาหารทดลองมีโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานที่ย่อยได้ 2,500 กิโลแคลอรี่ต่อกิโลกรัม ระยะเวลา 3 เดือน ผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตโดยน้ำหนักและอัตรารอดสูงกว่าอาหารไม่เสริมเบทาอีน ($p<0.05$)แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและอัตราแลกเนื้อ การเสริมเบทาอีนในอาหารไม่มีผลต่อการควบคุมระดับออสโมลาริตี้ ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือด (โซเดียม โปแตสเซียม และคลอไรด์) ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือด แต่อาหารเสริมเบทาอีน 1-2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าของการทำงานระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ได้แก่ ปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมด การจับกินสิ่งแปลกปลอม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส สูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมเบทาอีน ($p<0.05$)

การทดสอบความทนทานของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำจากปกติ (20 ppt) เป็นน้ำความเค็มสูง (40 ppt) และค่า pH จากปกติ (7.5-8.0) เป็น 5.5 พบว่า กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวในน้ำได้ดีมีอัตรารอดสูง หลังการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำพบว่ากุ้งกุลาดำสามารถควบคุมระดับออสโมลาริตี้ อิออนต่างๆในน้ำเลือดของกุ้งเพิ่มขึ้นตามความเค็มของน้ำ แต่ปริมาณโปรตีน น้ำตาลกลูโคส และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ลดลงน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมเบทาอีน การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ต่อการควบคุมระดับออสโมซีสและระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งพบว่ามีค่าคงที่ไม่ต่างจากสภาพปกติ ส่วนความทนทานจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นในน้ำจืดทันที พบว่ากุ้งกุลาดำจะแสดงอาการอ่อนแอ มีอัตราการตายสะสมสูง และตายหมดภายในชั่วโมง 12 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเสริมสารเบทาอีน1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารกุ้งกุลาดำ เพียงพอต่อความต้องการต่อการเจริญเติบโต การรักษาสมดุลระดับออสโมลาริตี้ ความเข้มข้นของอิออนต่างๆในน้ำเลือด ตลอดจนองค์ประกอบทางเคมี และควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำต่อเปลี่ยน แปลงสภาพแวดล้อม

_____ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Suthin Somboon 2009: The Effect of Betaine on Osmoregulation, Blood Components and Immune System of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius) in a Environmental Change. Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture.Thesis Advisor: Associate Professor Prathak Tabthipwon, Doctorat de 3 cycle. 98 pages.

Osmoregulation, blood components and immune system of isonitrogenous diets (38% crude protein 6% lipid and digestibility energy of 2,500 kcal/kg.). containing 1% and 2% of betaine were determined for juvenile *Penaeus monodon* (average weight 4.0 g). After 3 mounths feeding trial, the weight gain and rate of survival significantly increased with the betaine supplementation up to 1 ans 2% of diet. ($p<0.05$). Protein efficiency ratio and feed convertion ratio would not be effected with betaine supplemented into the diet. The blood osmolality control, content of blood electrolyte ions (sodium, potassium and chloride), serum protein and blood glucose had no significant difference among treatment. The total haemocyte count and immune system based on phagocytic activity and phenoloxidase activity in shrimp fed with 1 and 2 % betaine in diet were higher than control group ($p<0.05$).

The salinity tolerance test of shrimp fed with 1 and 2% betaine in diets was study under 20 ppt for normal condition to condition at higher salinity (40 ppt) and pH change from 7.5-8.0 to 5.5. The results indicated that shrimp could adapt well under experimental condition and betaine had no effect on survival of all group whereas the osmolarity and blood electrolyte in shrimp fed with betaine at 1 and 2 % were lower than control group. The immune system in all shrimp groups were decrease but there were not significantly different among groups ($p>0.05$). The salinity tolerance test water at 0 ppt salinity suddently changed were found highest mortality rate all shrimp group, shrimp were death within 12 hours. The results showed that diet supplemented with betaine at 1% was suitable for growth performance, osmosis balance, blood chemistry and immune system of shrimp in variable environment.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. อรพินท์ จินตสถาพร รองศาสตราจารย์ส่งศรี มหาสวัสดิ์ กรรมการที่ปรึกษาเป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และให้การสนับสนุนในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์กาญจนา พัฒธนานุรักษ์ ผู้แทนบัณฑิตที่กรุณาให้คำแนะนำและร่วมแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้จัดการบริษัทเกษตรสมบูรณ์ ฟาร์ม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กุ้งกุลาดำสำหรับใช้ทดลอง รองศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน อาจารย์ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศรียะภูมิ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ ห้องปฏิบัติการและสอนวิธีวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันกุ้ง คุณศิลป์ชัย มณีขัติ ที่กรุณาสอนการใช้เครื่องมือวัดออสโมซิส และเครื่องวัดปริมาณอิออนในเลือดกุ้ง

ขอขอบคุณบัณฑิต ยวงสร้อย คุณรุ่งกานต์ กล้าหาร คุณสุธาจรี เย็นมาก คุณปุญมณี กาญจนวรกุล คุณฉัทชนัน ศิริไพศาส คุณนิตยา ยิ้มเจริญ และคุณเกษฎา มณีรอด ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง วิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน เก็บข้อมูลการทดลองและเป็นกำลังใจในการทำงานด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่น้องที่เป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดมา ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วิทย์ ธารชลานุกิจ คุณระพร สุขสมยา และคุณวิชิต เสมาชัย ที่เข้าใจการดำเนินชีวิตของข้าพเจ้า ให้กำลังใจเป็นแรงผลักดัน และสละเวลาปฏิบัติราชการแทนขณะที่ข้าพเจ้าเข้าศึกษาต่อทุกระดับชั้นมาโดยตลอด

สุทิน สมบูรณ์

กันยายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	38
ผลการทดลอง	38
วิจารณ์ผลการทดลอง	63
สรุปและข้อเสนอแนะ	73
สรุป	73
ข้อเสนอแนะ	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	75
ภาคผนวก	89
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	98

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณผลผลิตและมูลค่ากุ้งทะเลทั้งหมดรวมการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง	5
2	ชนิดและปริมาณของวิตามินที่เสริมในอาหารสำเร็จรูปกุ้ง และความต้องการวิตามินในอาหารกุ้งกุลาดำ	11
3	ความต้องการแร่ธาตุในอาหารกุ้งทะเลสกุล *Penaeus*	12
4	สูตรอาหารกุ้งกุลาดำที่เสริมเบทาอีนระดับต่างๆ และผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหาร	29
5	การเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน	39
6	ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กันของกุ้งกุลาดำ	40
7	ออสโมลาริตี้(osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด(eletrolyte) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน	42
8	องค์ประกอบทางเคมีของเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน	43
9	ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count) การจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน	45
10	อัตราการตายสะสม (%) ของกุ้งกุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม 40 และ 0 ppt	47
11	ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (Eletrolyte)ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (40 ppt)	49
12	องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (40 ppt)	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (Eletrolyte)ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (0 ppt)	54
14	องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (0 ppt)	56
15	อัตราการตายสะสม (%) ของกุ้งกุลาดำจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (5.5)	57
16	ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (Eletrolyte) ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (5.5)	59
17	องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (5.5)	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของเบทาอีน	21
2	วัฏจักรของโฮโมซีสทีนที่มีเบทาอีนเกี่ยวข้อง	22
3	ความสัมพันธ์ของเมตาบอลิซึมระหว่างโคลีน เบทาอีน และเมทไธโอนีน	25

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
^{0}C	=	องศาเซลเซียส
ppt	=	ส่วนในพันส่วน
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน
%	=	เปอร์เซ็นต์
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มก.%	=	มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์
มก./มล.	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
มก./ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มก./ก.	=	มิลลิกรัมต่อกรัม
ก/กก.	=	กรัมต่อกิโลกรัม
kcal/100g	=	กิโลแคลอรี่ต่อ 100 กรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
m. mole/l	=	milli mole per liter
m. Osmole/kg H_2O	=	milli Osmole per H_2O kilogram
unit/min/mg protein	=	หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ผลของเบทาอีนต่อสมดุลออสโมซิส องค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) จากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

The Effect of Betaine on Osmoregulation, Blood Components and Immune System of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius) in a Environmental Change

คำนำ

กุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon,* Fabricius) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่เลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาได้ขยายตัวกว้างทั้งในพื้นที่ชายฝั่งทะเลและเขตน้ำจืดทางภาคกลาง เนื่องจากกุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้เร็ว มีความทนความเค็มในช่วงกว้าง (euryhaline species) ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 10-20 ส่วนในพันส่วน และทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงระหว่าง 12-37.5 องศาเซลเซียส การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยส่วนใหญ่เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดตามชายฝั่งทะเลและพื้นที่เขตน้ำจืดบางส่วน

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของไทยได้ขยายตัวอย่างรวดเร็ว การพัฒนาดังกล่าวทำให้มีการแข่งขันในตลาดโลกทางด้านการค้ามากยิ่งขึ้น จึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนารูปแบบการเลี้ยงและการจัดการการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ทั้งทางด้านการจัดการคุณภาพน้ำ การผลิตด้านอาหาร การปรับปรุงพันธุ์ และระบบการเลี้ยงเพื่อลดความเสี่ยงจากการระบาดของโรค ปัจจุบันอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่สำคัญได้แก่ ปัญหาการจัดการคุณภาพน้ำและการเกิดโรคติดเชื้อ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำ ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งให้มีสุขภาพแข็งแรงสามารถต้านทานโรคได้ดี การจัดการด้านอาหารจึงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่ง การเลือกอาหารที่มีโภชนะครบถ้วนตามความต้องการของสัตว์น้ำแต่ละชนิด มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโต การเลือกวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพดีมีคุณสมบัติส่งเสริมให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่ดี มีสุขภาพแข็งแรงต้านทานโรคได้ดีจึงเป็นสิ่งจำเป็น การเสริมสารอาหารบางชนิดในอาหารกุ้ง มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโต การกินอาหาร การดูดซึมและใช้ประโยชน์จากอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้กุ้งแข็งแรงมีความต้านทานโรคสูง

เบทาอีน หรือ ไตรเมธิลไกลซีน (trimethylglycine) เป็นสารประกอบของหมู่เมธิลรวมกับกรดอะมิโนไกลซีน (amino acid glycine) มีความจำเป็นในปฏิกิริยาชีวเคมีของเมไธโอนีน (methionine) และโฮโมซีสทีน (homocysteine) เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้หมู่เมธิล (CH_3) (methyl donor) มีผลในการลดระดับ โฮโมซีสทีน (homocysteine) ในพลาสมา และช่วยการทำงานของตับที่เกี่ยวข้องกับไขมันให้ดีขึ้น ช่วยรักษาความสมดุลภายในเซลล์ (osmoprotectant) ป้องกันโปรตีนถูกทำลาย (Jacop, *et al.*, 1998) และทนความร้อนในขบวนการผลิตอาหารได้สูง (Schwahn, *et al*., 2003) จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีแนวคิดที่จะทำการศึกษาทดลองบทบาทของเบทาอีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การควบคุมความสมดุลออสโมลาริตี้ ปริมาณของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือด และระบบภูมิคุ้มกัน ให้สัมพันธ์กับกลไกลการควบคุมการเข้าออกของน้ำและอิออน (osmoregulation) ของกุ้งกุลาดำ เพื่อให้เกิดการผันแปรของสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย และผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อระบบภูมิคุ้มกัน องค์ประกอบทางเคมีในเลือดกุ้งกุลาดำหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีเบทาอินเป็นส่วนผสมในระดับต่างๆ กัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพอาหารของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีเบทาอีนผสมในระดับต่างๆ กัน

2. เพื่อศึกษาผลของเบทาอีนในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบในเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

3. เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมต่อการรักษาสมดุลออสโมซีสองค์ประกอบเลือด และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งกุลาดำ

1.1 อนุกรมวิธาน

กุ้งกลาดำมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น กุ้งกุลา กุ้งกะลา กุ้งเสือดำ กุ้งเสือ และกุ้งลาย ชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon* (Fabricius) และชื่อสามัญ Giant tiger prawn หรือ Black tiger shrimp การจัดอันดับอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Order Decapoda
Family Penaeidae
Genus *Penaeus*
Species *monodon* (Fabricius) (ประจวบ, 2527)

การเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive culture) บริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและภาคใต้ ผลตอบแทนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสูงกว่าการเลี้ยงสัตว์น้ำอื่นๆ ทำให้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงเพิ่มขึ้น ในปี 2536-2543 จำนวนฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขยายพื้นที่ไม่จำกัดเฉพาะชายฝั่งทะเล มีการขยายพื้นที่ไปในภาคกลางบางส่วน เช่น สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี ปราจีนบุรี เป็นต้น ซึ่งเป็นการเลี้ยงกุ้งระบบความเค็มต่ำ เนื่องจากเป็นธุรกิจที่สำคัญซึ่งให้ผลตอบแทนสูง และสามารถนำเงินตราเข้าประเทศมูลค่ามหาศาลในแต่ละปี เกษตรกรได้มีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยอาศัยเทคโนโลยีใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้น การขยายตัวการเลี้ยงกุ้งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรม ประกอบกับการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาจะมีการปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในอัตราที่หนาแน่นมาก ซึ่งเมื่อขาดการจัดการที่ดีจะทำให้กุ้งอ่อนแอ ก่อให้เกิดปัญหาการระบาดโรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสและเบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* spp.) (พรเลิศ และ คณะ, 2541ข) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมากและทวีความรุนแรงมากขึ้น ทำให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำลดต่ำลง

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง (2551) รายงานผลการสำรวจผลผลิตกุ้งทะเล พบว่าปริมาณสัตว์น้ำเค็มทั้งหมดซึ่งรวมการเพาะเลี้ยงชายฝั่งปี 2545-2549 (ตารางที่ 1) ว่าปี 2545 มีผลผลิตกุ้งกุลาดำสูงถึง 262,400 ตัน คิดเป็นมูลค่า 52,779.6 ล้านบาท ผลผลิตกุ้งกุลาดำลดลงทุกๆ ปี ในปี 2549 มีผลผลิตกุ้งกุลาดำเหลือเพียง 17,400 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,769.8 ล้านบาท สาเหตุที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำลดลงในปัจจุบันเนื่องจากการระบาดของโรค กุ้งมีขนาดเล็กและราคาตกต่ำ เกษตรกรจึงหันไปเลี้ยงกุ้งขาววานาไม (*Litoenaeus vannamei*) เพิ่มขึ้น จากสถิติผลผลิตของกุ้งขาววานาไมเริ่มมีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยปี 2546 มีผลผลิตที่จับได้ 132,400 ตัน มูลค่า 13,309 ล้านบาท ผลผลิตกุ้งชนิดนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทุกปี ในปี 2549 มีผลผลิต 480,000 ตัน มูลค่า 48,962.6 ล้านบาท มากกว่ากุ้งกุลาดำหลายเท่า จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำลดลงเกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งขาววานาไมแทนในปัจจุบัน

ตารางที่ 1 ปริมาณผลผลิตและมูลค่ากุ้งทะเลทั้งหมดรวมการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง

ชนิดสัตว์น้ำ		ปี พ.ศ.				
		2545	2546	2547	2548	2549
กุ้งกุลาดำ	(พันตัน)	262.4	197.8	109.1	29.2	17.4
	(ล้านบาท)	52,779.6	30,689.2	15,840.7	4,982.0	2,769.0
กุ้งขาววานาไม	(พันตัน)	-	132.4	251.7	374.5	480.0
	(ล้านบาท)	-	13,309.0	29,384.3	41,844.7	48,962.6

ที่มา: กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง (2551)

1.2 ลักษณะทั่วไป

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ บังอร (2530) กล่าวว่ากุ้งกุลาดำลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มหรือสีเทาทำให้เห็นเป็นปล้องชัดเจน แต่ละปล้องจะมีรยางค์หนึ่งคู่ ลำตัวแบ่งออกเป็นสามส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนหาง โดยส่วนหัวมีเปลือกคลุม (carapace) ใช้ห่อหุ้มลำตัวส่วนหน้า มีปล้องห้าปล้อง ปล้องที่หนึ่งจะอยู่หน้าสุดเป็นฟันแหลมยื่นออกเรียกว่ากรี (rostrum) ขอบด้านบนมีฟัน 7 ถึง 8 ซี่ ขอบด้านล่างมีฟัน 3 ซี่ ใต้กรีมีตาหนึ่งคู่ ส่วนหัวมีรยางค์ห้าคู่ ได้แก่ หนวดใช้ในการสัมผัส ขากรรไกร มีหน้าที่ในการบดเคี้ยวอาหาร ส่วนอกรยางค์สามคู่แรกเรียกว่า maxillipeds ใช้ในการ

กินอาหาร มีลักษณะเป็นก้าม (chelate) ใช้ในการจับอาหารและป้องกันตัว มีขาเดิน 5 คู่ ใช้สำหรับเดินเคลื่อนไหวและทำความสะอาด ลำตัวมีปล้องหกปล้อง เปลือกของปล้องท้องที่สองซ้อนทับกันปล้องแรก ส่วนหางประกอบด้วยรยางค์ว่ายน้ำจำนวน 6 คู่ โดยคู่สุดท้าย สภาพไปเป็นแผ่นแบบบาง ทำหน้าที่เป็นแพนหางคล้ายใบพาย สำหรับโบกให้กุ้งเคลื่อนที่เปลี่ยนไปตามทิศทางที่ต้องการ ความแตกต่างระหว่างเพศของกุ้งกุลาดำสามารถสังเกตได้จากขาว่ายน้ำโดยเฉพาะขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 และ 2 ในกุ้งเพศผู้ซึ่งทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ ขาว่ายน้ำคู่แรกด้านในจะแตกแขนงออกติดขาทั้งสองข้างเป็นแผ่นเนื้อเยื่อบางๆ พับซ้อนกันหลายชั้นติดโคนขาด้านในส่วนปลายงอ อวัยวะเพศนี้เรียกว่า พีแตสมา (petasma) ส่วนในเพศเมียจะมีขนาดเล็กหรืออาจจะขาดหายไป (ประจวบ, 2527)

1.3 ถิ่นที่อยู่อาศัยและการดำรงชีวิต

กุ้งกุลาดำพบได้ทั่วไปตามแนวชายฝั่งทะเลของประเทศไทย มาเลเซีย สิงค์โปร์ ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อินเดีย ออสเตรเลีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น ในประเทศไทยพบในทะเลฝั่งอ่าวไทย เช่น จันทบุรี ตราด ระยอง สุราษฎร์ธานี ปัตตานี สงขลา และชายฝั่งทะเลอันดามัน เช่น สตูล ภูเก็ต ระนอง พังงา เป็นต้น กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ช่วงอายุของกุ้งกุลาดำพบว่าเพศเมียมีอายุประมาณ 2 ปี และเพศผู้ประมาณ 1 ปีครึ่ง (นิเวศ, 2529) สามารถเลี้ยงในน้ำกร่อยแถบป่าชายเลนได้ดี หรือแม้กระทั่งปรับสภาพการเลี้ยงเป็นน้ำจืดหรือความเค็มต่ำในระบบปิดการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในน้ำเค็มปกติ (รุจิเรข, 2546; วราห์ และคณะ, 2547) Borja and Rasalan (1968) รายงานว่ากุ้งกุลาดำมักอาศัยในบริเวณน้ำกร่อยที่มีลักษณะพื้นดินเป็นทรายปนเลน โคลนทราย โดยสามารถปรับตัวอาศัยได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง และความเค็มแตกต่างกัน (euryhaline) ที่ระดับความลึก 0 – 110 เมตร จากบริเวณชายฝั่งปากแม่น้ำถึงทะเลลึก ส่วนลูกกุ้งวัยอ่อน (Naupius) หลังฟักเป็นตัวมักอาศัยตามบริเวณชายฝั่งและปากแม่น้ำ เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยจนเป็นกุ้งวัยรุ่น (juvenile) จะอพยพสู่ทะเลลึก พร้อมกับการเจริญเติบโตเป็นกุ้งวัยเจริญพันธุ์และผสมพันธุ์วางไข่ต่อไป

1.4 ความต้องการสารอาหารของกุ้งกุลาดำ

การผลิตอาหารสัตว์น้ำจำเป็นต้องคำนึงถึงความต้องการสารอาหารของสัตว์น้ำแต่ละชนิด เพื่อให้ได้อาหารที่มีความสมดุล มีสารอาหารครบถ้วนตามความต้องการของสัตว์น้ำ องค์ประกอบที่สำคัญในอาหารปลาและกุ้ง ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน

และแร่ธาตุ มีความสำคัญเมื่อสัตว์น้ำกินแล้วเกิดประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยสร้างเสริมและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ให้พลังงานและช่วยควบคุมให้การทำงานของกระบวนการต่างๆ ในร่างกายให้ดำเนินตามหน้าที่ ส่งผลให้สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิต มีการเจริญเติบโตอย่างปกติ (เวียง, 2542) อาหารที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานโรค องค์ประกอบที่สำคัญของอาหารคือ วัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารกุ้ง ชนิดและวิธีการให้อาหารเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้เลี้ยงกุ้งต้องคำนึงถึง (เปี่ยมศักดิ์, 2534) ดังนั้นการผลิตอาหารกุ้งกุลาดำผู้ผลิตควรคำนึงถึงความต้องการสารอาหารต่างๆ ที่สำคัญในอาหารได้แก่

1.4.1 โปรตีนและกรดอะมิโน (Proteins and Amino acids)

โปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต เมื่อสัตว์กินเข้าไปโปรตีนจะถูกย่อยให้เป็นกรดอะมิโน แล้วซึมผ่านผนังลำไส้เล็กสู่ส่วนต่างๆ ในร่างกาย ทำให้ร่างกายมีการเจริญเติบโต ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกายและเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ แหล่งของโปรตีนที่สำคัญในอาหารได้แก่ ปลาป่น ตับหมึกป่น กุ้งป่น และกากถั่วเหลือง กุ้งกุลาดำมีความต้องการโปรตีนแตกต่างกัน ไปตามขนาด วัยของกุ้ง คุณภาพของโปรตีนและสมดุลของกรดอะมิโนในอาหาร (มะลิ, 2531; เปี่ยมศักดิ์, 2534; Goddard, 1996) กุ้งกุลาดำมีความต้องการโปรตีนในอาหารไม่น้อยกว่า 40-45 % ในกุ้งวัยรุ่น (juvenile) (Alava and Lim, 1983; Bautista, 1986; Shiau, 1998); และ 44 % สำหรับกุ้งที่เลี้ยงในน้ำกร่อย (16 ppt) (Shiau *et al*., 1991) กุ้งวัยรุ่นถึงกุ้งใหญ่ต้องการโปรตีน 36 – 40 % ดังนั้นการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงแบบพัฒนาต้องมีโปรตีน 35 % หรือมากกว่า ส่วนการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา (semi- intensive culture) ควรมีโปรตีนระหว่าง 25-35 % (เปี่ยมศักดิ์, 2534; Goddard, 1996; Shiau, 1998; Cahu, 2001)

โปรตีนในอาหารประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่จำเป็นที่สัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ได้จึงต้องได้จากอาหารเท่านั้น Shiau, (1998) อ้างถึง Liou and Yang (1994) ว่า กุ้งกุลาดำวัยรุ่นต้องการกรดอะมิโม menthionin (+cystine) 1.4 กรัมต่อ 100 กรัมอาหาร หรือ 4 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน (Chen *et al.*, 1992)รายงานว่า ปริมาณ L-arginine ในอาหารที่เหมาะสมคือ 2.5 กรัมต่อ 100 กรัมอาหาร (5.5 กรัม ต่อ 100 กรัมโปรตีน) ระดับที่เหมาะสมของ valine ในอาหาร 3.75 กรัมต่อ 100 กรัมโปรตีน (Millamena *et al,* 1996) การคำนวณสูตรอาหารกุ้งกุลาดำจำเป็นต้องพิจารณาอัตราส่วนกรดอะมิโนจำเป็นที่พบในกล้ามเนื้อของกุ้งเป็นหลัก โดยเฉพาะปฏิกิริยาการต่อต้านระหว่างกรดอะมิโนบางตัว เช่น lysine กับ arginine ถ้ามีตัวใด

มากกว่าตัวหนึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อต้านกันมีทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าลง อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:1 (เปี่ยมศักดิ์, 2534)

1.4.2 ไขมัน (Lipid)

ไขมันในอาหารสัตว์น้ำเป็นแหล่งของพลังงาน กรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acids) ฟอสโฟลิปิด (phospolipids) ไกลโคลิปิด (glycolipids) สเตอรอยด์ (steroids) วิตามินที่ละลายในไขมันและสารสี ไขมันยังเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และฮอร์โมน ช่วยในการดูดซึมสารอาหารโดยเฉพาะวิตามินและสเตอรอยด์(steroids) (เวียง, 2542) ดังนั้นจึงเป็นสารอาหารที่จำเป็นและปริมาณที่สัตว์น้ำได้รับต้องเพียงพอต่อความต้องการ เปี่ยมศักดิ์ (2534) กล่าวว่า อาหารสำเร็จรูปควรมีไขมัน 8 % สำหรับกุ้งวัยอ่อน และกุ้งวัยรุ่นถึงโตเต็มวัยต้องการ 6 % และไขมันในอาหารกุ้งไม่ควรเกิน 10 % เพราะจะเป็นไขมันสะสมตามร่างกายโดยเฉพาะในตับซึ่งจะทำให้มีผลต่อการทำงานไม่สะดวกและก่อให้เกิดโรคแก่กุ้งได้ เช่นเดียวกับ Akiyama and Dominy, 1989) แนะนำว่าการผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งทะเลระดับไขมันในอาหารที่เหมาะสม 6 7.5 % และไม่เกิน 10 % Cahu (2001); Lovell (2002) รายงานว่า อาหารกุ้งกุลาดำควรมีไขมัน 4-10 %

กรดไขมันที่จำเป็นสำหรับกุ้งได้แก่ linoleic (18:2n6), linolenic (18:3n3), ecosapentaenoic : EPA (20:5n3) และ decosahexaenoic : DHA (22:6n3) (เปี่ยมศักดิ์, 2534; สุพิศ, 2535) ระดับของกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับกุ้ง 18:2n6, 18:3n3, EPA และ DHA คือ 0.4, 0.3, 0.4 และ 0.4 % ในอาหาร (Akiyama and Dominy, 1989) Shiau (1998) กล่าวว่ากุ้งกุลาดำระยะโพสลาว่า (postlavae) ควรมีการเสริมกรดไขมันกลุ่ม n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acids) ในอาร์ทีเมียในปริมาณ 12 - 22 มิลลิกรัมต่อกรัมวัตถุแห้งของไขมัน และในอาหารสำเร็จรูป ควรเสริม n-3 HUFA มากกว่า 31.2 มิลลิกรัมต่อกรัมวัตถุแห้ง ทำให้การเจริญเติบโตและอัตรารอด ของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนสูงขึ้น อาหารกุ้งควรมีกรดไขมันกลุ่ม n-3 HUFA (EPA + DHA) 0.5 – 1 % นอกจากนี้ในอาหารกุ้งสำเร็จรูปควรมีฟอสโฟลิปิด 2.0- 6.0 % และคอเลสเตรอล 0.2 - 0.4 % ของไขมัน (เปี่ยมศักดิ์, 2534; Cahu, 2001) กรดไขมันในอาหารโดยเฉพาะ EPA และ DHA กุ้งกุลาดำมีความต้องการสูง แหล่งของกรดไขมันที่ดี ได้แก่ น้ำมันตับปลาคอด ในอาหารกุ้งทะเลจำเป็นต้องเพิ่มในอาหาร 0.8 % เพื่อให้ได้รับกรดไขมันที่เพียงพอต่อความต้องการ

1.4.3 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)

คาร์โบไฮเดตรเป็นแหล่งพลังงานที่มีความสำคัญรองจากโปรตีนและไขมันในอาหาร แหล่งของคาร์โบไฮเดรตได้จากแป้งต่างๆ ระเอียด ปลายข้าว ซึ่งเป็นแหล่งของพลังงานที่มีราคาถูกกว่าวัตถุดิบชนิดอื่น แต่กุ้งสามารถย่อยคาร์โบไฮเดตรได้น้อย จำเป็นต้องทำให้วัตถุดิบเหล่านี้สุกโดยให้ความร้อนในการอัดเม็ด เพื่อให้กุ้งย่อยคาร์โบไฮเดรตได้มากขึ้น เปี่ยมศักดิ์ (2534) กล่าวว่า การที่กุ้งได้รับคาร์โบไฮเดรต และไขมันน้อยกว่าความต้องการจะทำให้กุ้งใช้โปรตีนในอาหารบางส่วนเป็นพลังงาน ทำให้มีโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตน้อยลง ในทางกลับกันถ้ากุ้งได้รับคาร์โบไฮเดรตมากเกินไป จะทำให้เกิดการสะสมในรูปไขมันในตับกุ้งมากขึ้นการเจริญเติบโตของกุ้งจะลดลง

Alava and Pascual (1987) รายงานว่า อาหารกุ้งกุลาดำที่มี คาร์โบไฮเดรตจาก ทรีฮาโลส ซูโครส และ กลูโคส ในอาหาร 10, 20 และ 30 % พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารจากทรีฮาโลสและซูโครส มีการเจริญเติบโตโดยน้ำหนักสูงกว่ากลูโคสในอาหาร และทรีฮาโลสทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดกุ้งเพิ่มขึ้น

Shiau and Peng (1994) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์ของคาร์โบไฮเดรตในอาหารที่มีโปรตีนระดับต่างๆ (40, 35 และ 30 %) แหล่งคาร์โบไฮเดรตจาก กลูโคส เด็กตรีน และแป้งในอาหารสามระดับ (20, 25 และ 30 %) ผลการทดลองพบว่าคาร์โบไฮเดรตจากแป้ง และเด็กตรีน มีผลให้การเจริญเติบโตโดยน้ำหนัก อัตราแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและอัตรารอดสูงกว่ากลูโคส และแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอาหารกุ้งจากแป้งเหมาะสมกว่าเด็กตรีน และกลูโคส เพราะมีราคาถูกกว่า

1.4.4 วิตามิน (Vitamins)

วิตามินเป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต เมตาบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ วิตามินแบ่งออก 2 ประเภท คือ วิตามินที่ละลายในน้ำ และวิตามินที่ละลายในไขมัน สัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินได้เองจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ดังนั้นการใส่วิตามินในอาหารจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตอัตรารอดสูง และให้ผลผลิตสูง ความต้องการวิตามินชนิดต่างๆ ในอาหารกุ้งดังแสดงในตารางที่ 1

1.4.5 แร่ธาตุ (Minerals)

กุ้งมีความต้องการแร่ธาตุทั้งหมด 20 ชนิด ซึ่งบางชนิดต้องการในปริมาณมาก บางชนิดต้องการในปริมาณน้อย แร่ธาตุ ที่มีความจำเป็นค่อนข้างมากต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม คลอรีน และกำมะถัน หน้าที่สำคัญของแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบของเปลือกกุ้ง การปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอก (ความเค็ม) เนื้อเยื่อ ระบบประสาทของกุ้ง และองค์ประกอบของเอนไซม์ ฮอร์โมน และสารสีต่างๆ ตามลำตัว แร่ธาตุที่สำคัญสำหรับกุ้งมี 2 ชนิด คือ แคลเซียมและฟอสฟอรัส เพราะเป็นส่วนสำคัญในเนื้อเยื่อ และโครงสร้างร่างกาย อาหารกุ้งทะเลควรมีสัดส่วนของการแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสในอาหารเท่ากับ 1:2 จึงจะเพียงพอต่อความต้องการเพื่อการเจริญเติบโต (เปี่ยมศักดิ์, 2534)

Shiau (1998) อ้างถึง Deshimaru and Yone (1978) รายงานว่า กุ้ง *P. japonicus* ต้องการ ฟอสฟอรัส 2.0 % โปแตสเซียม 1 % และแร่ธาตุอื่นๆ 0.2 % และอ้างถึง Kanazawa, *et al,* (1984) ว่ากุ้งชนิดนี้ต้องการ แคลเซียม 1 % ฟอสฟอรัส 1 % แมกนีเซียม 0.3 % โปแตสเซียม 0.9% และคอบเปอร์ 0.6 % ในอาหาร(ตารางที่ 1) ส่วนกุ้งขาววานาไม *(P. vannamei)* แคลเซียมไม่จำเป็นต้องเสริมในอาหารเพราะมีปริมาณเพียงพอจากวัตถุดิบอาหารอยู่แล้ว และฟอสฟอรัสในอาหารไม่ต่ำกว่า 0.35 % จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้ง (Davis *et al.,* 1993) และ Akiyama and Dominy, (1989) และ Lovell (2002) รายงานความต้องการแร่ธาตุในอาหารกุ้งทะเลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของวิตามินที่เสริมในอาหารสำเร็จรูปกุ้ง และความต้องการวิตามินในอาหารกุ้งกุลาดำ

วิตามิน	อาหารสำเร็จรูปกุ้งทะเล มก./อาหาร1 กก.		กุ้งกุลาดำ มก./อาหาร1 กก.
	Akiyama and Dominy, (1989)	Lovell (2002)	Shiau (1998)
ไทอามิน (Thiamin)	150	50	13 – 14
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	100	30	22.5
ไฟริโดซีน (Pyridoxine)	50	60	-
กรดแพนโทเทนิค (Pantothenic acid)	100	80	-
ไนอาซีน (Niacin)	300	80	7.2
ไบโอตีน (Biotin)	1	2	-
ไนโอซีทอล (Inosital)	300	200	-
โคลีน (Choline)	400	1,500	-
กรดโฟลิค (Folic acid)	20	5	2 – 8
ซายาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamine)	0.1	0.01	0.2
วิตามิน ซี ในรูป			
กรดแอสคอบิค (Ascobic acid) : (C1)	1,200	200	2000
Poly phosphate : (C2PP)	-	-	210
Magnisium phosphate : (C2PMg)	-	-	100 – 200
Monophosphate (C2MP)	-	-	40
L-ascorbyl-2 sulfate : (C2S)	-	-	157
วิตามิน เอ	15,000 IU/ กก.	4,000	-
วิตามิน ดี	7,5000 IU/ กก.	2,000	0.1
วิตามิน อี	400	100	-
วิตามิน เค	20	20	30 - 40

ตารางที่ 3 ความต้องการแร่ธาตุในอาหารกุ้งทะเลสกุล *Penaeus*

แร่ธาตุ	ความต้องการแร่ธาตุของกุ้งทะเล *Penaeus*	
	Akiyama and Dominy, (1989)	Lovell (2002)
แร่ธาตุหลัก (macro mineral) (ก/กก.)		
แคลเซียม (Calcium : Ca)	23	10
ฟอสฟอรัส (Phosphorus : P)	15	10
โปแตสเซียม (Potassium : K)	8	6.0
แมกนีเซียม (Magnesium : Mg)	2	0.4
แร่ธาตุรอง (micro mineral) (มก./กก.)		
แมงกานีส (Manganese : Mn)	20	40
สังกะสี (Zinc : Zn)	110	30 หรือ 200
เหล็ก (Iron : Fe)	300	60
ทองแดง (Copper : Cu)	35	32
ไอโอดีน (Iodine : I)	-	5
ซิลิเนี่ยม (Selenium : Se)	1	0.4
โคบอล (Cobalt : Co)	10	0.4

2. สมดุลออสโมซิล

Osmoregulation หมายถึง การรักษาความเข้มข้นของออสโมซิสในร่างกายสิ่งมีชีวิต ให้มีความแตกต่างจากสิ่งแวดล้อมภายนอกตัว (external medium) และไม่ได้ควบคุมการกระจายของน้ำเพียงอย่างเดียว ยังควบคุมส่วนประกอบและความเข้มข้นของไอออนแร่ธาตุต่างๆ (ส่งศรี, 2533)

เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ สัตว์น้ำจำเป็นต้องมีการปรับตัวให้สัมพันธ์กับกลไก Osmoregulation เพื่อรักษาสมดุลที่เกิดการผันแปรของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การรักษาปริมาณน้ำเข้าออกให้คงที่ การรักษาอุณหภูมิภายใน และการควบคุมความเป็นกรด-ด่างในเลือด สัตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีการควบคุมออสโมซิสต่างกัน ทั้งนี้เพราะปริมาณแร่ธาตุไอออนในสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน สามารถแบ่งสภาพการควบคุมออสโมซิสของสัตว์น้ำได้ 3 อย่าง คือ

1) Iso-osmotic สภาวะที่ความเข้มข้นของของเหลวภายในร่างกายเกือบเท่ากันน้ำที่อยู่อาศัยอยู่ จะไม่มีปัญหาการไหลของน้ำ (osmotic water flow) เข้าออกในร่างกาย

2) Hypo-osmotic สัตว์น้ำจะสูญเสียน้ำภายในร่างกายให้กับน้ำที่อยู่รอบตัว

3) Hyper-osmotic สัตว์น้ำได้รับน้ำจากรอบตัวภายนอก และจะขับน้ำที่มากเกินไปทางอวัยวะขับถ่าย

สัตว์น้ำจืดและน้ำกร่อยส่วนมากอยู่ในภาวะ hyper-osmotic เพราะความเข้มของเกลือในเลือดสูงกว่าน้ำที่อาศัย ส่วนสัตว์น้ำที่อาศัยในทะเลจะอยู่ในสภาวะ hypo-osmotic เพราะความเข้มของเกลือในร่างกายต่ำกว่าแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ การปรับตัวของสัตว์น้ำกับการเปลี่ยนแปลงสภาวะสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้น 2 ระยะ คือ ระยะแรกลดระดับเกลือในเลือดอย่างช้าๆ เพื่อดูดซึมไอออนโดยตรงจากน้ำ ระยะที่สอง ไตทำหน้าที่ขับเกลือออกและดึงเข้ามาใหม่เพื่อรักษาความเข้มของเลือดในร่างกายให้สมดุล

สัตว์น้ำที่อาศัยในทะเลจะมีความเข้มข้นของของเหลวในร่างกายเป็น hypo-osmotic กับน้ำทะเลที่อาศัยอยู่ สัตว์ทะเลจึงเป็น hypo-osmoregulator การศึกษาความเข้มข้นของแร่ธาตุไอออนต่างๆ ภายในเซลล์ ความเข้มข้นของแร่ธาตุไอออนต่างๆ ภายในและภายนอกเซลล์ สัตว์ทะเลมีความแตกต่างกัน โดยของเหลวจากภายนอก (Extracellular fliuid : ECF) จะมีส่วนประกอบของแร่ธาตุไอออนใกล้เคียงกับน้ำทะเล แต่ส่วนประกอบภายในเซลล์จะแตกต่างในแง่ปริมาณของแร่ธาตุ คือ มีโปแตสเซียมสูงกว่าภายนอกเซลล์ แต่มีโซเดียมและคลอไรด์ต่ำกว่าในน้ำทะเล นอกจากนี้ organic solutes ที่ทำให้เกิดสมดุลภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน ดังนั้นสัตว์น้ำจึงต้องมีการขับน้ำออกทางเหงือกและผิวหนัง และกลืนน้ำทะเลเข้าไปทดแทนเพื่อรักษาสมดุลภายในร่างกาย

ประจวบ (2543) กล่าวว่า การปรับสมดุลเกลือและน้ำของเหลวภายในร่างกายประกอบด้วยอนุภาคเล็กๆ ของสารทั้งหมดที่แตกต่างกับสภาพแวดล้อมภายนอก ในน้ำที่สัตว์เหล่านี้อาศัยแร่ธาตุที่สำคัญต่อการดำรงชีพของกุ้งและเกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลในร่างกายคือ โปแตสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม คลอไรด์ และแคลเซียม ซึ่งมีหน้าที่ดังนี้

1) โซเดียม (Na^+) พบในกล้ามเนื้อประมาณ 90% หน้าที่ของโซเดียมในร่างกาย รักษาสมดุลของออสโมติกเพรสเชอร์ควบคู่กับ K^+ รักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างในร่างกายให้สมดุล และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาท ในร่างกายถ้า Na^+ ปริมาณ

มากเกินไปจะถูกขับออกพร้อมกับอุจจาระ ปัสสาวะ แต่ถ้าน้อยเกินไปทำให้ กุ้งเบื่ออาหาร การเจริญเติบโตลดลง การใช้ประโยชน์โปรตีนลดลง การพัฒนาสู่วัยเจริญพันธุ์ช้า และ Na^+ ทำหน้าที่ควบคุมประจุต่างๆ ในร่างกายควบคู่กับ Cl^-

2) คลอไรด์ (Cl^-) พบในของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ สัตว์สามารถสะสมได้มากกว่า Na^+ และ K^+ มีหน้าที่รักษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำย่อยและเป็นส่วนประกอบในน้ำย่อย รักษาออสโมติกเพรสเชอร์ ควบคุมการเข้าออกของสารและน้ำภายในเซลล์ ร่างกายได้รับและขับถ่ายหรือแลกเปลี่ยน Cl^- บริเวณเหงือกสลับกับเข้าออก Na^+ ในการรักษาสมดุล Cl^- เกี่ยวข้องกับการเกิดสมดุลของ cation และ anion โดยรวมอยู่กับโซเดียม ถ้าอยู่ในสภาพสมดุลการแลกเปลี่ยนของ Mg^{++} และ SO^{--} จะเกิดได้ดี Cl^- จะผกผันกับ SO^{--} คือ ถ้า SO^{--} ลดลง ปริมาณ Cl^- เพิ่มขึ้น และถ้า SO^{--} เพิ่มขึ้น Cl^- จะลดลง นอกจากนี้ช่วยยังกระตุ้นน้ำย่อย amylase ให้ทำงานดีขึ้น ปริมาณของ Cl^- ในเลือดของครัสเตเซียในทะเล จะเท่ากับในน้ำทะเล

3) โปแตสเซียม (K^+) พบในเซลล์ของร่างกายและเลือด ส่วนในของเหลวภายนอกเซลล์พบ K^+ ปริมาณน้อย ในระยะที่มีการเจริญเติบโตหรือเริ่มสร้างเนื้อเยื่อใหม่ความต้องการ K^+ ในเซลล์จะสูงมาก มีการดูดซึมเข้าออกผ่านสมดุลเหงือกและเนื้อเยื่อที่เหงือกโดยขบวนการ active transport แต่ K^+ ผ่านเซลล์โดยขบวนการ passive transport จากความเข้มข้นมากไปสู่น้อย หน้าที่ K^+ รักษาความสมดุลของร่างกาย ควบคุมการเข้าออกของสารและน้ำภายในเซลล์ ด้วยการทำงานร่วมกับ Na^+ รักษาออสโมติกเพรสเชอร์ สมดุลความเป็นกรด-ด่างภายในร่างกาย ถ้าร่างกายขาด K^+ ทำให้การใช้ประโยชน์ของโปรตีนลดลง เลือดเป็นกรด เกิดการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร แต่ถ้ามีมากเกินไปหัวใจจะหยุดเต้น

4) แมกนีเซียม (Mg^{++}) พบในโครงสร้างร่างกายประมาณ 70% ส่วนอีก 30% พบในเนื้อเยื่อและเลือด มีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ให้ได้ผลดีขึ้น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์ การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศ และมีผลต่ออัตราการเผาผลาญอาหาร (metabolic rate) เนื่องจากการทำงานของ ATP ต้องใช้ Mg^{++} เป็นองค์ประกอบหากไม่มี Mg^{++} จะไม่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่จะเปลี่ยน ATP ไปเป็น ADP ได้

5) แคลเซียม (Ca^{++}) สัตว์ใช้ Ca^{++} ควบคู่กับ P (1:1) ร่างกายจะย่อย Ca^{++} ให้มีโมเลกุลเล็กก่อนจึงดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ และดูดซึมได้ดีกว่า P โดยเฉพาะการดูดซึม ที่บริเวณลำไส้จะทำได้ดีขึ้น

ถ้ามีวิตามินอยู่ด้วย Ca^{++} เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างภายนอกของพวกครัสเตเซี่ยน โดยสะสมในตับในรูปของเกลือ $CaPO_4$ อาจจะมีการสะสม Ca^{++} ในเลือด และส่วนอื่นของร่างกาย

3. ระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) หมายถึง การตอบสนองของร่างกายที่จำเพาะต่อแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยสามารถจำแนกสิ่งที่เป็นตัวเรา (self antigen) ออกจากสิ่งที่ไม่เป็นตัวเรา (non-self antigen) (ฤทัย, 2539)

ระบบภูมิคุ้มกัน หมายถึง ระบบทางสรีระวิทยาที่ทำให้สัตว์หรือมนุษย์มีความสามารถจดจำต่อสิ่งแปลกและทำให้สิ่งแปลกปลอมนั้นถูกทำให้หมดสภาพลง (neutralization) หรือขับสิ่งแปลกปลอมออก หรือทำลายสารที่สิ่งแปลกปลอมนั้นขับออกมา ซึ่งการกระทำนี้อาจจะเกิดหรือไม่เกิดการบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อของตัวเอง (โสมทัต, 2538)

ระบบภูมิคุ้มกัน หมายถึง กลไกตามธรรมชาติที่ทำให้ร่างกายสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมได้ และพยายามกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นทิ้งไป ซึ่งอาจเป็นอันตรายหรือไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อของตนด้วยวิธีต่าง ๆ (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2542)

องอาจ (2533) กล่าวว่า ระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตจะพัฒนาจนสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือตัวเชื้อโรคที่เข้ามาในร่างกายได้ด้วยตัวเอง ซึ่งสามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายออกได้ 2 ประเภท คือ

1) ภูมิคุ้มกันประเภทขาดความจำเพาะต่อเชื้อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (nonspecific immunity)

2) ภูมิคุ้มกันประเภทที่มีความจำเพาะต่อเชื้อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (specific immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเซี่ยนในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบคือ โปรตีนชนิดต่างๆ ในซีรั่ม เช่น แอกกลูตินิน (agglutinin) ฮีโมไล

ซิน (hemolysine) ไลโซซายม์ (lysozyme) และโปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (Cloting protein) เซลล์เม็ดเลือดซึ่งจะก่อให้เกิดกระบวนการเกาะกลุ่ม (adhesion) และการสร้างเม็ดสี (melanization)

Lackie (1986) กล่าวถึงลักษณะสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไว้ 4 ลักษณะ คือ

1) ไม่มีการสร้างสารอิมโมโกลบูลิน (Immunoglobulin: lg)

2) มีความสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งที่เป็นของตัวเองกับสิ่งแปลกปลอม

3) สัตว์ในกลุ่มไม่มีกระดูกสันหลังเป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด จึงจำเป็นต้องมีกลไกลในการป้องกันตัวทันทีที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดกระบวนการ phagocytosis, encapsulation และ coagulation เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดขณะเกิดบาดแผล

4) มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเลือดมีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย

Sindermann and Lightner, (1998) ได้แบ่งระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังออกเป็น 2 กลุ่ม

1) ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immune response) ประกอบด้วย agglutinins, lysine, precipitins และ bactericidins ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลายๆ ปฏิกิริยา เช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clotiing) การเกิดเมลานิน (melanin formation) และ opsonization ระบบที่สำคัญคือ โปรฟีนอลออกซิเดสแอกติเวตี้ ซิสเตม (prophenol oxidase activatihg system) และ เลคติน (lectin) ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม

2) ระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานในเซลล์ (cellular immune response) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ เซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ hyaline cell, semi granular และ large granular) ที่เป็นอิสระและเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามกล้ามเนื้อ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อหัวใจ และ

อวัยวะอื่นๆ ซึ่งมีวิธีหลายวิธีประกอบด้วยกระบวนการจับกินเชื้อโรค (phagocytosis activity), การห้อมล้อมตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม (nodule formation encapsulation) hemocytosis,และ coagulation (Soderhall and Cerenius, 1992)

3.1 ชนิดของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (haemocyte type)

การศึกษาชนิดและลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเซี่ยน โดย Martin and Graves (1985) และ Soderhall and Cerenius (1992) จำแนกชนิดเซลล์เม็ดเลือดกุ้งเป็น 3 กลุ่ม คือ

3.1.1 Hyaline cell หรือ Hyalinocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่ไม่มีแกรนนูล อยู่ในไซโตพลาสซึ่ม มีขนาดเล็กที่สุดและพบมากที่สุด มีนิวเคลียสขนาดใหญ่สีทึบ แต่เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนอาจพบ cytoplasmic inclusion โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้พร้อมที่จะยึดเกาะผิวกระจก มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย เรียกว่า phagocytosis

3.1.2 Semigranular cell หรือ Intermediate granulocyte จัดเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนนูลอยู่ในไซโตพลาสซึม ขนาดเล็ก มีนิวเคลียสรูปกลมหรือรูปไข่อยู่กลางเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้จะแตกได้ง่ายเมื่ออยู่ในหลอดทดลอง ทำให้เกิดการ degranulation ดังนั้นต้องใช้ความระมัดระวังในการศึกษา

3.1.3 Granular cell หรือ Granulocyte จัดเป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีรูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสขนาดเล็กอยู่กลางเซลล์ มีแกรนนูลขนาดใหญ่อยู่ในไซโตพลาสซึม

โครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดของพวกครัสเตเซีย พบว่า เซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำหน้าที่ในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (phagocytosis) ส่วนเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranular cell และ granular cell เป็นส่วนประกอบสำคัญของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (pro phenoloxidase activity system : proPO), nodule formation, encapsulation และยังมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานโดยเซลล์ด้วย (Smith and Soderhall, 1983)

การศึกษาแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง *Penaeus stylirostris* ด้วยวิธีการย้อมสี giemsa จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกชนิด และนับเซลล์เม็ดเลือดในแต่ระยะของการลอกคราบ พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ประมาณ 80 % ชนิด semigranular cell ประมาณ 10-13 % และชนิด granulae cell ประมาณ 4-10 % (Moullac *et al*., 1997)

3.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดหรือสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้แก่ เลคติน (lectine) , สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial substances), เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) และเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) โดยสารประกอบบางชนิดเป็นโปรตีน บางชนิดเป็นเอนไซม์ สารประกอบในน้ำเลือดส่วนใหญ่ถูกหลั่งมาจากแกรนนูลของเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย หรือทำให้เกิดการแตกของเซลล์ (Smith and Soderhall, 1983)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) หรือระบบ Prophenoloxidese activating system (proPO) เป็นระบบที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบต่างๆ ของเอนไซม์ ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ช่วยในการทำลายสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งพวกจุลินทรีย์ โดยทำการเปลี่ยนเอนไซม์ prophenoloxidase เป็น phenoloxidase ทำปฏิกิริยากับ phenol แล้วให้สารประกอบควินิน (quinine) ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเมลินิน (melanin) ซึ่งหน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การยับยั้งเอนไซม์ proteinase และ chitinase ที่อยู่ภายนอกเซลล์ สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบ proPO เช่นเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและเชื้อรา (Hose *et al*., 1987; Soderhall *et al*., 1996)

ระบบ proPO ที่แยกได้จากกุ้ง crayfish มีน้ำหนักโมเลกุล 76 กิโลดาตัน ประกอบด้วย polypeptide สายเดี่ยว กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร lipopolysaccharide หรือ β-1,3-glucan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้ง peptidoglycan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จุลินชีพ ระบบ proPO ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นใน vesicle ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranular cell และ granular cell ทำให้เกิดการหลั่งสาร proPO ออกมานอกเซลล์ การควบคุมกิจกรรมของระบบ proPO ไม่ให้อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น

โดยการมีตัวยับยั้ง ได้แก่ proteinase inhibitor และ trypsine inhibitor ส่วนตัวยับยั้งที่ได้มีการศึกษาแล้วได้แก่ α2-macroglubulin สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้เพียงบางส่วน ลักษณะของ α2-macroglubulin ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั้งหมดเป็น dimmer ซึ่งต่างจากพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็น tetramer (Smith and Chisholm, 1992; Soderhall and Cerenius, 1992; Bachere *et al.,* 1995; Sritunyalucksana *et al.,* 1999)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุ้งลาดำ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาว ส่วนใหญ่พบเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในไซโตพลาสซึ่มของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranulocyte และ granulocytel (Sung *et al*., 1996) โดยพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดมีค่าสูงกว่าในน้ำเลือดกุ้ง (Parrazzolo and Barracco, 1997) นอกจากนี้แล้วยังพบเอนไซม์ชนิดนี้มีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง *Penaeus stylirostris* พบว่าปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่วัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดในช่วงที่มีการลอกคราบ (interoult) สูงกว่าระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) อย่างมีนัยสำคัญ (Moullac *et al.,*1997)

การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายนอก มีผลกระทบต่อการตอบสนองต่อกิจกรรมของเอมไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ พบว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจาก 26 - 35 ^{0}C ส่งผลให้ปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงถึง 31 % (พรเลิศ และคณะ, 2541ก) ปริมาณของเอนไซม์ฟีนนอลออกซิเดสสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อกุ้งได้รับสาร β-1, 3-glucan ในอัตรา 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 3 วัน สามารถกระตุ้นให้การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นมีค่าอยู่ในช่วง 4.88-12.66 unit/min/mg protein (พรเลิศ และคณะ, 2541ข) ในสภาพที่ pH ของน้ำต่ำกว่าค่าปกติ (6.0) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือด (2.60 x 10^{4} เซลล์/มล) และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (469.17 unit/min/mg protein) แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำ และระดับของอุณหภูมิที่ต่ำลงมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะลดต่ำลงกว่าในสภาวะปกติ (249.38 และ 365.49 unit/min/mg protein) (กิจการ และคณะ, 2543ข)

3.3 ระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานโดยเซลล์ (cellular immunity)

การป้องกันตัวโดยเซลล์เป็นกลไกที่มีการแสดงออกในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่วิวัฒนาการที่แตกต่างกัน ทำให้กลไกลของรายละเอียดในแต่ละชนิดแตกต่างกัน ระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานโดยเซลล์มักจะใช้เซลล์เม็ดเลือดเป็นหลักในการต่อสู้ และกำจัดสิ่งแปลก ปลอม ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ phagocytosis, nodule formation และ encapsulation โดยทั่วไปสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยจะถูกกำจัดโดยกระบวนการ phagocytosis สำหรับ nodule formation จะเป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กแต่มีจำนวนมาก ส่วน encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่เข้าสู่ร่างกาย

3.3.1 ขบวนการฟาโกซัยโตซีส (phagocytosis)

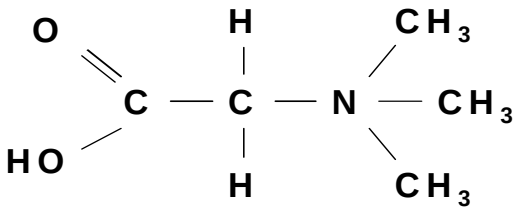
ขบวนการฟาโกซัยโตซีสเป็นการป้องกันตนเองโดยการใช้เซลล์พื้นฐานที่มีอยู่ทั่วไปในสัตว์ ซึ่งเป็นตัวแรกของการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านเข้ามาในร่างกาย เกิดจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและโปรตีนเปอร์ออกซิเนคติน (peroxinectin) ในน้ำเลือดช่วยทำให้เกิดการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอม (Soderhall and Cerenius, 1992) การกลืนเซลล์สิ่งแปลกปลอมนั้นทำโดยการยื่นไซโตพลาสซึมให้ล้อมรอบเซลล์สิ่งแปลกปลอม จากนั้น lysosome จะทำการหลั่งเอมไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases หลังจากการย่อยสลายจะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์ โดยทั่วไปแล้วในกลุ่มครัสเตเซียถ้าไม่มีการแยกชนิดเฉพาะของเซลล์เม็ดเลือดพบว่าอัตราการ phagocytosis มีค่าตั้งแต่ 1-28 % ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำเลือดและปัจจัยแวดล้อมภายนอก กุ้งกุลาดำที่ทดลองเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่า phagocytosis เฉลี่ย 26.14 % (กิจการ และคณะ, 2543ข) และหากเซลล์เม็ดเลือดที่ได้สัมผัสกับ β-1,3-glucan จะส่งผลให้อัตราการ phagocytosis เพิ่มขึ้น 5-7 เท่าใน กุ้ง *Penaeus japonicus* (นันทริกา, 2538; Bachere *et al*., 1995) การศึกษาการใช้เซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ที่ได้จากปู *Carcinus menus* พบว่าทำให้อัตราการ phagocytosis เพิ่มขึ้น 3 เท่าของกุ้ง (Soderhall and Cerenius, 1992) ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่าการเพิ่มขึ้นและลดลงของอุณหภูมิจาก 26 เป็น 35 ^{0}C และ 26 เป็น 15 ^{0}C และการเพิ่มของ pH น้ำจาก 7.8 เป็น 10.0 ไม่ทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกระบวนการ phagocytosis เปลี่ยนแปลง แต่การลดลง pH ของน้ำจาก 7.8 เป็น 6.0 ทำให้ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนกินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (พรเลิศ และคณะ, 2541ก)

3.3.2 ขบวนการ Encapsulation และ Nodule formation

Encapsulation เป็นขบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ และจำนวนมากเข้าสู่ร่างกาย นอกจากที่ถูกกำจัดได้ด้วยขบวนการ phagocytosis เป็นการทำงานของเซลล์ เม็ดเลือดชนิด granular cell เข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอมในระบบไหลเวียนให้รวมกันด้วยเม็ดเลือด หลายๆ ชั้น โดยการเรียงตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดเกิด encapsulation กับสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่แล้วทำการกำจัดออกจากร่างกาย ส่วน nodule formation เป็นขบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีจุลินทรีย์จำนวนมากเข้ามาจนร่างกายไม่สามารถกำจัดได้หมด โดยเซลล์ทำการหลั่งสารบางชนิดออกมาหุ้มสิ่งแปลกปลอมไว้เป็นก้อนขนาดเล็กๆ ทำให้เกิดเป็นเมลานินโดยปฏิกิริยาของเอมไซม์ฟีนอลออกซิเดสซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ทั่วร่างกาย ในกุ้งกุลาดำ nodule formation มักเกิดขึ้นในบริเวณที่เซลล์เม็ดเลือดเข้าไปได้น้อย เช่น บริเวณซี่เหงือก ลำตัว หัวใจ ตับ และตับอ่อน ส่วน encapsulation พบได้ในแอ่งเลือด (Smith and Soderhall, 1983; กิจการ และคณะ, 2543ค)

4. เบทาอีน

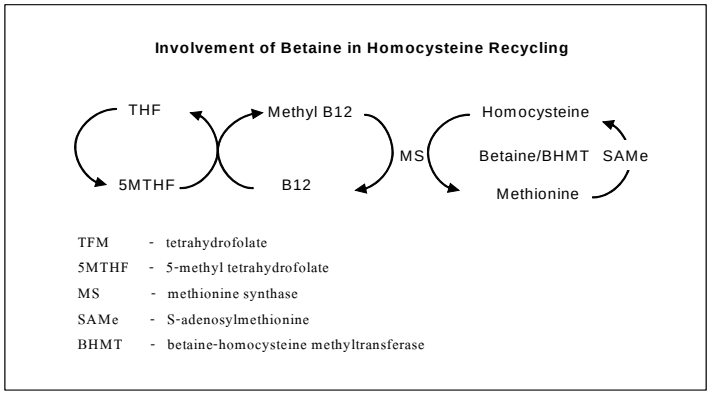
เบทาอีน (Betaine) มีชื่อทางเคมีว่า ไตรเมธิลไกลซีน มักพบในรูปแบบของ glycine betaine และ trimethylglycine เป็นสารประกอบของหมู่เมธิลรวมกับกรดอะมิโนไกลซีน (amino acid glycine) ภาพที่ 1 เบทาอีนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโคลิน (choline) เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้หมู่เมธิล (CH_3) (methyl donor) จึงมีความจำเป็นในปฏิกิริยาชีวเคมีของ เมไธโอนีน (methionine) และ โฮโมซีสทีน (homocysteine)ช่น ลดระดับ โฮโมซีสทีน (homocysteine) ในพลาสม่า และช่วยการการทำงานของตับที่เกี่ยวข้องกับไขมันให้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยรักษาความสมดุลภายในเซลล์ (osmoprotectant) และป้องกันโปรตีนถูกทำลาย (Schwahn. *et al*., 2003)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเบทาอีน

4.1 ชีวเคมีของเบทาอีน

เบทาอีนถูกสร้างขึ้นในร่างกายโดยขบวนการออกซิเดชั่นของโคลีน(oxidation of chlorine) ไตรเมธิลเลท (trimethylated) และสารประกอบที่ให้หมู่เมธิล เบทาอีนจะมีการให้หมู่เมธิลอย่างจำกัดเพียงหนึ่งปฏิกิริยาชีวเคมีเท่านั้นของการเปลี่ยนโฮโมซีสทีนไปเป็นเมไธโอนีน หลังจากที่มีการให้หมู่เมธิลแล้ว เบทาอีนจะเปลี่ยนไปเป็นไดเมธิลไกลซีน (dimethylglycine : DMG) ในวัฏจักรเมไธโอนีนโฮโมซีสทีน ซัลเฟอร์ที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของกรดอะมิโนเมไธโอนีนจะถูกเปลี่ยน เป็นเอส-อะดีโนซิลเมไธโอนีน (S-adenosylmethionine : SAMe) การให้เมธิลครั้งแรกสำหรับปฏิกิริยาทางชีวเคมีจะเกิดขึ้นที่ตับและถูกส่งมาที่เนื้อเยื่อ การสูญเสียหมู่เมธิลทำให้ adenosylmethionine ถูกเปลี่ยนไปเป็น S-adenosylhomocysteine และสูญเสีย adenosine แล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นโฮโมซีสทีน (homocysteine) หลังจากนั้นจะถูกเมตาบอไลซ์ไปเป็นกรดอะมิโนซีสทีน (cysteine) และ ทอรีน (taurine) ซึ่งเป็น transsulfuration หรือเปลี่ยนกลับมาเป็นเมไธโอนีนจากการรับหมู่เมธิล ในปฏิกิริยาเมธิลเลชัน (methylation) การเพิ่มหมู่เมธิลในโฮโมซิสทีนมีสองทาง (pathway) คือ การให้หมู่เมธิลของวิตามินบี 12 (methylmocabalamin) ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สังเคราะห์เมไธโอนีน หรืออีกทางหนึ่งคือการให้หมู่เมธิลของเบทาอีนแก่โฮโมซีสทีนโดย เอนไซม์เบทาอีน-โฮโมซิสทีน เมธิลทรานซ์เฟอเรส (betaine-homocysteine methyltransferase : BHMT) ภาพที่ 2 (Miller, 2003) กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการให้หมู่เมธิลของเบทาอีนพบเพียงการให้โฮโมซีสทีนเท่านั้นโดยเอนไซม์เบทาอีนโฮโมซิสทีน เมธิลทรานซ์เฟอเรส (betaine-homocysteine methyltransferase : BHMT) จะไม่พบในขบวนการหมู่เมธิล (methylation) ในปฏิกิริยาอื่น (Millan and Garrow, 1998)



ภาพที่ 2 วัฏจักรของโฮโมซีสทีนที่มีเบทาอีนเกี่ยวข้อง

4.2 คุณสมบัติของเบทาอีน

เบทาอีนเป็นสารประกอบธรรมชาติไม่เป็นพิษสามารถทนความร้อนได้ถึง 200 ^{0}C แหล่งที่พบ เช่น บีท ตับ ไข่ปลา ถั่วต่าง และธัญพืช เป็นต้น และยังพบปริมาณสูงในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลซึ่งเป็นอาหารของปลา ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวของเบทาอีนจึงถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปมักจะพบในสัตว์น้ำที่เป็นเหยื่อธรรมชาติ โดย เฉพาะพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล แต่ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำเบทาอีนยังถูกนำมาใช้ในอาหารปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับในสัตว์บก

4.3.1 ช่วยรักษาสมดุลในร่างกาย (Osmoprotectant)

เบทาอีนที่พบในพืช จุลลินทรีย์ ละสัตว์บางชนิดนั้นมีประโยชน์ที่จะช่วยให้เซลล์สามารถรักษาสมดุลได้ในกรณีที่สิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง เช่น เกิดความแห้งแล้ง เกิดสภาวะไฮเปอร์ออสโมติก (hyperosmotic stress) น้ำจะแพร่ออกจากเซลล์ สารละลายภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน การสังเคราะห์เบทาอีนในไมโตคอนเดรียแล้วนำไปสะสมที่ในเซลล์จะช่วยรักษาสมดุลโดยจะเก็บน้ำไว้และขับเกลือออกจากเซลล์ เมื่ออุณหภูมิหรือความเค็มเปลี่ยนไปการทำงานของเอนไซม์จะลดลง inactive enzyme แต่เมื่อได้รับเบทาอีนจะช่วยทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ยังคงทำงานได้ปกติ ซึ่งจะคล้ายกับการทำงานของเบทาอีนในไตของสัตว์ชั้นสูง เกิดการสะสมในอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย (Sung and Johnstone, 1969; Yancey, 1992; Burg, 1992) จากการทดลองปลาได้ที่รับเบทาอีนจากการเสริมในอาหารซึ่งจะถูกเก็บสะสมไว้ในเนื้อเยื่อจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาระหว่างเกิด osmotic stress เมื่อเกิดสภาวะของสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป จะช่วยรักษาความสมดุลของไอออนภายในเซลล์ และอัตราเมตาบอลิซึมให้เป็นปกติ เช่น ในปลาซัลมอนที่มีการอพยพจากน้ำจืดไปยังทะเล

4.3.2 สารดึงดูดการกิน (chemoattractant)

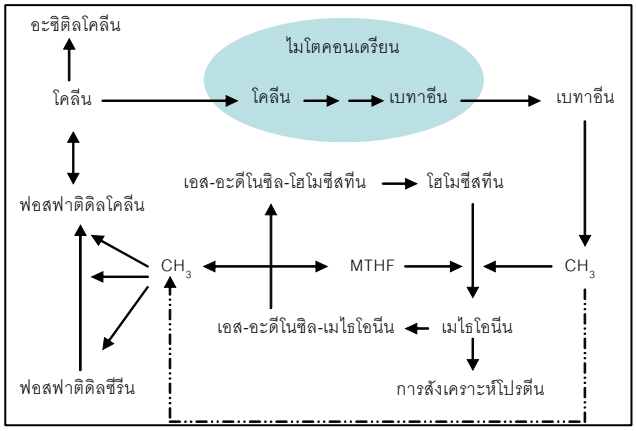
สารเคมีที่เป็นสารช่วยดึงดูดการกินอาหาร เช่น กรดอะมิโน (amino acid) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) นิวคลีโอไซด์ (nucleoside) และ quaternary ammonium bese (Takeda and Takii, 1992; Penafloraida and Vertanen, 1996a.) เนื่องจากเบทาอีนมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี กลิ่นและรสชาติของเบทาอีนจึงช่วยในการดึงดูดให้สัตว์น้ำมากินอาหารของสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

การทดสอบใช้เบทาอีนเป็นสารดึงดูดการกินอาหารในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น พบในปลากลุ่มซัลโมนิด (Salmonids) (Marui *et al*.,1983) ปลาซีบรีม (Sea bream) (Goh and Tamura, 1980) ปลาโดเวอร์โซล (Dover sole) (Mackie and Mitchell, 1980) และ กุ้ง (Carr, 1978) เป็นต้น ดังนั้นการเสริมสารเบทาอีนในสูตรอาหารอาจจะช่วยให้อาหารมีความน่ากิน มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น สามารถดึงดูดการกินอาหารสัตว์น้ำมากขึ้น

4.3.2 หมู่เมธิล (methyl donor)

เบทาอีนเป็นผู้ให้หมู่เมธิลในปฏิกิริยาการกระตุ้นการทำงานของหลายเอนไซม์ซึ่งมีความจำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีนและการเผาผลาญพลังงาน (Energy metabolism) การสังเคราะห์เมทไธโอนีนจากโฮโมซีสทีน การสังเคราะห์คาร์นิทีน (carnitine) ครีเอทีน (creatine) และ ฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine) ความสัมพันธ์ของเมตาบอลิซึมระหว่างโคลีน เบทาอีนและเมทไธโอนีน (ภาพที่ 3) เบทาอีนทำหน้าที่ให้หมู่เมธิลทำให้โฮโมซีสทีนเปลี่ยนเป็นเมทไธโอนีนแล้ว ยังให้หมู่เมธิลที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของร่างกาย เช่น คาร์นิทีน (carnitine) ครีเอทีน (creatine) อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ (RNA/DNA) สารที่ทำหน้าทีเกี่ยวกับระบบประสาท (neurotransmitter) ฮอร์โมน และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ช่วยในการเปลี่ยนแปลงพลังงานและลดการสะสมไขมันในสุกร อีกทั้งพบว่าในกล้ามเนื้อของสุกรมีการสะสมคาร์นิทีน (carnitine) และสารประกอบกรดไขมันคาร์นิทีน (carnitine-fatty acid complex) มากขึ้น ช่วยให้การใช้ประโยชน์ไขมันดีขึ้น เนื่องจากคาร์นิทีนจะช่วยลำเลียงขนส่งกรดไขมันไปในไมโตรคอนเดรียทำให้ลดการสะสมไขมันในร่างกาย (Cadongan *et al*., 1993; Fernades-Figares *et al.,* 2002)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการให้หมู่เมธิลของเบาอีนพบเพียงการให้โอโมซีสทีนเท่านั้น โดยเอมไซม์เบทาอีน-โฮโมซีสทีนเมธิลทรานซ์เฟอเรส (betaine-homocysteine methytransferase : BHMT) จะไม่พบในกระบวนการให้หมู่เมธิลในปฏิกิริยาอื่น (Baggott, 1994; Alternative Medicine Review, 2003) แต่ S-adenosylmethionied (SAM)ที่ได้รับจากเมทไธโอนีนสามารถให้หมู่เมธิลแก่ตัวรับได้หลายชนิดและได้ผลิตภัณฑ์แตกต่างกันไปตามตัวรับที่หมู่เมธิล



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของเมตาบอลิซึมระหว่างโคลีน เบทาอีนและเมไธโอนีน

ที่มา: Alternative Medicine Review (2003)

4.4 ผลของเบทาอีนต่อสัตว์น้ำ

Papatryphon and Soares (2000) พบว่าอาหารที่มีเบทาอีนทำให้ Dover sole กินอาหารน้อยกว่าอาหารสูตรควบคุม อย่างไรก็ตามเบทาอีนที่รวมกับกรดอะมิโนอื่นจะกระตุ้นการกินอาหารได้ดีกว่าอาหารที่มีกรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว และได้มีการศึกษาผลของ เบทาอีนและกรดอะมิโนในปลากระพง (striped bass) แต่ก็ยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากเบทาอีนหรือผลจากปฏิกิริยาร่วมของเบทาอีนและกรดอะมิโน

เบทาอีนมีผลต่อการดึงดูดการกินอาหารของสัตว์น้ำ เช่น ปลากลุ่มซัลโมนิด (Salmonids) (Marai *et al*., 1983; Virtanen *et al.,* 1989., 1992,) ซีบรีม (Sea bream) (Goh and Tamura, 1980) โดเวอร์โซล(Dover sole) Mackie and Mitchell, 1980) ปลาไหล (Mackie and Mitchell, 1983) และกุ้ง (Carr, 1978) และสอดคล้องกับที่รายงานว่า กรดอะมิโนเบทาอีนที่ใส่ลงไปในอาหาร เมื่อมีการละลายน้ำทำให้ปลาและกุ้งบางชนิดมีการตอบสนองต่อการกินในทางที่ดี เนื่องมาจากเบทาอีนมีกลิ่นที่ดึงดูดการกินของปลาหลายชนิด (Carr, 1978; Mackie and Mitchell, 1985; Virtanen and Rosi.,1995; Takaoka *et al.,* 1995; Papatryphon and Soares, 2000) อีกทั้งยังพบว่าสริมเบทาอีนในอาหารสัตว์น้ำเพื่อเป็น chemoattractant ในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน *Penaeus monodon* (Murai *et al*., 1983; Penaflorida and Virtanen, 1996b; Coman *et al.*, 1996) กระตุ้นการ

กินอาหารของกุ้ง *Penaeus japonicus* (Deshimaru and Yone, 1978 อ้างโดย Shiau, 1998) และ การเพิ่มไกลซีนเพื่อถูกกระตุ้นพฤติกรรมการหาอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อมีสารละลายไกลซีนเบทาอีน หรือสาร chemoattractant ชนิดอื่นละลายอยู่ในน้ำ (Harpaz, 1997)

จริยา (2549) รายงานว่า การเสริมเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำวัยรุ่น 0.75% และ 1.5% ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน กิจกรรมเอนไซม์ในทางเดินอาหาร อัตราการสังเคราะห์ RNA ตลอดจนปริมาณ RNA และการสะสมของโปรตีนในกล้ามเนื้อ ส่วน อดิษย์ (2549) รายงานว่า การเสริมเบทาอีนในอาหาร 0.75% เพียงพอที่จะทำให้กุ้งกุลาดำวัยรุ่นมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็ม อุณหภูมิ และแอมโมเนียในน้ำ

Felix and Sudharsan (2004) ทำการทดลองพบว่าไกลซีนเบทาอีนที่เสริมในอาหาร 5 กรัมต่อกิโลกรัม ทำให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*Macrobrachium rosenbergii*) มีอัตราการเจริญเติบโตของสูงที่สุด และที่ 10 และ 15 กรัมต่อกิโลกรัม สูงกว่าที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมเช่นกัน ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ อัตราการแลกเนื้อที่ทั้ง 3 ระดับต่ำกว่าที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม

ส่วน Kasper *et al.*, 2002) ได้ทำการทดลองการใช้เบทาอีนทดแทนโคลีนในอาหารสำหรับปลานิลวัยอ่อน (*Oreochromis niloticus*) พบว่าอาหารที่มีสัดส่วนของโคลีนต่อเบทาอีน 40:60 มีผลทำให้ปลามีปริมาณการกินอาหารมากที่สุดคือ 43.1 กรัมต่อน้ำหนักตัวซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับที่สัดส่วน 100: 0 และ 85: 15 ที่มีผลต่อปริมาณการกินอาหารที่น้อยกว่า ส่วนน้ำหนักตัวของปลาที่ได้รับโคลีนต่อเบทาอีนที่สัดส่วน 10:90 มีค่าสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างกับที่สัดส่วน 100:0 และ 85:15 พบว่าสัดส่วนของโคลีนและเบทาอีนในอาหารแต่ละระดับไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพอาหาร (feed efficeincy) และปริมาณการสะสมไขมันในตับ

เบทาอีนมีความสำคัญต่อกรดอะมิโนซัลเฟอร์ในกระบวนการ catabolic pathway อีกทั้งยังสามารถออกซิไดซ์จากโคลีนได้ โดยมีปฏิกิริยาร่วมกันกับโคลีนหรือเมทไธโอนีน รวมทั้งฟอสฟาติดิลโคลีนด้วย ในสัตว์มีกระดูกสันหลังสามารถออกซิไดซ์จากโคลีนมาเป็นเบทาอีนได้ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเดียว แต่ไม่พบหลักฐานการสังเคราะห์โคลีนจากเบทาอีนในปลานิล (Kasper *et al.,* 2000) ปลาเรนโบว์เทร้า (rainbow truot) ที่ได้รับเบทาอีน 1.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถทดแทนความต้องการโคลีนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Rumsey, 1991) และอาจจะถึง 100 เท่าในปลานิล

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1). กุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 3 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่ไม่มีประวัติการเกิดโรคระบาด ไม่แสดงอาการเกิดโรค ตัวใส คราบแข็งปกติ ปรับความเค็มน้ำจนได้ความเค็ม 20 ppt จากนั้นเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพการเลี้ยงในถังทดลอง และ คัดขนาดกุ้งที่แข็งแรงเพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

2) อาหารทดลอง

อัดเม็ดอาหารอาหารกุ้งกุลาดำชนิดจมน้ำ ซึ่งมีปลาป่น หัวและเปลือกกุ้งป่น ตับปลาหมึกป่น กากถั่วเหลือง แป้งสาลี โมโนแคลเซียมฟอสเฟต วิตามินและแร่ธาตุรวมเป็นวัตถุดิบ (ตารางที่ 4) กำหนดให้มีโปรตีน 38% ไขมัน 6% ความชื้นไม่เกิน 8% และพลังงาน 2,500 kcal/kg ขั้นตอนการผลิตนำวัตถุดิบทั้งหมดผสมด้วยเครื่องผสมอาหารให้เข้ากัน อัดเม็ดอาหารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มม. และมีความคงตัวในน้ำ 4-6 ชั่วโมง วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2000) (โปรตีน วิธี Kjedahl method ข้อ 976.06, ไขมัน วิธี Ether extract system ข้อ 920.39, เยื่อใย วิธี Filtered Glass Crucible Method ข้อ 978.10, เถ้า Muffle furnace combustion in 600°C ข้อ 942.05, และความชื้น วิธีDrying in Vacuo at 103-105 °C in Oven ข้อ 304.01 คำนวณค่า Nitrogen free extract : NFE =100-(%protein+%lipid+%ash+ %fiber+ %moisture) (NRC, 1993) และพลังงานที่ย่อยได้ (Digestible energy) =(%protein x 3.1)+(%lipid x 8.10)+(NFE x 2.5) (NRC,1983)

3) เบทาอีน

สารเบทาอีนที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำเป็นผลิตภัณฑ์ของ Culton Ltd. Finnsugar Bi Products, Helsinki Finland. ชื่อทางการค้า Finnstim หรือ Betafin ซึ่งสกัดจากหัวบีท (sugar beet) มีลักษณะเป็นผงสีขาวละเอียด ผสมในอาหารระดับต่างๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 4 ร่วมกับวัตถุดิบ

อื่นๆ แล้วอัดเม็ดอาหารกุ้งแบบชนิดเม็ดจมน้ำ อาหารทดลองเมื่อตากแห้งแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกแช่ในตู้เย็น – 10^0C สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

4) น้ำทะเลความเค็ม 20 ppt.

ใช้น้ำเค็มจากนาเกลือความเค็มสูง (100 ppt) มาเจือจางให้มีความเค็ม 20 ppt กำจัดเชื้อโรคด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปรคลอไรด์ ($Ca(OCl^-_2)$) ความเข้มข้น 40 ppm ให้อากาศเต็มที่เพื่อให้คลอรีนสลายตัวเป็นเวลา 2-3 วัน ก่อนนำน้ำมาใช้ทำการทดสอบการตกค้างคลอรีนโดยหยดสารละลายโปรแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) ในน้ำ ถ้ายังมีการตกค้างของคลอรีนน้ำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง กำจัดด้วยโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) 10 ppm แล้วใส่หัวทรายเพื่อเพิ่มออกซิเจน 2-3 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้

5) ถังทดลอง

ใช้ถังไฟเบอร์ขนาด 1 ตัน เติมน้ำเค็ม 20 ppt ปริมาตรน้ำ 700 ลิตร พร้อมให้อากาศในถังทดลอง ซึ่งใส่เศษอวนเพื่อเป็นที่ยึดเกาะและหลบซ่อนของกุ้ง

ตารางที่ 4 สูตรอาหารกุ้งกุลาดำที่เสริมเบทาอีนระดับระดับต่างๆ กันและผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารทดลอง

ส่วนประกอบวัตถุดิบ	ปริมาณเบทาอีนในสูตรอาหาร (%)		
	ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)
ปลาป่น	30.0	30.0	30.0
หัวกุ้งและเปลือกกุ้งป่น	10.0	10.0	10.0
กากถั่วเหลือง	33.0	33.0	33.0
ปลายข้าว	3.0	3.0	3.0
แป้งสาลี	20.28	19.28	18.28
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต	0.5	0.5	0.5
เลซิทิน	1.0	1.0	1.0
สารเหนียว	0.2	0.2	0.2
สารกันหืน	0.015	0.015	0.015
สารกันเชื้อรา	0.1	0.1	0.1
วิตามินและแร่ธาตุรวม*	2.0	2.0	2.0
เบทาอีน	0	1.0	2.0
รวม	**100**	**100**	**100**
ความชื้น	9.11	9.02	9.30
โปรตีน	38.21	38.14	38.26
ไขมัน	6.03	6.07	6.24
เยื่อใย	3.42	3.34	3.02
เถ้า	12.56	12.74	12.62
Nitrogen free extract (NFE)	30.68	30.69	30.56
พลังงานรวม (Kcal/100 g)	244.00	244.13	245.55

หมายเหตุ * วิตามินและแร่ธาตุรวม 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย วิตามินเอ 12 กรัม, วิตามิน บี 300 กรัม วิตามินเค 80 กรัม, วิตามินบี1 100 กรัม, วิตามินบี 2 80 กรัม, วิตามินบี 6 100 กรัม, วิตามินบี12 0.05 กรัม, กรดโฟลิค 20 กรัม, นิโคตินิค 100 กรัม, ไบโอทิน 1.5 กรัม, กรดแพนโทเธนิค 100 กรัม, อินโนซิทอล 15 กรัม, โคลีนคลอไรด์ 30 กรัม, วิตามินซี 500 กรัม, แมงกานีสซัลเฟต 0.02 กรัม, คอปเปอร์ซัลเฟต 0.035 กรัม, ซีลีเนียม 0.0002 กรัม

วิธีการ

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยแบ่งชุดทดลองออกเป็น 3 ชุดทดลอง แต่ละชุดทดลองมี 6 ซ้ำ อาหารทดลองมีการเสริมเบทาอีนดังนี้

ชุดทดลองที่ 1ชุดควบคุมไม่เสริมเบทาอีน (0 %)
ชุดทดลองที่ 2 เสริมเบทาอีน1 %
ชุดทดลองที่ 3 เสริมเบทาอีน 2 %

สภาวะการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

เลี้ยงกุ้งกุลาดำในถังไฟเบอร์ขนาด 1 ตัน ในน้ำเค็ม 20 ppt ปริมาตรน้ำ 700 ลิตร พร้อมให้อากาศในถังทดลอง ซึ่งใส่เศษอวนเพื่อเป็นที่ยึดเกาะและหลบซ่อนศัตรูของกุ้งขณะลอกคราบ คัดขนาดกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนัก 3-4 กรัม ปล่อยเลี้ยงในถังทดลองอัตราปล่อย 80 ตัวต่อตารางเมตร หรือ 90 ตัวต่อถัง

อัตราการให้อาหาร 5 , 4 และ 3 % ของน้ำหนักตัว สำหรับกุ้งขนาด 3 , 5 และ 10 กรัม ตามลำดับ วันละ 4 มื้อ (เวลา 8.00, 12.00, 16.00, 20.00 นาฬิกา) โดยใส่อาหารในกระชังขนาด 20x20 ซม. แบ่งให้มื้อละเท่ากัน หลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง เก็บอาหารที่เหลือในกระชังแล้วนำไปอบแห้งที่ 50 ^{0}C ในตู้อบเพื่อหักลบอาหารที่กุ้งกินในแต่ละวันบันทึกปริมาณการกินอาหารจริง

การจัดการคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยง ตลอดการทดลองให้อากาศ ปิดถังทดลองด้วยผ้าพลาสติกเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ พรางแสงเพื่อลดการรบกวนจากภายนอกซึ่งจะทำให้กุ้งเกิดความเครียดและกินอาหารน้อยลง ก่อนให้อาหารมื้อแรกทำการดูดตะกอนของเสียจากเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายภายในบ่อ เปลี่ยนถ่ายน้ำในถังทดลอง 20 % ของปริมาตรน้ำในถังทดลองทุกๆ สัปดาห์ แล้วเติมน้ำทะเลให้ครบ 700 ลิตร ตลอดการทดลองตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่จำเป็นทุก 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งกุลาดำ

1) ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

เมื่อเริ่มการทดลองสุ่มกุ้งชั่งน้ำหนักเริ่มต้น จำนวน 100 ตัว เพื่อหาค่าเฉลี่ยเริ่มต้นการทดลอง หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน สุ่มเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนัก และวัดขนาดกุ้งในถังทดลอง จำนวน 10 ตัวต่อถัง เพื่อเป็นข้อมูลด้านการเจริญเติบโตในแต่ละระยะ และปรับปริมาณการให้อาหารให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกุ้ง ข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณการเจริญเติบโตซึ่งเกิดจากการได้รับอาหารทดลอง ดัชนีสำหรับศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ในแต่ละชุดทดลองตามวิธีของ Brown (1957) ได้แก่

1.1) น้ำหนักที่เพิ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Weight gain. WG) : กรัม
= น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย – น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น

1.2) น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน (Average daily gain :ADG) : กรัม/ตัว/วัน

$$= \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย - น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาทดลอง(วัน)}}$$

1.3) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate : SGR) : %

$$= \ln\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย}}{\text{ระยะเวลาทดลอง (วัน)}} - \ln\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาทดลอง (วัน)}} \times 100$$

1.4) อัตรารอด (Survival rate : SV) : %

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

2) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งกุลาดำ

การให้อาหารให้ในอัตราที่เหมาะสมกับน้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ โดยแบ่งอาหารให้วันละ 4 มื้อในแต่ละวัน โดยใส่ในกระชัง หลังการให้อาหาร 1 ชั่วโมง เก็บอาหารที่เหลือแล้วนำไปอบให้

แห้งในตู้อบ 50 ^{0}C แล้วชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือเพื่อหาปริมาณการกินอาหารที่แท้จริงในแต่ละครั้ง และข้อมูลที่ได้จากการทดลองใช้เป็นดัชนีสำหรับศึกษาประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารทดลองที่มีเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน คำนวณตามวิธีของ Halver (1989) ได้แก่

2.1) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน (Protein efficiency ratio :PER)

$$= \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่ม}}{\text{ปริมาณโปรตีนที่กิน(แห้ง)}}$$

2.2) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food conversion ratio : FCR)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น}}$$

การทดลองที่ 2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

การเก็บข้อมูลการทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำเริ่มต้นการทดลองและเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

การเตรียมตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งกุลาดำเพื่อการวิเคราะห์

สุ่มตัวอย่างกุ้งจากถังทดลองถังละ 3 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดทันทีโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. ด้วยเข็มเบอร์ 24 G เจาะเลือดบริเวณข้อต่อของขาเดินคู่ที่ 3 จาก ventral sinus เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยมีวิธีการดังนี้

1) วิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนต่างๆ ในน้ำเลือด (Blood electrolyte)

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งแต่ละตัวไปวิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ และอิออนต่างๆ ในเลือดกุ้ง โดยดูดเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายโซเดียมซิเตรท 1% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำให้เม็ดเลือดแตกด้วยคลื่นความถี่สูง (sonicator ที่ แอมพิจูด 30 เวลา 5 นาที) ไปวิเคราะห์ทันที เพื่อหาวัดค่าออสโมลาริตี้ด้วยเครื่อง Osmometer (The advanced osmometer :3D3) และวิเคราะห์ค่าอิออน

ต่างๆ (blood electrolyte) ได้แก่ Na^+ K^+ และ Cl^- โดยเครื่องวิเคราะห์ Eletrolyte analyzer (Ciba corning: 644)

2) องค์ประกอบทางเคมีของเลือดกุ้งกุลาดำ

การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียม hemocyte lysate (HLS)

โดยเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 0.5 มล. ซึ่งมีสารละลาย 10 % sodium cetrate ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199 (modified M-199) pH 7.4 เป็นสารป้องก้นเลือดแข็งตัว (anticoagulant) จนได้ปริมาตรครบ 1 มล. จากนั้นจึงทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ ดูดส่วนใสทิ้งไปและนำเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดที่รวบรวมได้จากกุ้งแต่ละตัว ล้างด้วย K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonicator) ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C จึงนำไปแยกเฉพาะสารละลายส่วนใสซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด ข้อ 2.1 และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ข้อ 3.3

2.1) ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (protein in haemolymph) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Lowry *et al*., (1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ นำ HLS มา 0.01 มล. ผสมน้ำกลั่น 0.09 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายอัลคาไลด์ คอปเปอร์ (alkaline copper solution) 1.0 มล. เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารประกอบโพลิน (folin reagent) 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้สารประกอบโฟลีนทำปฏิกิริยากับโปรตีนในเลือด แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเทียบกับสารละลายมาตรฐานของอัลบูมิน

2.2) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด (blood glucose) ดัดแปลงตามวิธีของ Wedemcyer *et al.,* (1997)

ใช้กระบอกฉีดยาดูดเลือดกุ้งโดยไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัว ให้ได้ปริมาณ 0.2 มล. ใส่หลอดพลาสติกที่มีสารละลาย TCA 3% 0.9 มล. เติมน้ำเลือด 0.1 มล ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวิเคราะห์ทันที. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4^0C นาน 2 นาที แยกส่วนใส 0.5 มล. เติมในหลอดทดลองที่มี color reagent 4.5 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปแช่น้ำเดือด 8 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เทียบกับสารละลาย Trichloro acetic acid (TCA) 3% ปริมาตร 0.5 มล. แทนสารละลายตัวอย่าง (blank) แล้วนำปริมาณกลูโคสในเลือดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3) ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในแต่ละซ้ำๆ ละ 3 ตัว เลือดกุ้งจาก ventral sinus ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 24 G ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด อัตราส่วนของเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัว 1:2 เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte count) การจับสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอสออกซิเดส phenoloxides activity) ตามวิธีการ ดังนี้

3.1) ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte count)

วิธีนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งตามวิธีการของ กิจการ และคณะ (2543ก) โดยนำเลือดที่เจาะได้จากกุ้งกุลาดำแต่ละตัวมาเจือจางในอัตรา 1:10 ด้วยสารละลายไตรแพนบลู (0.15 % trypanblue ใน 2.6 % NaCl) ผสมให้เข้ากัน หยดเลือดที่จะนับจำนวนเม็ดเลือดบนสไลด์นับเม็ดเลือดหรือฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacy tometer) นับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้ว คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นปริมาณ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากสูตร

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง x ยาว สูง

= 1 มม. x 1 มม. x 0.25 มม.

= 0.1 ลบ.มม^3

จำนวนแซลล์เม็ดเลือด / ลบ.มม^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

3.2) การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) (ดัดแปลงจาก กิจการ และคณะ 2543ง; Itami *et.al*., 1994)

เก็บเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำประมาณ 1 มล. ผสมกับ K-199 ที่มีค่า pH 7.4 ซึ่งเติมแอลซิสเตอีน 3 % เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวจนได้ปริมาณครบ 1.5 มล. นำสารละลายเลือดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm เป็นเวลา10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนใสทิ้งไป ตะกอนที่ได้เติม shrimp saline เขย่าให้สารละลายเข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างตะกอน นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันนำมา 50 ไมโครลิตร ใส่ hemocyto meter นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด ควรมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดประมาณ $1x10^6$ เซลล์/มล. เม็ดเลือดที่เหลือไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการศึกษาความว่องไวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมซึ่งมีวิธีการโดยสรุปดังนี้

การศึกษาขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด โดยนำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ ซึ่งมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ $1.0x10^6$ เซลล์/มล. จำนวน 0.2 มล. เลี้ยงบน cover slip 2 นาที และหยดสารละลาย Heat-killed yeast $1.0x10^8$ เม็ด/มล. จำนวน 2 มล. เพื่อให้เม็ดเลือดเกาะไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาดองด้วย methanal 70 % ทิ้งให้แห้ง 20 นาที และย้อมสี grimsa stain นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นทิ้งให้แห้งในที่มืดและส่องดูในกล้องจุลทรรศน์นับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำประมาณ 400 เซลล์/ตัวอย่างกุ้ง 1 ตัว นำข้อมูลจำนวนเม็ดเลือดที่จับกินเซลล์ยีสต์ที่ได้มาคำนวณหาค่า เปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอมดังนี้

$$\text{การจับกินสิ่งแปลกปลอม (\%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดกุ้งที่จับกินเซลล์ยีสต์ x 100}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

3.3) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) วิธีดัดแปลงจาก Smith and Soderhall (1983), กิจการ และคณะ (2543ง)

นำสารละลาย HLS ที่มีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมาวิเคราะห์ โดยใช้ L-DOPA (L-dihydroxyphelylalanine) เป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยา ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พร้อมกับสารละลาย 0.1% trypsin ใน cacodylate buffer 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA 4 มก./มล.) 500

ไมโครลิตร แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ ช่วง 2 นาที จนเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (สารละลายมีสีดำค่าดูดกลืนแสงลดลง)

นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย/นาที (Unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามิน (dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001/ นาที/มก. ของโปรตีนในสารละลาย โดยกำหนดค่าดังนี้

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta \, OD_{490} / \text{นาที} / \text{มก.โปรตีน}$$

การทดลองที่ 3 ศึกษาความทนทาน องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

1) ทดสอบความทนทาน องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็ม

1.1) วิธีทดสอบ เตรียมตู้กระจกขนาดความจุ 20 ลิตร ที่ความเค็ม 2 ระดับ คือ 0 และ 40 ppt ให้อากาศตลอดการทดลองนำกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยง เป็นเวลา 3 เดือน ใส่ในตู้กระจก ตู้ละ 10 ตัว ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลง พฤติกรรม และนับจำนวนกุ้งที่ตาย (ไม่มีการตอบสนองจากการเขี่ยด้วยแท่งแก้วถือว่าตาย) ทุกๆ 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับพร้อมเก็บกุ้งที่ตายออกทุกๆ ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์อัตราการตายเปรียบเทียบกันในแต่ละชุดทดลอง

1.2) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม 2 ระดับ ปล่อยกุ้งกุลาดำเช่นเดียวกับข้อ 1.1 จับเวลาเพื่อเก็บเลือดกุ้งทุก 1, 3, 6, และ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total hemocytes count), ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Protein in haemolymph), ปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose), ค่าออสโมลาริตี้ (Osmolarity) อิออนต่างๆ ในน้ำเลือด (serum electrolyte), การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ของกุ้งกุลาดำ ตามรายละเอียดวิธีวิเคราะห์ในการทดลองที่ 2

2) ทดสอบความทนทาน องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันต่อสภาพการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (pH 5.5)

2.1) ทำการทดลองในตู้กระจกขนาดความจุ 20 ลิตร ที่ความเค็ม 20 ppt ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำจากปกติ pH 7.5-8.0 เป็น pH 5.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดคลอริก HCL 1N. ให้อากาศตลอดการทดลอง สังเกตการเปลี่ยนแปลง พฤติกรรม และนับจำนวนกุ้งที่ตาย ทุกๆ 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับพร้อมเก็บกุ้งที่ตายออกทุกๆ ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์อัตราการตายเปรียบเทียบกันในแต่ละชุดทดลอง

2.2) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง ปล่อยกุ้งกุลาดำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 จับเวลาเพื่อเก็บเลือดกุ้งทุก 1, 3, 6, และ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total hemocytes count), ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Protein in haemolymph), ปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose), ค่าออสโมลาริตี้ (Osmolarity) อิออนต่างๆ ในน้ำเลือด (serum electrolyte), การจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ของกุ้งกุลาดำ ตามรายละเอียดวิธีวิเคราะห์ในการทดลองที่ 2

3. การวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

นำข้อมูลการทดลองวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดจากการทดลองทางสถิติ ความแตกต่างของข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองแต่ละชุดทดลองเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ด้วยวิธี Duncan’s multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ผลและวิจารณ์

ผลการทดลอง

การศึกษาผลของการเสริมเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร ในอัตราส่วนต่างกันคือ ชุดทดลองที่ 1 อาหารไม่เสริมสารเบทาอีนเป็นชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 2 อาหารเสริมสารเบทาอีน 1 % และชุดทดลองที่ 3 อาหารเสริมเบทาอีน2% โดยนำมาเลี้ยงกุ้งซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 4.01 กรัม เป็นระยะเวลา 3 เดือน ผลการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของเบทาอีนต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งกุลาดำ

1) การเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 5)

การเจริญเติบโตโดยน้ำหนักของกุ้งกุลาดำ หลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวันของกุ้งกุลาดำเดือนที่ 1 และ 2 ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำแตกต่างกัน ($p<0.05$) กล่าวคือ กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีน้ำหนักเฉลี่ย 11.98±0.38 และ 11.65±0.28 กรัม มากกว่าชุดควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ย 10.36±0.32 กรัม ส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวันของกุ้งทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งกุลาดำตลอดการทดลอง พบว่าทุกช่วงอายุไม่ต่างกัน ($p>0.05$) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยสูงสุด (1.85±0.17 %) รองลงมาชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1% (1.84±0.20 %) และ อาหารผสมเบทาอีน 2% (1.68±0.78 %) ตามลำดับ เดือนที่ 2 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งกุลาดำลดลงทั้ง 3 ชุด มีค่าเฉลี่ย 1.23±0.06, 1.22±0.18 และ 1.07±0.48% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของกุ้งในเดือนที่ 2 ช้ากว่า เดือนที่ 1 และสิ้นสุดการทดลอง 3 เดือน พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2 % มีค่าเฉลี่ย 1.79±0.10 และ 1.62±0.06% แตกต่างกับชุดควบคุม (1.08±0.07 %) ($p<0.05$)

อัตรารอดของกุ้งกุลาดำในเดือนที่ 1 และ 2 พบว่ามีอัตรารอดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อัตรารอดของกุ้ง เดือนที่ 1 ทั้ง 3 ชุดทดลองมีอัตรารอดเฉลี่ย 90.63±3.15 ถึง 95.83±0.88 % เดือนที่ 2 พบว่ามีอัตรารอดเฉลี่ย 73.47±5.86 ถึง 78.57±3.73 % อัตรารอดของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเดือนที่ 3 กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2 % มีอัตรารอดมากกว่าชุดควบคุม($p<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 50.67±6.62 % 64.33±5.39 %และ 72.00±2.55 % ตามลำดับ

ตารางที่ 5 การเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน (ค่าเฉลี่ย±SE)

เวลา (เดือน)	ดัชนี	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
0	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	4.01 ±0.34	4.01 ±0.34	4.01 ±0.34	
1	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)	6.72±0.37	7.05±0.37	7.32±0.19	0.4415
2		8.21±0.17	8.44±0.38	8.44±0.35	0.8602
3		10.36±0.32^{b}	11.98±0.38^{a}	11.65±0.28^{a}	0.0108
1	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)	2.88±0.33	3.00±0.36	2.90±0.16	0.9549
2		4.29±0.30	4.39±0.43	4.02±0.26	0.7372
3		6.43±0.42	7.88±0.43	7.24±0.29	0.0619
1	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน	0.10±0.01	0.10±0.01	0.09±0.01	0.9600
2	(กรัม/ตัว/วัน)	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.00	0.7382
3		0.07±0.01	0.09±0.01	0.08±0.00	0.0682
1	อัตราการเจริญเติบโต	1.85±0.17	1.84±0.20	1.68±0.78	0.7113
2	จำเพาะ (%)	1.23±0.06	1.22±0.18	1.07±0.48	0.2231
3		1.08±0.07^{b}	1.79±0.10^{a}	1.62±0.06^{a}	0.0004
1	อัตรารอด (%)	90.63±3.15	95.83±0.88	93.33±2.33	0.4646
2		73.42±3.55	75.71±3.36	78.57±3.73	0.6280
3		50.67±6.62^{b}	64.33±5.39^{ab}	72.00±2.55^{a}	0.0366

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

2) ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากเบทาอีนในอาหารของกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 6)

ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน พบว่า ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากโปรตีนของกุ้งกุลาดำตลอดการทดลอง 3 เดือน ไม่แตกต่างๆ กัน ($p>0.05$) ในเดือนที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 1.23±0.15, 1.36±0.19 และ 1.15±0.07 ตามลำดับ ส่วนในเดือนที่ 2 พบว่ามีค่าเฉลี่ยลดลงโดยมีค่าเฉลี่ย 0.81±0.07, 0.88±0.09 และ0.77±0.04 ตามลำดับ สิ้นสุดการทดลอง 3 เดือน อัตรารอดของกุ้งกุลาดำมีค่าเฉลี่ย 0.71±0.03, 0.87±0.05 และ 0.79±0.05ในกุ้งชุดควบคุม ชุดที่ 2 อาหารเสริมเบทาอีน 1% และชุดที่ 3 อาหารเสริมเบทาอีน 2% ตามลำดับ

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งกุลาดำตลอดการทดลอง พบว่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยในเดือนที่ 1 ค่าเฉลี่ย 2.19±0.37, 2.09±0.31 และ 2.24±0.13 ตามลำดับ เดือนที่ 2 พบว่ามีค่าเฉลี่ย 3.23±0.34, 3.06±0.32 และ 3.38±0.14 ตามลำดับ ส่วนในเดือนที่ 3 มีค่าเฉลี่ย 3.62±0.19, 2.97±0.19 และ 2.82±0.41 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งกุลาดำซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนทั้ง 3 ระดับไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กันของกุ้งกุลาดำ (ค่าเฉลี่ย± SE)

เวลา (เดือน)	ดัชนี	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
1	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน	1.23±0.15	1.36±0.18	1.15±0.07	0.5992
2	(PER)	0.81±0.07	0.88±0.09	0.77±0.04	0.5475
3		0.71±0.03	0.87±0.05	0.79±0.05	0.0925
1	อัตราการเปลี่ยนอาหาร	2.19±0.37	2.09±0.31	2.24±0.13	0.9296
2	เป็นเนื้อ (FCR)	3.23±0.34	3.06±0.32	3.38±0.14	0.7094
3		3.62±0.19	2.97±0.19	2.82±0.41	0.1496

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การทดลองที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

1) ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และ อิออนในน้ำเลือด (Blood electrolyte) (ตารางที่ 7)

ผลของเบทาอีนต่อการควบคุมระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน ผลการทดลอง พบว่า ระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกันในเดือนที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 480±13.67 ถึง 509±9.02 m. Osmole/H_2O kg ส่วนเดือนที่ 2 ระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% มีเฉลี่ยค่าออสโมลาริตี้ต่ำกว่าชุดอื่นๆ มีค่าเฉลี่ย 386±44.19 ถึง 486±95.46 m. Osmole/H_2O kg ส่วนค่าออสโมลาริตี้ในดือนที่ 3 พบว่ามีค่าแตกต่างกัน ($p<0.05$) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดเสริมเบทาอีน 1 % มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 496±4.73 m. Osmole/H_2O kg มากกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุมและอาหารเสริมเบทาอีน 2 % ($p<0.05$)

ปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลอง ในเดือนที่ 1 และ 2 แต่ละชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในเดือนที่ 3 ซึ่งค่าเฉลี่ยของปริมาณโซเดียมในน้ำเลือดลดลง ชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ย 378±5.37, 384±5.08 และ 352±7.85 m. mole/l ตามลำดับ ซึ่งอาหารชุดควบคุมกับอาหารเสริมเบทาอีน 1% ไม่แตกต่างกันมีค่ามากกว่าในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารอาหารเสริมเบทาอีน 2% ($p.>0.05$)

ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองซึ่งเสริมสารเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน พบว่า ในเดือนที่ 1 โปแตสเซียมมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน($p<0.05$) โดยกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2 % มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 7.75±0.77 m. mole/l ไม่แตกต่างกับกุ้งซึ่งเสริมเบทาอีน 1% (5.96±0.30 m. mole/l) แต่แตกต่างกับชุดควบคุม($p<0.05$) ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 4.63±0.84 m. mole/l ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งในเดือนที่ 2 ทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 5.10±0.80 ถึง 5.82±0.88 m. mole/l เช่นเดียวกับในเดือนที่ 3 แต่ปริมาณของโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งมีเพิ่มขึ้นทั้ง 3 ชุดทดลองมีค่าเฉลี่ย 7.11±0.21ถึง 7.67±±.64 m. mole/ l ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณของคลอไรด์ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนในระดับต่าง ๆ กัน พบว่าในเดือนที่ 1 ปริมาณของคอไรด์ในน้ำเลือดแตกต่างกัน ($p<0.05$) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยง

ด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีปริมาณของคลอไรด์เฉลี่ย 356±51.49 ถึง 364 ±18.71 m. mole/l มากกว่าในน้ำเลือดกุ้งชุดควบคุม ($p<0.05$) ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 231±0.35 m. mole/l และในเดือนที่ 2 และ 3 ปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งมีค่าเฉลี่ย ทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ตารางที่ 7 ออสโมลาริตี้ (osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (eletrolyte) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน (ค่าเฉลี่ย±SE)

เวลา (เดือน)	ดัชนี	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
1	ออสโมลาริตี้	491±9.08	480±13.67	509±9.02	0.2022
2	(m. Osmole/H_2O kg)	486±95.46^{a}	487±59.60^{a}	386±44.19^{b}	0.0039
3		461±10.93^{ab}	496 ±4.73^{a}	459±7.35^{b}	0.0498
1	โซเดียม :Na^{+}	397±40.33	489±20.14	484±34.19	0.1173
2	(m. mole/l)	465±34.88	489±27.37	483±25.96	0.8307
3		378±5.37^{a}	384±5.08^{a}	352 ±7.85^{b}	0.0029
1	โปแตสเซียม :K^{+}	4.63±0.84^{b}	5.96±0.30^{ab}	7.91±0.77^{a}	0.0170
2	(m. mole/l)	5.10±0.80	5.24±0.20	5.82±0.88	0.7453
3		7.11±0.21	7.26±0.27	7.67±±.64	0.6246
1	คลอไรด์ :Cl^{-}	231±0.35^{b}	356±51.49^{a}	364 ±18.71^{a}	0.0430
2	(m. mole/l)	266±18.17	235±29.96	243±17.78	0.8670
3		261±8.48	290±9.40	269±22.15	0.3852

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2) ผลของเบทาอีนต่อองค์ประกอบทางเคมีของเลือดกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 8)

ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเสริมสารเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน ผลการทดลองในเดือนที่ 1 พบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดไม่แตกต่างกัน ($p.>0.05$) แต่หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือนปริมาณของโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น โดยกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 1.98±0.18 มก.% มากกว่าชุดควบคุม และอาหารเสริมเบทาอีน 2 % เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 3 เดือน พบว่าปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำในทุกชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารซึ่งมีระดับเบทาอีนต่างๆ กัน พบว่าปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดกุ้ง ในเดือนที่ 1 มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 33.21±7.12 ถึง 47.59±0.98 มก.% เดือนที่ 2 ปริมาณของน้ำตาลในน้ำเลือดเพิ่มขึ้นตามขนาดของกุ้ง ในชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยมากกว่าในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2% แต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อสิ้นสุดการทดลองปริมาณน้ำตาลในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้น โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% สูงกว่าชุดควบคุม ($P<0.05$)

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน (ค่าเฉลี่ย±SE)

เวลา (เดือน)	ดัชนี	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
1	ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (มก.%)	1.70±0.37^{a}	0.84±0.18^{b}	1.00±0.18^{ab}	0.0319
2		1.44±0.26^{ab}	1.98±0.18^{a}	0.99±0.16^{b}	0.0394
3		1.63 ±0.07	1.89±0.06	1.79±0.05	0.8441
1	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือด (มก.%)	37.86± 5.62	33.21±7.12	47.59 ±0.98	0.4663
2		62.67 ±5.83	57.33±10.63	46.94±11.58	0.5286
3		63.05±12.16	91.76 ±6.87	76.57±12.99	0.3711

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

3) ผลของเบทาอีนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

ผลของเบทาอีนต่อระบบภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน ซึ่งได้แก่ ปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมด การจับกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ที่พบในน้ำเลือด ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 ดังนี้

ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารซึ่งผสมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน ในเดือนที่ 1 ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 4.15±0.26 ถึง 4.19±0.19 x 10^{5}

เซลล์/มล. ในเดือนที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกชุดทดลองมีค่าเฉลี่ย 11.37±1.86 x 10^5, 12.23±2.85 x 10^5 และ 13.50±2.08 x 10^5 เซลล์/มล. ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำเลือดในของกุ้งกุลาดำในเดือนที่ 3 พบว่าปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมดลดลง แต่ละชุดทดลองมีปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดแตกต่างกัน ($p<0.05$) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 5.36±0.80 x 10^5 เซลล์/มล. ชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ย 4.32±0.23 x 10^5 เซลล์/มล. และอาหารเสริมเบทาอีน 2% มีค่าเฉลี่ย 4.06±0.40 x 10^5 เซลล์/มล. ตามลำดับ

การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Phagocytic activity) หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารทดลองที่ผสมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน พบว่า เดือนที่ 1 การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าเฉลี่ย 9.93±0.91, 8.49±0.46 และ 10.04±1.43% ตามลำดับ เดือนที่ 2 การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเพิ่มขึ้นจากเดือนที่ 1 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดมากกว่าชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)โดยในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน2% มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 20.09±2.20% รองลงมาอาหารเสริมเบทาอีน 1% (18.18±2.40%) และชุดควบคุม (17.43±2.43%) ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเดือนที่ 3 ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งมีค่าลดลงตามปริมาณของเม็ดเลือดกุ้งทั้งหมด ผลการทดสอบพบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระหว่าง 1 และ 2% ไม่แตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ย 16.83±1.72% และ 12.76±1.11% แต่อาหารที่ผสมเบทาอีน 1% กับชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน (11.41±0.83%) ($p<0.05$)

การทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่มีในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ (Phenoloxidaes activity) หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน พบว่า เดือนที่ 1 ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของ กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ย 127.66±20.64 unit/min/mg protein แตกต่างกัน ($p<0.05$) กับในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 2% และชุดควบคุม ในเดือนที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) กุ้งกุลาดำในชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยสูงสุด ส่วนอาหารผสมเบทาอิน1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันในเดือนที่ 3 พบว่า การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำลดลงตามปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมด โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ย 132.82 ±6.37 และ 120.70 ±8.85 unit/min/mg protein สูงกว่าชุดควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยเพียง 104.26 ±5.63 unit/min/mg protein ($p<0.05$)

ตารางที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count) การจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน (ค่าเฉลี่ย±SE)

เวลา (เดือน)	ดัชนี	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
1	ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด	4.17±0.66	4.19±0.19	4.15±0.26	0.9978
2	(x 10^5 เซลล์/มล.)	11.37±1.86	12.34±2.85	13.50±2.08	0.8097
3		4.32±0.23 ^{ab}	5.36±0.80 ^{a}	4.06±0.40 ^{b}	0.0209
1	การจับกินสิ่งแปลกปลอม	9.93±0.91	8.49±0.46	10.04±1.43	0.4984
2	(%)	17.43±2.43	18.18±2.40	20.09±1.02	0.6570
3		11.41±0.83^{b}	16.82±1.72^{a}	12.76±1.11^{ab}	0.0153
1	เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส	85.45±14.32^{b}	127.66±20.64^{a}	66.52±16.63^{b}	0.0314
2	(unit/min/mg protein)	173.88±17.59	144.00±17.81	166.55±51.76	0.1064
3		104.26±5.63^{b}	132.83±6.37^{a}	120.70±8.85^{a}	0.0290

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

การทดลองที่ 3 ความทนทาน องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

3.1 ความทนทานของกุ้งกุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม

3.1.1 ความทนทนของกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มปกติ (20 ppt) เป็นน้ำเค็มสูง (40 ppt) และในน้ำจืด (0 ppt) การทดสอบความทนทานของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กันเมื่อครบ 90 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 ดังนี้

อัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มปกติ เป็นน้ำเค็มสูง (40 ppt) ทันที ผลการทดลอง พบว่า ความเค็ม 40 ppt หลังปล่อยกุ้งกุลาดำในตู้ทดสอบความเค็ม 1 ชั่วโมง กุ้งจะแสดงอาการกระวนกระวายว่ายน้ำตลอดเวลา เริ่มมีกุ้งตายในชุดควบคุม 10 % ชั่วโมงที่ 1 ถึง 2 กุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2 % เริ่มมีอัตราการตายสะสม 7% และในชั่วโมงที่ 2-3 มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$) กล่าวคือ กุ้งกุลาดำในกุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 % ยังไม่มีการตายซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบทาอีน 1 % มีความทนทานต่อความเค็มได้ดี ชั่วโมงที่ 6 ทุกชุดทดลองมีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้น ในกุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 % เริ่มตายสะสมเป็น 3 % ขณะที่กุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2 % มีการตายสะสม 13% หลังจากทดสอบความทนทาน 6 ชั่วโมง ดังนั้นการปรับตัวในน้ำเค็มสูงได้ดี ยกเว้นกุ้งที่อ่อนแอหลังการลอกคราบมีผลทำให้กุ้งตายได้ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 กุ้งในชุดควบคุมและกุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2 % จะมีการตายเพิ่มอีก 13 และ 23 % มากกว่ากุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 % ซึ่งมีการตายสะสม 3 % ($p<0.05$) และเมื่อครบ 24 ชั่วโมง อัตราการตายสะสมของกุ้งเฉลี่ย 17 - 30 % ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

อัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำในน้ำจืด (0 ppt) ทันที พบว่าหลังจากปล่อยกุ้งในตู้ทดสอบจะพบว่า กุ้งแสดงอาการกระวนกระวาย มีการแลกเปลี่ยนน้ำเข้าออกผ่านทางเหงือกตลอดเวลา เพื่อควบคุมความเข้มข้นของเกลือแร่ต่างๆ ในน้ำเลือดกับน้ำที่อาศัยอยู่ให้สมดุลกัน กุ้งเริ่มอ่อนแอเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น กุ้งเริ่มตายทันทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง 3 กุ้งในชุดความคุมกับกุ้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2 % เริ่มมีกุ้งตาย 10 และ 3% อัตราการตายสะสมในชั่วโมงที่ 3 เฉลี่ย 33 23และ 27 % ตามลำดับ และทุกชุดทดลองในชั่วโมงที่ 12 อัตราการตายสะสม 100% การ

ทดสอบการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดกุ้งจะสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำในระยะหนึ่งเท่านั้น โดยกุ้งจะแสดงอาการอ่อนแออย่างชัดเจนเมื่อระยะเวลาผ่านไปในชั่วโมงที่ 4 ถึง 6 มีการตายสะสมมากขึ้น กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% สามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำได้นานกว่าชุดควบคุมและอาหารเสริมเบทาอีน 2 % แต่อัตราการตายสะสมของกุ้งในน้ำจืดทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ตารางที่ 10 อัตราการตายสะสม (%) ของกุ้งกุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม 40 และ 0 ppt

ระยะเวลา	ความเค็ม 40 ppt				ความเค็ม 0 ppt			
(ชั่วโมง)	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	p-Value	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	p-Value
1	10	0	0	.	10^{b}	0^{a}	3^{b}	0.027
2	10^{b}	0^{a}	7^{b}	0.027	17	10	13	0.296
3	10^{b}	0^{a}	7^{b}	0.027	33	23	27	0.501
6	10	3	13	0.317	67	67	73	0.661
12	13^{b}	3^{a}	23^{b}	0.016	100	97	100	0.422
24	20	17	30	0.111	100	100	100	.

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

3.1.2 องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน เป็นเวลา 90 วันต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม ดังนี้

3.1.2.1 การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็น 40 ppt ต่อระดับออสโมลาริตี้และระดับอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 11)

ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มต่อระดับออสโมลาริตี้ พบว่า กุ้งกุลาดำจะมีการแลกเปลี่ยนอิออนต่างๆ จากน้ำที่อาศัยอยู่เข้าสู่ร่างกายเพื่อรักษาสมดุลในของของเหลวในร่างกายให้เท่ากับสภาวะแวดล้อมภายนอก ระดับออสโมลาริตี้ ในน้ำเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงแรกที่ปล่อยกุ้งลงน้ำเค็ม 40 ppt ในชั่วโมงที่ 1 และ 3 กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2 % มีการเปลี่ยนแปลงของออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในชุดควบคุม ($p<0.05$) โดยชั่วโมง

ที่ 3 มีค่าเฉลี่ย 1,018 ±49.50 และ 909±45.21 m. Osmole/H_2O kg แตกต่างกับชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ย 640±5.56 m. Osmole/H_2O kg ($p<0.05$) หลังชั่วโมงที่ 6 ระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งทุกชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) กุ้งสามารถปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ และเมื่อครบ 12 ชั่วโมง ระดับของออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งที่เลี้ยงจากอาหารผสมเบทาอีน1-2% มีค่าเฉลี่ยไม่ต่างกัน($p>0.05$) (1,050±5.52 และ 885 ±4.54 m. Osmole/H_2O kg) แต่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% ค่าเฉลี่ยแตกต่างกับชุดควบคุม (766±13.53 m. Osmole/H_2O kg) ($p<0.05$)

ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็น 40 ppt ต่อระดับของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อวัดปริมาณของอิออนต่างๆ พบว่า มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทันทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 สูงกว่าในน้ำเลือดกุ้งที่อยู่ในสภาวะปกติ (20 ppt) (ตารางที่ 7) ปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดในชั่วโมงที่ 1 และ 3 มีค่าแตกต่างกัน ($p<0.05$) ทั้ง 3 ชุดทดลอง ในกุ้งที่เสริมเบทาอีนในอาหาร 1% มีค่าเฉลี่ยสูงสุด (533 ±4.50 m. mole/l) รองลงมาชุดที่เสริมเบทาอีน 2% (481±16.00 m. mole/l) และชุดควบคุม (426±6.50 m. mole) แต่ในชั่วโมงที่ 6 พบว่ามีค่าเฉลี่ยลดลงไม่แตกต่างกัน($p>0.05$) และเมื่อครบ 12 ชั่วโมง การปรับตัวของกุ้งในน้ำเค็ม 40 ppt ปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2% ไม่ต่างกัน($p>0.05$) และทั้ง 2 ชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกับชุดควบคุม($p<0.05$)

ปริมาณของโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็น 40 ppt พบว่า มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ ชั่วโมงที่ 1 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 9.18 ±0.51 ถึง 10.23 ±0.00 m. mole/l และหลังจากระยะเวลาผ่านไป ชั่วโมงที่ 3 และ 6 ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งเพิ่มขึ้นในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกับชุดควบคุม ($p<0.05$) และเมื่อครบ 12 ชั่วโมง กุ้งมีการปรับตัวในน้ำได้ดี ปริมาณของโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณของคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็น 40 ppt พบว่า ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 1 และ 3 มีปริมาณของคลอไรด์ในน้ำเลือดทุกชุดทดลองแตกต่างกัน ($p<0.05$) แต่หลังจากปล่อยกุ้งผ่านไป 3 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ยปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดมีค่าลดลง กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ย 550±19.12 m. mole/l ชุดที่เสริมเบทาอีน 2% (507±0.00 m. mole/l) และชุดควบคุม (328±4.50 m. mole/l) การปรับตัวในน้ำเค็มสูงทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนคลอไรด์ภายในเซลล์เม็ด

เลือด เพื่อให้ความเข้มข้นของคลอไรด์ภายในและภายนอกเซลล์เม็ดเกิดสมดุลกัน จึงทำให้คลอไรด์ในเลือดลดลง ในชั่วโมงที่ 6 พบว่าปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำชุดควบคุมกับชุดที่เสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ยไม่ต่างกัน แต่ต่ำกว่าชุดที่เสริมเบทาอีน 2% ($p<0.05$) เมื่อครบ 12 ชั่วโมง ปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดจะเพิ่มขึ้นทุกชุดทดลอง ปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2 % มากกว่าชุดทดลองอื่นๆ ($p<0.05$)

ตารางที่ 11 ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (Eletrolyte)ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (40 ppt) (ค่าเฉลี่ย±SE)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
	(ชั่วโมง)	ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
ออสโมลาริตี้	1	714±24.00^{b}	845±1.51^{a}	863±28.50^{a}	0.0302
(m Osmole/H_2O kg)	3	640±5.56^{b}	1018±49.5^{a}	909±45.21^{a}	0.0217
	6	753 ±27.52	877±25.00	783±45.00	0.107
	12	766±13.53^{b}	1050±5.52^{a}	885±4.54^{ab}	0.038
โซเดียม :Na^{+}	1	422 ±1.50^{c}	537 ±6.00^{a}	509 ±7.00^{b}	0.001
(m mole/L)	3	426 ±6.50^{c}	535 ±4.50^{a}	481±16.00^{b}	0.004
	6	387 ±5.50	402 ±0.00	377 ±5.00	0.058
	12	404 ±6.50^{b}	521±9.50^{a}	511±4.50^{a}	0.002
โปแตสเซี่ยม :K^{+}	1	10.32 ±0.69	10.23 ±0.00	9.18 ±0.51	0.291
(m mole/L)	3	8.12 ±0.50^{c}	14.7 ±0.07^{a}	12.52±0.05^{b}	0.001
	6	8.71±0.00^{b}	10.43±0.07^{a}	9.71 ±0.34^{a}	0.001
	12	9.63 ±0.99	10.08 ±0.72	12.69 ±1.21	0.220
คลอไรด์ :Cl^{-}	1	408 ±3.03^{c}	589±2.50^{a}	526±110.50^{b}	0.001
(m mole/L)	3	328 ±4.50^{c}	550±19.12^{a}	507±0.00^{b}	0.000
	6	227 ±5.00^{b}	230±2.00^{b}	248 ±0.00^{a}	0.038
	12	381 ±6.50^{c}	407±4.11^{b}	456±2.51^{a}	.004

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

3.1.2.3. ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็น 40 ppt ต่อองค์ประกอบทางเคมี และระบบภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 ดังนี้

ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดหลังเปลี่ยนแปลงความเค็มเป็น 40 ppt ทันที พบว่า มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงทันทีในชั่วโมงที่ 1 และ 3 โดยกุ้งกุลาดำชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยมากกว่าในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2% หลังทดสอบความทนทานชั่วโมง 6 เป็นต้นไป พบว่ากุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลองกุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวในน้ำได้ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณน้ำตาลในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มทันที พบว่าลดลงทันทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 เป็นต้นไป ชั่วโมงที่ 3 พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดทั้ง 3 ชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$) กุ้งในที่เสริมเบทาอีน 1 และ 2% ค่าเฉลี่ย 60.99±6.89 และ 64.38±3.44 มก.% มากกว่าชุดควบคุม (32.14 ± 0.76 มก.%) การปรับตัวของกุ้งกุลาดำให้อยู่ในน้ำเค็มสูงเป็นเวลานาน ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองลดลง ปริมาณน้ำตาลในเลือดกุ้งในชุดควบคุมกับที่เสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ส่วนชุดที่เสริมเบทาอีน 2% พบว่า มีปริมาณน้ำตาลในน้ำเลือดต่ำกว่าชุดอื่น ๆ

ปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมดภายหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มทันที พบว่า การปรับตัวในน้ำเค็มสูงทำให้ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำลดลง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 3.30±2.20 ถึง 3.94 ±1.40 $x10^5$ เซลล์/มล. ปริมาณของเม็ดเลือดกุ้งทั้งหมดลดลงเรื่อยๆ และชั่วโมงที่ 12 เมื่อกุ้งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ ปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งทั้ง 3 ชุดทดลองเพิ่มขึ้น มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 4.28 ถึง 4.58 x 10^5 เซลล์/มล.ไม่แตกต่างกัน

การทดสอบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็ม พบว่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลอง ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) การทดสอบการเปลี่ยนแปลงความเค็มให้สูงกว่าสภาพปกติ ไม่มีผลต่อการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ มีการทำงานเป็นไปอย่างปกติ โดยในชั่วโมงที่ 12 ทุกชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 12.1±50.43 ถึง 13.57±0.42 %

การทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มเพิ่มขึ้นทันที พบว่า การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เพิ่มสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาพปกติ (ตารางที่ 9) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ทุกชุดทดลอง โดยมีค่าเฉลี่ย 121.21±4.65 ถึง 129.33±11.50 unit/min/mg protein ตลอดระยะเวลาในการทดสอบความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลอง ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 3-6 และมีค่าคงที่ และในชั่วโมงที่ 12 ทุกชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 119.22±5.27 ถึง 130.75±8.12 unit/min/mg protein

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (40 ppt) (ค่าเฉลี่ย±SE)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (มก.%)	1	1.05±0.01	0.99±0.04	0.97±0.02	0.243
	3	1.19±0.09	0.95±0.02	1.17±0.01	0.088
	6	1.56±0.07	1.28±0.06	1.38±0.01	0.082
	12	1.54±0.09	1.49±0.15	1.51±0.04	0.940
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือด (มก.%)	1	55.80±3.83	33.29±0.38	43.97±15.67	0.360
	3	32.14±0.76^{b}	60.99±6.89^{a}	64.38±3.44^{a}	0.018
	6	31.76±1.91	33.38±5.72	30.94±.96	0.449
	12	40.15±2.69	39.10±1.52	29.84±3.05	0.108
ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (x 10^{5} เซลล์/มล.)	1	3.54±0.34	3.94±1.40	3.30±2.20	0.320
	3	3.46±0.20	3.72±0.80	3.52±0.10	0.061
	6	3.52±0.40	3.62±1.00	3.70±1.80	0.624
	12	4.56±0.46	4.58±0.18	4.28±2.00	0.583
การจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity :%)	1	10.79±0.12	12.36±0.36	11.14±0.57	0.131
	3	12.03±0.53	13.49±0.16	13.54±0.81	0.238
	6	12.40±0.41	14.47±1.14	12.86±1.18	0.248
	12	12.95±0.25	13.57±0.42	12.15±0.43	0.226

(มีต่อ)

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม(40 ppt) (ค่าเฉลี่ย±SE)(ต่อ)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity :Unit/min/mg protein)	1	124.77±8.90	129.33±11.50	121.21±4.65	0.819
	3	150.45±2.97	145.64±5.97	165.10±12.51	0.348
	6	128.29±5.24	139.09±17.19	130.24±1.03	0.077
	12	126.72±10.32	130.75±8.12	119.22±5.27	0.285

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

3.1.2.4 การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืด (0 ppt) ต่อระดับออสโมลาริตี้และระดับอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ พบว่า หลังปล่อยกุ้งในน้ำจืดจะแสดงอาการว่ายน้ำกระวนกระวาย เหงือกมีการทำงานตลอดเวลา กุ้งบางตัวมีอาการอ่อนแอนอนนิ่งที่พื้น เมื่อปล่อยไว้นานๆ พบว่าเปลือกกุ้งจะอ่อนนิ่มและบางตัวลอกคราบทิ้ง และตายทั้งหมด ซึ่งมีผลทำให้เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งทั้ง 3 ชุดทดลองได้เฉพาะในชั่วโมงที่ 1 และ 3 เท่านั้น เนื่องจากกุ้งที่ทดสอบมีอัตรารอดต่ำไม่สามารถการเก็บตัวอย่างน้ำเลือดสำหรับทดสอบในช่วงต่อไป ผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดแสดงในตารางที่ 13 ดังนี้

ผลการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดทันทีต่อระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ พบว่า ทั้ง 3 ชุดทดลองระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดลดลงทันที ในชั่วโมงที่ 1 ชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดสูงกว่า ชุดที่เสริมเบทาอีนในอาหาร 1 และ 2% (462±33.00, 4023±9.12 และ 363±30.54 m. Omsmole/H_2O kg) ($p<0.05$) ชั่วโมงที่ 3 กุ้งมีอาการอ่อนแอมากไม่เคลื่อนไหว ระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดลดต่ำลงทั้ง 3 ชุดทดลอง มีค่าเฉลี่ยของระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งที่เสริมเบทาอีน 1 และ 2% ไม่แตกต่างกัน และกุ้งที่เสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$)

ผลการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดทันทีต่อระดับอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ พบว่าปริมาณอิออนในน้ำเลือดลดลงทันทีเช่นเดียวกับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือด ปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำในชั่วโมงที่ 1 มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และชั่วโมงที่ 3 พบว่าปริมาณโซเดียมในน้ำเลือดลดลงต่ำกว่าในชั่วโมงที่ 1 มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยชุดควบคุมมีเฉลี่ยสูงกว่าในน้ำเลือดกุ้งที่เสริมเบทาอีน 1 และ 2%

การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดทันทีต่อปริมาณโปแตส เซียมในน้ำเลือดกุ้ง พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือด เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่อยู่ในสภาพปกติมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (4.63-7.91 m. mole/l) โดยในชั่วโมงที่ 1 พบว่า ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือดทั้ง 3 ชุดทดลอง มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยในกุ้งชุดควบคุมมีปริมาณโปแตสเซียมสูงสุด 6.34±0.05 m. mole/l รองลงมาชุดที่เสริมเบทาอีน 2% (5.47±0.23 m. mole/l) และเสริมเบทาอีน 1% (4.58±0.21 m. mole/l) แต่ในชั่วโมงที่ 3 ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (7.90 ±0.80 และ 6.24±0.57 m. mole/l) ไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม ($p>0.05$)

การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดทันทีต่อปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้ง พบว่า มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาพปกติในชั่วโมงที่ 1 ทั้ง 3 ชุดทดลองมีค่าลดลงมื่อเปรียบเทียบกับในสภาพปกติ (ตารางที่ 8) เฉลี่ยระหว่าง 203±5.00 ถึง 237±5.50m. mole/l ไม่ต่างกัน ($p>0.05$) ชั่วโมงที่ 3 พบว่าปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำไม่ต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 227 ± 13.34 ถึง 252 ±12.50 m. mole/l ตามลำดับ

ตารางที่ 13 ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (Eletrolyte)ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (0 ppt) (ค่าเฉลี่ย±SE)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
ออสโมลาริตี้	1	462 ±33.00^{a}	402 ±39.12^{ab}	363 ±30.54^{b}	0.023
(m. Osmole/H_2O kg)	3	289 ±7.51^{b}	371±3.52^{a}	297±24.15^{ab}	0.048
โซเดียม :Na^+	1	278 ±6.5^{b}	359 ±34.0^{a}	247 ±7.00^{b}	0.043
(m. mole/l)	3	209±11.50^{a}	186±12.00^{ab}	154±10.00^{b}	0.046
โปแตสเซี่ยม:K^+	1	6.34 ±0.05^{a}	4.58 ±0.21^{c}	5.47 ±0.23^{b}	0.005
(m. mole/l)	3	6.00 ±0.53	7.90 ±0.80	6.24 ±0.57	0.198
คลอไรด์ :Cl^-	1	229±8.00	237±5.50	203±5.00	0.061
(m. mole/L)	3	248±16.21	227±13.24	252±12.50	0.477

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

3.1.2.5 การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืด (0 ppt) ต่อองค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดต่อปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ พบว่า ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำจะลดลงต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาพปกติ (ตารางที่ 8) ในชั่วโมงที่ 1 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 2% มีค่าเฉลี่ย 1.51±0.04 มก.% สูงกว่าชุดควบคุม (1.08±0.03 มก.%) และเสริมเบทาอีน 1% (1.01±0.04 มก%) และชั่วโมงที่ 3 พบว่าทั้ง 3 ชุดทดลองปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.81-0.89 มก. % ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มเป็นน้ำจืด เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพปกติ (ตารางที่ 8) มีค่าเฉลี่ยลดลงเช่นเดียวกับปริมาณโปรตีนในเลือด แต่มีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลในเลือดทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในชั่วโมงที่ 1 และ 3

ค่าเฉลี่ยน้ำตาลในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2% (43.21± 4.91 และ 32.52±1.91 มก.%l) มากกว่าชุดควบคุม (23.74±5.34 มก.%) ($p<0.05$)

ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มเป็นน้ำจืด พบว่า ทั้ง 3 ชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาพปกติ โดยชั่วโมงที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดมีค่าเฉลี่ย 1.60±0.80 ถึง 1.78±1.10 x 10^5 เซลล์/มล. และทั้ง 3 ชุดทดลองมีปริมาณของเม็ดเลือดลดลง ในชั่วโมงที่ 3 ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 1.44 ±1.60 ถึง 1.56± 0.40 x 10^5 เซลล์/มล. เท่านั้น ทั้งนี้ทุกชุดทดลองปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) ดังนั้นการลดความเค็มของน้ำมีผลทำให้ปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมดลดลงทั้ง 3 ชุดทดลอง

การทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดทันที พบว่า มีค่าลดลง เนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดกุ้งลดลงหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็ม กุ้งกุลาดำมีอาการอ่อนแอ ทำให้ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดลดลง ในชั่วโมงที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 9.11± 0.38 ถึง 10.82±0.09 % และชั่วโมงที่ 3 มีค่าเฉลี่ย 10.93±0.07 ถึง 11.19±0.35 % และทั้ง 3 ชุดทดลองการจับกินสิ่งแปลกปลอมในน้ำเลือดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็มเป็นน้ำจืดทันที พบว่ามีค่าลดลงเช่นเดียวกันกับระบบภูมิคุ้มกันอื่น ในชั่วโมงที่ 1 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 82.548±.41 ถึง 106.01± 4.96 unit/min/mg protein และในชั่วโมงที่ 3 ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าลดลง ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย 86.97±19.35 ถึง 96.54±13.32 unit/min/mg protein

ผลของการลดความเค็มในน้ำเป็นน้ำจืดทันทีทำให้กุ้งอ่อนแอมากกว่าในน้ำความเค็มสูง ซึ่งมีผลต่อปริมาณของเม็ดเลือดกุ้งลดลงกว่านสภาวะปกติ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่น การจับกินสิ่งแปลกปลอม ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในน้ำเลือดลดลงเช่นกัน การเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเสริมสารเบทาอีน 1-2% ในอาหารเพื่อลดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม สามารถควบคุมการแลกเปลี่ยนของออสโมลาริตี้และอิออนต่างๆ ได้มากกว่าเลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมเบทาอีน ซึ่งการเสริมเบทาอีนในอาหารมีผลต่อการระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งแต่ไม่แสดงผลแน่ชัดว่าแตกต่างกันแต่อย่างใด

ตารางที่ 14 องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็ม (0 ppt) (ค่าเฉลี่ย±SE)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (มก.%)	1	1.08±0.03[b]	1.01±0.04[b]	1.51±0.04[a]	0.033
	3	0.81±0.04	0.89±0.15	0.81±0.04	0.790
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือด (มก.%)	1	37.48±3.82	37.86±7.25	40.15±4.20	0.930
	3	23.74±5.34[b]	43.21±4.91[a]	32.52±1.91[ab]	0.031
ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด ($x\ 10^5$ เซลล์ / มล.)	1	1.78±0.42	1.60±0.80	1.78±1.10	0.853
	3	1.46±2.60	1.44±1.6	1.56±0.40	0.888
การจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity:%)	1	9.11±0.38	10.82±0.09	10.53±0.53	0.095
	3	10.93±0.07	11.17±0.47	11.19±0.35	0.125
เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity :unit/min/mg protein)	1	82.54±8.44	97.49±10.84	106.01±4.96	0.144
	3	96.54±13.32	86.97±19.35	92.99±5.38	0.259

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

3.2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างในน้ำ

3.2.1 ความทนทนของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน เป็นเวลา 90 วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำ แสดงในตารางที่ 15 ดังนี้

ความทนทานของกุ้งกุลาดำหลังเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำจากสภาพปกติ 7.5-8 เป็น 5.5 ทันที กุ้งแต่ละชุดทดลองจะมีการปรับตัวเพื่อให้ระดับของค่า pH ภายในและภายนอกเซลล์สมดุลกัน ระยะหนึ่ง เมื่อเวลาในการทดสอบผ่านไป 1 ชั่วโมง ทุกชุดทดลองไม่พบกุ้งตาย และกุ้งเริ่มมีอัตราการตายสะสมหลังชั่วโมงที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากัน (7%) จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม และเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนในอาหารทั้ง 2 ระดับสามารถ

ปรับตัวได้ในน้ำที่มีค่า pH เป็นกรดได้เป็นอย่างดี สิ้นสุดการทดลอง 24 ชั่วโมง อัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าเฉลี่ย 10 ถึง17 % เท่านั้น และค่า pH ของน้ำระหว่างการทดลองเฉลี่ย 5.04 ถึง 5.23

ตารางที่ 15 อัตราการตายสะสม (%) ของกุ้งกุลาดำจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (5.5)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
	ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
1	0	0	0	.
2	7	7	7	1.000
3	10	10	10	.
6	10	10	10	.
12	17	10	17	0.216
24	17	10	17	0.216

3.2.2 องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (pH 5.5)

3.2.2.1 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำจากปกติเป็น pH 5.5 ต่อระดับออสโมลาริตี้และอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังนี้ (ตารางที่ 16)

ผลการทดลองหลังการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำ ให้เป็นกรด (5.50) ต่อระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ พบว่า มีผลทำให้ระดับออสโมลาริตี้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับออสโมลาริตี้ในกุ้งที่เลี้ยงสภาพปกติ ที่ pH 7.5-8 ในชั่วโมงที่ 1 พบว่าระดับออสโมลาริตี้ ในน้ำเลือดกุ้งมีค่าเฉลี่ยต่างกัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ย สูงกว่าชุดควบคุม ($p< 0.05$) ระยะเวลาเพิ่มขึ้นการปรับตัวของกุ้งให้อยู่ในน้ำที่เป็นกรดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นปกติ แต่การเปลี่ยนแปลงของระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดยังมีการเปลี่ยนแปลงตลอด เมื่อครบ 12 ชั่วโมง กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1% สามารถระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดสูงกว่าชุดที่เสริมเบทาอีน 2% และชุดควบคุม การควบคุมระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดของกุ้งยังมีผลต่อความเข้มข้นของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดกุ้งเช่นกัน

ปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดหลังการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำให้เป็นกรด (pH 5.50) พบว่า ปริมาณโซเดียมในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำมีค่าเฉลี่ยลดลงเล็กน้อยจากสภาพปกติในชั่วโมงที่ 1 แต่ละชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโซเดียมในน้ำเลือดมีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 3 และ 6 ทุกชุดทดลอง และเมื่อครบ 12 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโซเดียมในน้ำเลือดกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยไม่ต่างกัน (463 ±9.72 และ 456±8.52 m. mole/l) ($p>0.05$) แต่แตกต่างกับชุดควบคุม (348±2.52 m. mole/l) ($p<0.05$)

ปริมาณของโปแตสเซียมในน้ำเลือดกุ้งหลังการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำเป็นกรด พบว่า ทั้ง 3 ชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ปริมาณโปแตสเซียมในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำลดลง ระหว่างชั่วโมงที่ 1-6 เมื่อกุ้งปรับตัวให้สามารถอยู่ได้ในน้ำที่มีสภาพเป็นกรด การรักษาอิออนในเลือดเพิ่มขึ้น ในชั่วโมงที่ 12 พบว่า ปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดแต่ละชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 8.24±0.50 ถึง 9.60±1.37 m. mole/l ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

ปริมาณของคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งหลังการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำเป็นกรด พบว่า ชั่วโมงที่ 1 ถึง 6 ปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดมีปริมาณลดลงทันทีหลังปล่อยกุ้งในน้ำที่มีความเป็นกรดสูง โดยชุดควบคุมมีปริมาณลดลงมีค่าเฉลี่ย 144± 9.72 m. mole/l ต่ำกว่า ($p<0.05$) กุ้งทีเลี้ยงด้วอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% (258±6.48 และ 241± 23.52 m. mole/l) เช่นเดียวกับในชั่วโมงที่ 3 และในชั่วโมงที่ 6 -12 ปริมาณคลอไรด์ในน้ำเลือดกุ้งทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และมีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากกุ้งสามารถปรับตัวได้ในน้ำที่เป็นกรด

ตารางที่ 16 ออสโมลาริตี้ (Osmolarity) และอิออนในน้ำเลือด (Eletrolyte)ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างในน้ำ (5.5) (ค่าเฉลี่ย±SE)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
ออสโมลาริตี้	1	525±15.00^{b}	624±15.25^{a}	564 ±12.00^{ab}	0.035
(m. Osmole/H_2O kg)	3	475±34.50	591±30.30	606±30.00	0.108
	6	584±6.50	573±0.00	596±25.50	0.823
	12	564±6.00^{b}	651±15.00^{a}	585±9.00^{b}	0.021
โซเดียม :Na^{+}	1	376±49.29	385±20.28	390±16.62	0.953
(m. mole/l)	3	321±5.58	369±7.89	334±5.07	0.062
	6	345±0.70	348±5.07	354±8.31	0.586
	12	348±2.52^{b}	463±9.72^{a}	456±8.52^{a}	0.003
โปแตสเซี่ยม :K^{+}	1	4.81±0.515	5.99±0.43	5.55±0.57	0.374
(m. mole/l)	3	5.35±0.22	6.44±0.44	5.85±0.15	0.169
	6	6.43 ±0.19	5.45±0.24	6.52±0.21	0.066
	12	8.24±0.50	9.15±0.63	9.60±1.37	0.168
คลอไรด์ :Cl^{-}	1	222±3.42	298±3.59	283±4.65	0.108
(m. mole/l)	3	144±9.72^{b}	258 ±6.48^{a}	241±23.52^{a}	0.022
	6	143±3.24	159±1.52	196±16.53	0.066
	12	199±20.50	164±14.79	172 ±8.31	0.365

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

3.2.2.2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำจากปกติเป็น pH 5.5 ต่อองค์ประกอบทางเคมี และระบบภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17 ดังนี้

ผลของการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำต่อองค์ประกอบทางเคมีในเลือดกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน และน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือด ผลการทดลอง พบว่า การเปลี่ยนแปลงของ pH ลดลงทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดลดลงทันทีในชั่วโมงที่ 1 โดยกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมมีปริมาณโปรตีนในเลือดเฉลี่ย 0.89± 0.02 มก.% แตกต่างกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1% (0.97 ± 0.01 มก. %) และชุดที่เสริมเบทาอีน 2% (1.05 ± 0.04 มก.%) ($p<0.05$) เมื่อระยะเวลาในการทดสอบผ่านไป 3- 6 ชั่วโมง กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวของในน้ำที่ pH 5.50 ได้ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนในเลือดอยู่ในสภาพปกติ ทุกชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำในสภาพเป็นกรดต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส ในเลือดของกุ้งกุลาดำ พบว่า มีค่าลดลงต่ำกว่าปริมาณน้ำตาลในเลือดกุ้งกุลาดำในสภาพปกติ ปริมาณน้ำตาลในเลือดกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลองลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1-12 แต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) การปรับตัวของกุ้งกุลาดำในน้ำที่ค่า pH เป็นกรดเป็นเวลานาน ทำให้กุ้งสามารถดำรงชีวิตได้ และเมื่อครบ 12 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลในเลือดมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 26.41±6.49 ถึง 27.94±3.43 มก% ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำในสภาพเป็นกรด ต่อระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด การจับกินสิ่งแปลกปลอม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ไม่ต่างกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาพปกติ อายุ 90 วัน (ตารางที่ 8) กล่าวคือ ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนและ 2% มีปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 2.98±0.20 ถึง3.28±2.00 $x10^5$ เซลล์/มล. แต่เมื่อกุ้งสามารถปรับตัวในน้ำที่เป็นกรดได้ ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งเพิ่มขึ้นใกล้เคียงในสภาพปกติ

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำในสภาพเป็นกรดต่อการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ พบว่าทุกชุดทดลอง มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน($p>0.05$) การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งโดยการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดมีแนวโน้มลดลง ตั้งแต่ชั่วโมงที่

1 การจับกินสิ่งแปลกปลอมในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำตลอดการทดลอง มีการทำงานเป็นปกติได้ เมื่อสามารถปรับตัวได้ในน้ำที่มีค่า pH เป็นกรดการจับกินสิ่งแปลกปลอมไม่แตกต่างกันแต่อย่างใด ($p>0.05$)

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำในสภาพเป็นกรด ต่อความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนต่างกัน พบว่า ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสทั้ง 3 ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ในชั่วโมงที่ 1 ยังคงมีค่าเฉลี่ยสูง โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 152±14.51 และ 162±10.15 unit/min/mg protein มากกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$) (127± 17.28 unit/min/mg protein เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3-6 ชั่วโมง ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงทุกช่วง และครบ 12 ชั่วโมง พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดกุ้ง มีค่าเฉลี่ยลดลงระหว่าง 93± 0.68 127±13.48 unit/min/mg protein ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อกุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวในน้ำที่มีค่า pH เป็นกรดได้ ทำให้การทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคงที่ ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน1-2% และชุดควบคุม

ตารางที่ 17 องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในน้ำ (5.5) (ค่าเฉลี่ย±SE)

องค์ประกอบของเลือด	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ระดับเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ			p-Value
		ชุดที่ 1 (ควบคุม 0%)	ชุดที่ 2 (1.0%)	ชุดที่ 3 (2.0%)	
ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (มก.%)	1	0.89±0.02[b]	0.97±0.01[ab]	1.05±0.04[a]	0.032
	3	1.46±.03	1.48±0.05	1.47±0.14	0.991
	6	1.35±0.05	1.37±0.20	1.38±0.08	0.985
	12	1.42±0.08	1.37±0.02	1.40±0.08	0.857
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำ-เลือด (มก.%)	1	27.1±68.76	38.24±6.387	33.28±11.07	0.716
	3	32.90±18.32	27.94±8.78	32.52±0.38	0.947
	6	21.45±3.05	27.17±5.72	18.39±3.06	0.424
	12	27.17±4.19	27.94±3.43	26.41±6.49	0.976
ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด ($x\ 10^5$ เซลล์/มล.)	1	2.46±1.00	2.42±3.00	2.44±0.20	0.991
	3	2.28±12.00	2.00±12.00	1.98±1.40	0.314
	6	2.36±1.20	2.58±6.60	2.48±0.80	0.925
	12	2.98±0.20	3.28±2.00	3.10±2.2	0.537
การจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity : %)	1	11.47±0.04	12.11±0.11	9.84±0.34	0.189
	3	13.59±0.41	13.66±0.85	12.46±1.20	0.611
	6	10.98±0.52	13.46±0.13	12.84±0.84	0.110
	12	12.54±0.15	12.41±0.59	12.70±0.91	0.951
เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase activity : unit/min/mg protein)	1	127±17.28	152±14.51	162±10.15	0.180
	3	104±7.27	103±1.37	118±4.57	0.196
	6	130±3.16	125±8.37	110±2.74	0.820
	12	112±8.71	127±13.48	93±0.68	0.178

หมายเหตุ อักษรต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ผลการศึกษาการเสริมเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ 3 ระดับ คือ ชุดทดลองที่ 1 ไม่เสริมเบทาอีน ชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 2 เสริมเบทาอีน 1% และ ชุดทดลองที่ 3 เสริมเบทาอีน 2% เลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 4.01 กรัม ผลการศึกษา พบว่า การเจริญเติบโตโดยน้ำหนัก ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งกุลาดำ ในชุดควบคุมกับอาหารเสริมเบทาอีน 1% ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันในเดือนที่ 1 และ 2 แต่หลังจากเลี้ยงครบ 3 เดือน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มากกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันพบว่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาหารที่เสริมสารเบทาอีนกระตุ้นการเจริญเติบโต การกินอาหารของกุ้งเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้อาหารเพื่อการเจริญเติบโตจากประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อทุก ชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม ดังนั้นการเสริมสารเบทาอินในอาหารมีผลทำให้การกินอาหาร การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำดีกว่าไม่เสริมเบทาอีนในอาหาร

คุณสมบัติเบทาอีนมีในการดึงไขมันมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยผ่านการทำงานของคาร์นิทีนในไมโตคอนเดรีย ซึ่งคาร์นิทีนในไมโตคอนเดรียทำหน้าที่เป็นตัวพาไขมันเพื่อสลายเป็นพลังงานได้ดีขึ้น จึงมีผลให้ร่างกายดึงกลูโคสมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองแทนการใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานในรูปของไกลโคเจนในตับได้มากขึ้น และการสังเคราะห์คาร์นิทีนนั้นต้องอาศัยเอส-อดีโนซิเมไธโอนีนที่เกิดจากวัฏจักรโฮโมซีสทีน เป็นตัวให้หมู่เมทิลแก่กรดอะมิโนไลซีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในวัฏจักรโฮโมซีสทีน (Millan and Garrow, 1998) การเสริมเบทาอีนในอาหารแบบเคลือบ 2% สามารถควบคุมระดับของไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้มากกว่าอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีน ซึ่งจะทำให้การลำเลียงไขมันเข้าสู่กระแสเลือดดีมากขึ้น ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ในขบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายดีกว่า (เกษฎา, 2549) คุณสมบัติที่สำคัญของเบทาอีนคือสามารถใช้เป็นสารดึงดูดการกินอาหาร (attractant) สามารถละลายน้ำได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนอิสระ กลิ่น และรสชาติช่วยดึงดูดให้สัตว์น้ำกินอาหารสัตว์น้ำได้ ดังนั้นเบทาอีนนิยมนำมาใช้เสริมในสูตรอาหารสัตว์น้ำ เพื่อเป็นสารแต่งกลิ่นให้เหมือนกลิ่น

ธรรมชาติ ปริมาณของกรดอะมิโนและเบทาอีนในอาหาร ยังสามารถกระตุ้นการเข้าหาอาหารและกินอาหารของกุ้งกุลาดำวัยรุ่นได้ (Coman *et al*., 1996; Felix and Sudharsan, 2004) และ จากการศึกษาของ เกษฎา (2549) ผลของเบทาอีนต่อระยะเวลาการเข้าหาอาหารและปริมาณการกินอาหารในกุ้งกุลาดำ การเสริมเบทาอีน 1% ในอาหารทำให้สามารถกระตุ้นการเข้าหาอาหารของกุ้งกุลาดำรวดเร็วและกินอาหารมากกว่าอาหารที่ไม่เสริมสารเบทาอีน

จากผลการศึกษานี้ การเสริมเบทาอีนในอาหาร 1- 2% ในสูตรอาหาร มีผลทำให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งกุลาดำตลอดการทดลองไม่แตกต่างกับอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีน ($p>0.05$) แต่อาหารที่เสริมเบทาอีน 1% มีแนวโน้มทำให้ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าอาหารที่ไม่เสริมสารเบทาอีน สอดคล้องกับผลของ FinnStim หรือ Betafin (Culton Ltd. Finnsugar Bi Products, Helsinki, Finland) (betain/amino additive) ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ (Penaflorida and Virtanen, 1996b) และกุ้งขาววานาไม (*Litopenaeus vannanei*) (The finstim breifing, 1996) โดยอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อน เสริม FinnStim ในอาหารเลี้ยงกุ้งขนาด 0.2 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.7-0.9 กรัม/ตัว อาหารกุ้งกุลาดำที่เสริม FinnStim 1% ทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เพียงพอต่อความต้องการของลูกกุ้งกุลาดำ ส่วนกุ้งขาววานาไม เสริม FinnStim ในอาหาร เลี้ยงกุ้งขนาด 0.99 กรัม เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 6.7-7.1 กรัม ในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม FinnStim 1.5% มีการเจริญเติบโตโดยน้ำหนัก อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ มากกว่าไม่เสริมในอาหาร ส่วน Felix and Sudharsan (2004) กล่าวว่าผลของการใช้ไกลซีน เบทาอีน ในอาหารเพื่อกระตุ้นการกินอาหารและการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกร้าม (*Macrobrachium rosenbergii.*) วัยรุ่น พบว่าอาหารที่ผสมเบทาอีนทำให้น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการกินอาหารและอัตราการแลกเนื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม และแนะนำว่าการเสริมสารไกลซีนเบทาอีนในอาหาร 5 ก./กก. เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งกุลาดำ ผลการทดลองใช้เบทาอีนในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ Craig *et al*., (2002) รายงานว่า การทดแทนโคลีนด้วยเบทาอีนในอาหารปลานิล 1.49-2.24 กรัม/กิโลกรัม เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากโปรตีนของปลานิล และในปลา raibow trout อาหารที่เสริมเบทาอีน 0.75 -1.5 % สามารถทดแทนความต้องการโคลีนในอาหารได้ 50% (Rumsey, 1991)

ดังนั้นผลการเสริมสารเบทาอีนในอาหารจะทำให้การทำงานของระบบการย่อย การดูดซึมสารอาหารในร่างกายให้คงที่ ทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งเพิ่มขึ้น แต่เมื่อสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะคุณสมบัติของน้ำในบ่อเลี้ยง เช่น ปริมาณของแอมโมเนียในน้ำ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ หรือมีค่าบีโอดีในน้ำมากเกิน มีผลทำให้การกินอาหารของกุ้งลดลง ร่างกายมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ทำให้การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ คุณภาพน้ำขณะทำการทดลองพบว่ามีปริมาณแอมโมเนียสูง (0.49 มก./ล) อุณหภูมิเฉลี่ย 27.5-28.5 ^{0}C และค่าบีโอดีในน้ำเฉลี่ย 17.49 มก./ล ซึ่งเกิดจากการสะสมของของเสียจากอาหารและสิ่งขับถ่ายในน้ำ จึงทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้า โดยปกติปริมาณของแอมโมเนียในน้ำถ้ามากเกินจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ปริมาณแอมโมเนียอิสระในบ่อเลี้ยงกุ้งจะต้องไม่เกิน0.1 มก./ล. (Boyd, 1990) แอมโมเนียอิสระ NH_3 ถ้ามีในน้ำมากเกิน 0.025 มก./ล. จะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ การเจริญเติบโตลดลง แต่ถ้าอยู่ในรูปของแอมโมเนียรวม (NH_3+NH_4^+) ในน้ำเกินที่มีระดับ pH 7 และอุณหภูมิ 30^{0}C ความเข้มข้น 3.1 มล./ล. ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ (มั่นสิน และไพพรรณ, 2544)

2. ผลของเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำต่อองค์ประกอบทางเคมีของเลือดและระบบภูมิคุ้มกัน

การรักษาสมดุลออสโมซีสในร่างกายของกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ การควบคุมระดับออสโมลาริตี้ ในน้ำเลือดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1% กับชุดควบคุมไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ขณะที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 2% มีค่าลดลง ผลของเบทาอีนในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน พบว่าปริมาณของโซเดียมในน้ำเลือดระหว่างชุดควบคุมกับชุดที่ เสริมเบทาอีน 1% มีค่าเฉลี่ยมากกว่าชุดที่เสริมเบทาอีน 2% ($p<0.05$) ปริมาณของโปแตสเซียมในน้ำเลือดมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกชุดทดลอง โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1 และ 2% มีค่าเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม ส่วนปริมาณของคลอไรด์ไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ระดับออสโมลาริตี้ และปริมาณอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดมีความผันแปรสูง การปรับสมดุลในร่างกายเพื่อรักษาระดับออสโมซีสในร่างกาย ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนไม่แตกต่างกัน และในสภาพที่กุ้งมีความเครียดจากการเลี้ยง มีส่วนทำให้กุ้งมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมหรือน้ำที่อาศัยอยู่เพื่อรักษาสมดุลภายในร่างกายให้คงที่ไม่แตกต่างกับภายนอกร่างกาย สอดคล้องกับ แขวลีและคณะ (2547) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกาย โดยเฉพาะการลอกคราบ มีผลกระทบต่อค่ามาตรฐาน หรือค่าปกติขององค์ประกอบเลือดได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียม โปแตสเซียม และแมกนีเซียม ในระยะก่อนการลอกคราบความข้มข้นของเกลือแร่จะเพิ่มสูงขึ้นกว่าในระยะอื่นๆ

และยังพบว่า ความแตกต่างของโซเดียม โปแตสเซียม และแคลเซียมในน้ำเลือดมีค่าลดลงเมื่อกุ้งมีอายุมากขึ้นหรือเข้าใกล้วัยเจริญพันธุ์ ส่วนค่าปกติขององค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำจากบ่อดินขนาด 10-20 กรัม มีค่าเฉลี่ย ของออสโมซีส 778.49 m Osmole/H_2O kg, ปริมาณของโซเดียม 314.52 m mole/l, โปแตสเซียม 9.61 m mole/l และคลอไรด์ 347.20 m mole/l. (กิจการ และคณะ 2543ค.) และในกุ้งกุลาดำขนาด 10 และ 30 กรัม มีค่าเฉลี่ย 698 และ 752 m Osmole/H_2O kg. (Ferraris *et al.,*1987)

การเปลี่ยนแปลงของออสโมซีสและอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดตลอดการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาหารที่ผสมเบทาอีน 1 % มีผลทำให้การควบคุมระดับออสโมลาริตี้ และปริมาณของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดได้ดี กว่าอาหารผสมเบทาอีน 2% และชุดควบคุม เพราะเบทาอีนช่วยในเซลล์สามารถรักษาสมดุลของอิออนต่างๆ ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะทำให้เกิดการสังเคราะห์เบทาอีนในไมโตคอนเดรียแล้วสะสมในเซลล์ ช่วยควบคุมในการเก็บรักษาน้ำและการขับเกลือแร่ต่างๆ ออกจากเซลล์ เมื่อความเค็มหรืออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ทำงานเป็นปกติ (Yancey *et al*., 1992) การเปลี่ยนแปลงความเค็มมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของโซเดียม โปแตสเซียม และแมกนีเซียมอิออนในเลือดกุ้งกุลาดำระยะต้น แต่ไม่มีอิทธิพลต่อแคลเซียม โดยโซเดียม โปแตสเซียม และแคลเซียมอิออนในน้ำเลือดกุ้ง มีจุด Isoionic crossover ที่ความเค็ม 19.84, 23.45 และ 22.18 ppt โดยมีลักษณะ Hyperionic regulation (จารุวรรณ, 2541)

องค์ประกอบทางเคมีในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนในระดับต่างๆ กัน พบว่าปริมาณของโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ เมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้ง 3 ชุดทดลอง ค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกชุดทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เช่นเดียวกับปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดพบว่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของกุ้ง กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน มีการสะสมของปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดสูงกว่าในชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังนั้นกุ้งกุลาดำจำเป็นต้องคงสภาพค่า pH ในร่างกายในเป็นปกติอยู่เสมอ เพื่อให้ปริมาณของโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดคงที่ ในกุ้งขาวจีน (*Penaeus chinensis*) จะมีปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดสูงขึ้นเมื่อมีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้มีการพัฒนาระบบต่างๆ ในร่ากายมากขึ้น (Chen *et al.*, 1993) นอกจากนี้ Ferraris *et al*., (1986) ยังพบว่าในสภาวะที่สัตว์น้ำมีความเครียดเป็นเวลานานปริมาณโปรตีนทั้งหมดจะคงที่ตลอดในทุกระยะการลอกคราบของกุ้งกุลาดำโดยในระยะ D stage จะมีค่าเฉลี่ย 13.42 % ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองในครั้งนี้มีปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดมากกว่า

กิจการ และคณะ (2543 ค.) เปรียบเทียบการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและจากสภาพธรรมชาติจากบ่อดิน พบว่ามีปริมาณของโปรตีนในน้ำเลือดเฉลี่ย 11.85 และ 11.43 มก.% ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เฉลี่ย 53.87 และ 32.91 มก.% ปริมาณน้ำตาลของกุ้งจากห้องปฏิบัติการมีค่าสูงกว่ากุ้งจากธรรมชาติ แสดงถึงสภาวะเครียดในร่างกายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากการศึกษาของ Hall and Van-Ham (1998). พบว่าค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดของกุ้งสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อม เช่น ออกซิเจนต่ำ หรืออยู่ในพื้นที่จำกัด สอดคล้องกับ Rodriqurez (1981) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำเลือดมีความผันแปรของปริมาณโปรตีน น้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือด ซึ่งในสภาพปกติร่างกายของสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการปรับตัวให้ค่าพีเอชของน้ำเลือดคงสภาพไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากนัก เพราะจะมีผลทำให้มีอาการเครียดมากขึ้น และมีปริมาณน้ำตาลกูลโคสเพิ่มขึ้น น้ำตาลในน้ำเลือดกุ้งสีน้ำตาล (Browm shrimp) (*Carngon cangon* L.) จะลดลงเมื่อกุ้งมีขนาดใหญ่และมีค่าสูงสุดในเพศผู้ รองลงมาเพศเมียที่มีไข่ (Spaargaren and Haefner, 1987) จึงกล่าวได้ว่าเมื่อกุ้งเกิดความเครียดจะทำให้ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลในน้ำเลือดลดลงไม่ว่าจะได้รับอาหารที่เสริมและไม่เสริมเบทาอีนก็ตาม การควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อ หรือการจัดการด้านอาหาร มีส่วนสำคัญ ที่จะลดการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงให้เหมาะสมเพื่อลดความเครียดของกุ้ง

ผลของการเสริมเบทาอีนในอาหารต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่า ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของน้ำเลือดมีความผันแปรตามปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมด และยังมีผลต่อการทำงานความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในน้ำเลือดของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีน 1- 2% ไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุม แต่ทุกชุดทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 2 ใกล้เคียงกัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีค่าเฉลี่ยลดลงตามปริมาณของเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งจะมีผลทต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโรค และการกำจับสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2% มีความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในน้ำเลือดสูงกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$) เนื่องจากในสภาพการเลี้ยงที่เกิดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วย อาหารที่เสริมเบทาอีนเพียง 1% เพียงพอในการควบคุมระดับของความเครียดให้เป็นปกติ ซึ่งการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ค.) เปรียบเทียบการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการและจากสภาพธรรมชาติจากบ่อดิน พบว่า ปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมดเฉลี่ย 3.07 และ 6.49 x 10^4 เซลล์/มล. ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เฉลี่ย 217.84 และ 335.18 unit/min/mg protein ค่าการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการอยู่ในช่วง 11.51-45.78% โดยเฉลี่ย

26.14% ดังนั้น ผลการเสริมสารเบทาอีนในอาหารต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1% ทำให้กลไกลการทำงานของการจับกินสิ่งแปลกปลอมและความว่องไวของเอนไซมฟีนอลออกซิเดสสูงกว่าชุดควบคุม

3. ความทนทาน องค์ประกอบของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้กุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมหลังเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน

ความทนทานของกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มปกติ (20 ppt) เป็นความเค็มสูง (40 ppt) และในน้ำจืด (0 ppt) พบว่าการปรับตัวในน้ำเค็มสูงกุ้งกุลาดำมีความทนทานได้สูงกว่าการเปลี่ยนแปลงจากน้ำเค็มเป็นน้ำจืด โดยจะมีอัตราการตายสะสมเมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่ำกว่า กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวในน้ำที่มีความเค็มและความเข้มข้นของอิออนต่างๆ ในน้ำสูงได้ภายใน 12 ชั่วโมง โดยไม่มีผลทำให้เกิดการตายสะสมเพิ่มขึ้น แต่การทดสอบในน้ำจืดกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองมีอัตราการตายสะสมสูงไม่แตกต่างกัน โดยจะแสดงอาการกระวนกระวาย เกิดการแลกเปลี่ยนของน้ำบริเวณซี่เหงือกมากขึ้น มีกุ้งตายสะสมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 เป็นต้นไปและตายหมดภายใน 12 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันระหว่างกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมเบทาอีนกับชุดควบคุม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเค็มจากน้ำเค็มเป็นน้ำจืดทันที ความเข้มข้นของเกลือแร่ในเลือดกุ้งจะสูงกว่าในน้ำที่อาศัย กุ้งอยู่ในสภาวะ hyper-osmotic ขณะที่เปลี่ยนเป็นความเค็มสูงความเข้มข้นของเกลือในน้ำเลือดจะต่ำกว่าในน้ำกุ้งอยู่ในสภาวะ hypo-osmotic ซึ่งการปรับตัวของสัตว์น้ำจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เพื่อดูดซึมอิออนต่างๆ จากน้ำ และไตจะทำหน้าที่ขับเกลือออก และดึงเข้ามาใหม่เพื่อรักษาความเข้มข้นของเลือดในร่างกายให้สมดุล (ส่งศรี, 2533)

การเปลี่ยนแปลงความเค็มจาก 20 ppt เป็น 40 ppt ทันทีมีผลทำให้ระดับออสโมลาริตี้ ปริมาณของโซเดียม โปแตสเซียม และคลอไรด์ เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 1-3 และเมื่อกุ้งปรับตัวในน้ำเลี้ยงได้ระดับออสโมซีสและอิออนต่างๆ จะลดลง การเสริมสารเบทาอีนในอาหารไม่สามารถควบคุมระดับออสโมซีสและอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดให้คงที่ได้ เพราะความเข้มข้นของอิออนในน้ำเลี้ยงเป็นตัวควบคุมการแลกเปลี่ยนอิออนภายในเซลล์ เมื่อน้ำจากภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นของอิออนต่างๆ สูง สัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเซียจะแลกเปลี่ยนอิออนต่าง ๆ จำเป็นต้องปรับสมดุลของออสโมซีสโดยการซึมผ่านทางเมมเบรนบริเวณซี่เหงือก เพื่อรักษาระดับความดันออสโมซีสภายในให้เท่ากับภายนอก ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือแร่จะเพิ่มขึ้น ระดับของความเค็มของน้ำที่สัตว์

อาศัยอยู่ โดยเฉพาะโซเดียมซึ่งจำเป็นจะต้องได้รับเพิ่มขึ้นควบคู่กับโปแตสเซียมเพื่อควบคุมประจุต่างๆในร่างกาย ซึ่งต่างจากคลอไรด์ภายนอกจะมีความเข้มข้นมากกว่า (ประจวบ, 2543) จุดสมดุลของปริมาณโซเดียมและคลอไรด์ระหว่างน้ำเลือดและน้ำเลี้ยงของกุ้งระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์จะอยู่ที่ระดับความเค็ม 20 ppt (แขวลี และคณะ, 2547) ส่วนพ่อแม่พันธุ์จุดสมดุลอยู่ที่ระดับความเค็ม 30 ppt ; (สิทธโชค, 2545) การปรับสมดุลของเกลือแร่ในร่างกายกับน้ำเลี้ยงให้ใกล้เคียงกันของกุ้ง *P. chinensis* จะเจริญเติบโตสูงสุด เนื่องจากลด Na^{+} -K^{++}-ATPase ให้ต่ำลง ทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยและการดูดซึมอาหารได้ดีและมีประสิทธิภาพสูงสุด (Chen and Lin, 1994) ดังนั้น ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งจะผันแปรตามความเข้มข้นของอิออนในน้ำที่ใช้เลี้ยง และเปลี่ยนแปลงตามระดับความเค็มของน้ำเลี้ยงโดยความเข้มข้นของโซเดียมและโปแตสเซียมในน้ำเลือดจะสูงกว่าในน้ำเลี้ยง

การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืดทันที ทำให้ในน้ำเลือดภายในร่างกาย ระดับออสโมลาริตี้และอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของอิออนในน้ำเลี้ยงต่ำกว่า มีการแลกเปลี่ยนอิออนบริเวณเหงือกมากขึ้น โดยดูดน้ำจากภายนอกเข้าสู่ร่างกายเพื่อลดความเข้มข้นของอิออนภายในลง ปริมาณน้ำที่เข้าไปแทนที่ในเซลล์เม็ดเลือดปริมาณมากๆ สามารถทำให้เซลล์แตกเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำได้ (ส่งศรี, 2533) ซึ่งมีผลทำให้อัตราการตายสะสมของกุ้งเพิ่มสูงขึ้นภายใน 3 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบความทนทานของกุ้งกุลาดำในน้ำที่มีค่า pH เป็นกรด (5.5) พบว่ากุ้งสามารถปรับตัวในน้ำได้โดยไม่มีผลต่ออัตราการตายสะสม และการควบคุมระดับออสโมลาริตี้และอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ชุดทดลองได้ใกล้เคียงกัน กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1% มีระดับออสโมลาริตี้และอิออนในน้ำเลือดมากกว่าชุดทดลองอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นในช่วงแรกที่ทำการทดสอบในน้ำที่มีค่า pH เป็นกรดเท่านั้น กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เป็นต้นไป ระดับออสโมลาริตี้และอิอออนต่างๆ ทั้งสามชุดทดลองไม่แตกต่างกัน

ผลการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้สัตว์น้ำเกิดการติดเชื้อรุนแรงมาก การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายจะมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมภายนอก ถึงแม้ว่ากุ้งจะสามารถปรับตัวทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ก็ตาม แต่การเจริญเติบโต หรือการดำรงชีวิตที่ดีที่สุดอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมมีช่วงแคบๆ เท่านั้น การเปลี่ยนแปลงของความเค็มจากความเค็มปกติเป็นน้ำจืด หรือในน้ำเค็มสูงทันที ทำให้กุ้งมีการปรับสมดุลภายในร่างกายมากขึ้น การแลกเปลี่ยนของน้ำเพื่อควบคุมระดับออสโมลาริตี้และอิ

ออนต่างๆ เป็นสาเหตุของการตายของกุ้ง เนื่องจากต้องใช้พลังงานในการควบคุมปริมาณแร่ธาตุและน้ำในร่างกายให้อยู่ในระดับที่คงที่ประมาณ 600-700 m. Osmole/H_2O kg.(บุญรัตน์, 2545) โดยเฉพาะในน้ำเค็มต่ำกุ้งต้องใช้พลังงานในการควบคุมระดับของเกลือแร่ต่างๆ ในร่างกายให้คงที่ ทำให้กุ้งมีอาการอ่อนแอ และตายเนื่องจากปริมาณออสโมลาริตี้ของกุ้งผิดปกติ (สุธีวัฒน์ และคณะ, 2539) การตอบสนองของกุ้งคุรุม่า (*Marsupenaeus japonicus*) จากการเปลี่ยนแปลงความเค็มต่อระดับออสโมลาริตี้ การใช้ออกซิเจน และการขับแอมโมเนียในร่างกาย พบว่าที่ระดับความเค็ม 20-35 ppt มีความสัมพันธ์ต่อระดับของออสโมลาริตี้ในน้ำเลือด 687.7 และ 1033.6 m. Osmol/kg. แต่การใช้ออกซิเจนจะลดลงเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการขับแอมโมเนียออกจากร่างกาย Setiarto, *et al.*, (2004) กล่าวว่า กุ้งคุรุม่า *Marsupenaeus japonicus* ระยะวัยรุ่นระดับออสโมลาริตี้ในน้ำเลือดกุ้งมีสภาพเป็น hypo-osmotic ส่วนในกุ้งใหญ่ เป็น hyper-osmotic และความเค็มลดลง 5-10 ppt. ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งลดลง 30 % ของกุ้งที่เลี้ยงในน้ำเค็มปกติ (25 ppt) (Gong, *et al.* ,2004)

ผลของความเค็มสูง 40 ppt และค่า pH 5.5 ในน้ำเลี้ยงต่อองค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนต่างกัน พบว่า ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำลดลงทุกชุดทดลองไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะปกติซึ่งมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 1.63- 1.89 มก.% ส่วนน้ำตาลกลูโคสมีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงแรก และชั่วโมงที่ 6 มีค่าเฉลี่ยต่ำสุด 30.94-33.84 มก.% ส่วนการทดสอบในน้ำจืดทันที พบว่าปริมาณของโปรตีนในน้ำเลือดและน้ำตาลกลูโคสของกุ้งกุลาดำลดลงมากกว่าในการเปลี่ยนแปลงเป็นความเค็มสูง กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2 % เมื่อทดสอบความทนนานในน้ำจืดทันที การควบคุมระดับโปรตีนในน้ำเลือดไม่แตกต่างกับในชุดควบคุม แต่ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสพบว่าอาหารที่ผสมเบทาอีนสามารถรักษาระดับของน้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$) และการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำในรอบวันมากอาจมีผลทำให้กุ้งเกิดความเครียด และส่งผลต่อปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด และหลังการลอกคราบจะมีระบบภูมิคุ้มกันลดลง สภาวะเครียดในกุ้ง Santos and Nary (1987) กล่าวว่าปริมาณของน้ำตาลกลูโคสของปูปากแม่น้ำ(estuarine crab) (*Chasmagnathsu granulate*) ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อถูกย้ายจากน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ไปน้ำจืด

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ยังเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ซึ่งผลจากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543ข) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในน้ำจากปกติ เป็น 6.0ไม่มีผลต่อปริมาณ

ของเม็ดเลือดทั้งหมด การจับกินสิ่งแปลกปลอม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ แต่ พรเลิศ และคณะ(2541ก) กล่าวว่าการลดค่า pH ของน้ำเป็น 6.0 มีผลทำให้การจับกินสิ่งแปลกปลอมของน้ำเลือดลดลง 54% และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในน้ำเลือดลดลง 31 % เมื่อเปรียบเทียบกับในสภาพปกติ ทั้งนี้ไม่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ผลของเบทาอีนต่อระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำจากการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำจากปกติเป็นความเค็มสูง ไม่มีผลต่อปริมาณของเม็ดเลือดทั้งหมด การจับกินสิ่งแปลกปลอม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อย แต่ละชุดทดลองไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำสามารถทนทานในน้ำเค็ม 40 ppt สามารถปรับตัวได้ดี แต่เมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นน้ำจืดทันที มีผลทำให้ปริมาณของเม็ดเลือดของกุ้งลดลงมากกว่า 50% ของความเค็มปกติ ซึ่งจะทำให้การจับกินสิ่งแปลกปลอมและความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลง การควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1 และ 2 % กับชุดควบคุมพบว่าไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มไม่ว่าความเค็มสูงหรือต่ำการปรับควบคุมสมดุลในร่างกายของกุ้งกับสภาพแวดล้อมนั้นๆ เกิดขึ้นตลอดเวลา กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผลมเบทาอีนเพียง 1% ก็เพียงพอต่อการควบคุมสมดุลในร่างกาย และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ผลการเกิดความเครียดของกุ้งจากการเปลี่ยนแปลงของความเค็มจากน้ำเค็มปกติเป็นน้ำจืดทำให้กุ้งเกิดความเครียด โดยอาการของกุ้งที่แสดงออกในขั้นต้นคือ การกระวนกระวาย ว่ายน้ำตลอดเวลา และเริ่มอ่อนแอ การว่ายน้ำหรือเคลื่อนที่ช้าลง และนอนจมในน้ำ มีการแลกเปลี่ยนของเกลือแร่ต่างๆ ที่เหงือกตลอดเวลา ทำให้จำนวนของเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองลดลง และการสร้างเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ เปลี่ยนไป ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมและกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงเช่นกัน สอดคล้องกับ กิจการ และคณะ (2543ง) กล่าวว่า ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมภายนอกในการเลี้ยงกุ้ง เช่น ค่า pH ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ หรืออุณหภูมิไม่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้ง แต่มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงลดลง โดยฉพาะเมื่อปล่อยให้อยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ซึ่อาจมีผลทำให้กุ้งตายได้ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมมีความแปรปรวนสูงในกุ้งแต่ละตัวการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หรือการป้องกันตัวเองไม่ได้เกิดเฉพาะในเม็ดเลือดอย่างเดียว แต่ยังพบในซีรัมของกุ้งด้วย (Parrazzolo and Barracco, 1997)

การลดของความเค็มของน้ำเป็นน้ำจืดทันที มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ทำให้ปริมาณของเม็ดเลือดลดลง ซึ่งมีผลต่อการจับกินสิ่งแปลกปลอม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงเช่นกัน สอดคล้องกับกผลการศึกษาของ Wong and Chen (2005) รายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของความเค็มจากปกติ 25 ppt. เป็น 5, 15, 25 และ 35 ppt. ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาววานาไม *(L. vannamei)* พบว่า ความเค็มของน้ำที่ 5 และ 15 ppt. ภายใน 12 ชั่วโมง จำนวนของเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งลดลง มีผลทำให้ความว่องไวเอมไซม์ฟีนอลออกซิเดส การจับกินสิ่งแปลกปลอมในน้ำเลือดลดลง และความต้านทานเชื้อ (clearane efficiency) *Vibrio alginolyticus* ลดลง 30-40% เช่นเดียวกับในกุ้งก้ามกราม การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (25 และ 30^0C) pH (7.27) ความเค็ม (5 และ10 ppt) ในน้ำ ประสิทธิภาพของการจับกินสิ่งแปลกปลอม และความต้านทานเชื้อ *Lactococus garvieae* ของกุ้งก้ามกรามดีที่สุด ส่วนปริมาณแอมโมเนียในน้ำ 0.55 มก./ล. ทำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันลดลง (Chen, *et al.,* 2003) โดยทั่วไปแล้วระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำสามารถกำจัดแบคทีเรียให้ออกจากระบบการหมุนเวียนเม็ดเลือด โดยมีกลไกของระบบต่างๆ คือ ฟาโกไซโตซีส เอ็นแคปซูเลชั่น หรือระบบโปรฟีนอลออกซิเดส เข้ามาทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรคในร่างกาย (Smith and Ratetiffe, 1980) ซึ่งกลไกการทำงานต่างๆ จะมีเม็ดเลือดหลายชนิดทำหน้าที่ร่วมกัน ในการทดลองการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเพื่อให้กุ้งอยู่ในสภาวะเครียด เนื่องจากความเค็มน้ำที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงจนเป็นน้ำจืด สภาวะค่า pH ลดลงจนเป็นกรด จะส่งผลทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโรคในน้ำเลือดกุ้งลดลง แต่ถ้ากุ้งสามารถปรับตัวได้ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะสามารถทำงานเป็นปกติได้เช่นกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาผลของการเสริมสารเบทาอีน 1 และ 2% ในอาหารกุ้งกุลาดำต่อการเจริญเติบโต สมดุลออสโมซีส องค์ประกอบของเลือดกุ้ง และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ สรุปได้ดังนี้

1) การเสริมสารเบทาอีนในอาหาร 1% ทำให้กุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตโดยน้ำหนักน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะแตกต่างกับกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมสารเบทาอีน ($p<0.05$) ส่วนประสิทธิภาพการใช้อาหาร ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งกุลาดำไม่ต่างกัน

2) ผลการเสริมสารเบทาอีนในอาหารระดับต่างๆ ต่อสมดุลออสโมซิส และอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ ต่อการควบคุมระดับออสโมลาริตี้และอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดไม่ต่างกัน ($p>0.05$) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน 1% การรักษาสมดุลออสโมซีสและอิออนต่างๆ ในน้ำเลือดสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริมเบทาอีนหรือเสริมเบทาอีน 2 %

3) การเสริมสารเบทาอีนในอาหารกุ้งกุลาดำ ต่อองค์ประกอบทางเคมีในน้ำเลือด ได้แก่ ปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำตาลในน้ำเลือดไม่ต่างกัน ($p>0.05$) แต่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ เพราะอาหารที่ผสมเบทาอีน 1- 2% ในอาหารมีผลทำให้ระบบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้ดีกว่าเลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมสารเบทาอีน โดยเฉพาะการจับกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ($p<0.05$)

4) ผลความทนทานของกุ้งกุลาดำต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมการเลี้ยง หลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารเสริมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน โดยเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำจากปกติให้มีความเค็มสูง (40 ppt) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (5.50) ไม่มีผลทำให้กุ้งเกิดอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้น เนื่องจากกุ้งกุลาดำทุกชุดทดลองสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงมีอัตรารอดสูง แต่การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากปกติเป็นน้ำจืด (0 ppt) ทันที ทำให้กุ้งกุลาดำมีการตายสะสม 100 % ภายใน 12 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

5) การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงจากปกติให้มีความเค็มสูง (40 ppt) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 ไม่มีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีนระดับต่างๆ กัน ต่อสมดุลของระดับออสโมลาริตี้ องค์ประกอบของเลือด และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้ง ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาพปกติ แต่กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงลดลงได้หลังจากระยะเวลาผ่านไป 6- 12 ชั่วโมงโดยไม่มีผลต่ออัตราการตายสะสม การควบคุมสมดุลของออสโมซิส และแลกเปลี่ยนอิออนต่างๆ ในน้ำเลือด ตลอดจนองค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาทดลองในครั้งนี้ยังไม่เห็นผลที่แน่นอน การนำสารเบทาอีนมาใช้ในอาหารสัตว์น้ำมีแนวทางในการปฏิบัติ ดังนี้

1. การเสริมสารเบทาอีนในอาหารสัตว์น้ำ ควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสม เพียง 1 % ในสูตรอาหาร ก็เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำ

2. ควรเสริมเบทาอีนในอาหารเฉพาะช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในบ่อคุณภาพน้ำลดลง เท่านั้น เพื่อลดความเครียดจากการปรับสมดุลในร่างกายของกุ้งในขณะนั้น

3. ควรทำการทดสอบความต้านทานเชื้อโรค (disease resistance) ของกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงด้วยอาหารผสมเบทาอีน เพื่อศึกษาแนวทางในการป้องกันโรคระบาดจากเชื้อแบคทีเรีย หรือไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นรินทร์ สงสีจันทร์. 2543ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : IV การศึกษาค่าปกติของระบบภู้มคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 (ฉบับพิเศษ): 597-603

_____ จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : V ผลของอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ และความเป็นกรด-ด่างต่อระบบภู้มคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 (ฉบับพิเศษ): 605-613

_____ วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudoff Hoffmann. 2543ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588

_____, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : I เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2551. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2549. **<u>เอกสารฉบับที่ 8/2551</u>**. ศูนย์สารสนเทศ. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

เกษฎา มณีรอด. 2549. **ผลของเบทาอีนต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์โภชนะในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แขวลี วิบูลย์กิจ, สิทธิโชค จันทร์ย่อง, สุรียัน ธัญกิจจานุกิจ, ประจวบ หลำอุบล และ สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี, 2547. ความเข้มข้นของเกลือแร่ในกุ้งกุลาดำก่อนวัยเจริญพันธุ์และพ่อแม่พันธุ์. น. 85-92. *ใน*. **รายงานการวิจัย การปรับปรุงพันธุกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*,**

Fibricius) ให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการเลี้ยงในสภาพความเค็มต่ำ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

จริยา สนิทชน. 2549. **ผลของเบทาอีนต่อการเจริญเติบโต กิจกรรเอมไซม์ในทางเดินอาหาร การสังเคราะห์โปรตีนของกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (*Penaeus monodon*, Fabricius)** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุวรรณ มหิทธิ. 2541. **ผลของการเปลี่ยนแปลงความเค็มต่อการปรับสมดุลไอออนในกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon* Fabricius.)** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทริกา ซันซื่อ. 2538. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Shrimp Immune system). น. 332-342. *ใน*. **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตว์แพทย์ ครั้งที่ 22.** สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

นิเวศน์ เรืองพานิช. 2529. **วิธีการเพาะฟักกุ้งทะเล.** สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา, กรมประมง.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. **ความสำคัญของแร่ธาตุกับการเลี้ยงกุ้ง.** เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ บริษัทซิสเคมอครีคัลเจอร์รัล จำกัด, กรุงเทพฯ.

บังอร ศรีมุกดา. 2530. **การเพาะกุ้งกุลาดำ.** กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ประจวบ หลำอุบล. 2527. **กุ้ง.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____ 2543. **สรีรวิทยาของกุ้ง.** คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2534. อาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. **ว. การประมง** 44 (4): 329-342

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, นภดล ศุกระกาญจน์ และ สัมพันธ์ ปานจรัตน์. 2541ก. ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมบางประการต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

(*Penaeus monodon* Fabricius). น. 35-42. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, นภดล ศุกระกาญจน์ และ สัมพันธ์ ปานจรัตน์. 2541ข. ผลของ β-1, 3-glucan ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immune response) ของกุ้งกุลาดำ. น. 43-52. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มะลิ บุญยรัตนผลิน. 2531. **อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ**. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์ช่องนนทรี, กรุงเทพฯ.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และ ไพพรรณ พรประภา. 2544. **การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ : เล่ม 1 การจัดการคุณภาพน้ำ**. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

รุจิเรข บำราศอรินทร์พ่าย. 2546. **การศึกษาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยน้ำความเค็มต่ำ 2 ระดับ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. 2539. **วิทยาภูมิคุ้มกัน.** คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,กรุงเทพฯ.

วราห์ เทพาหุดี, ชะลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, ธัญญนันท์ สุนทรมังคโล, พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และ เต็มดวง สมศิริ. 2547. การศึกษาวิธีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบปิดแบบต่างๆ, น 299-318. *ใน* **สัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง การวิจัยเพื่อแก้ปัญหาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.** กรุงเทพฯ.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. **โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ**. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิทธิโชค จันทร์ย่อง. 2545. **ผลของความเค็มต่างระดับและเกลือแร่บางชนิดต่อการพัฒนารังไข่และการวางไข่ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลศรี พิมลพันธุ์, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงศ์ และ สิริกฤษ์ ทรงวิไล. 2542. **อิมมูโนวิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์ พีพีเอสไซเอนซ์ เทคนิคอล , กรุงเทพฯ.

สุธีวัฒน์ สมสืบ, พิสมัย สมสืบ, มะลิ บุณยรัตผลิน และ อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2539. การทดสอบปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อกุ้งกุลาดำ, น. 354-366. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาประมง**, กรุงเทพฯ.

สุพิศ ทองรอด. 2535. ความสำคัญของไขมันในอาหารสัตว์น้ำ (The role of fat in fish feed). **ว.การประมง,** 45(4): 943-950

ส่งศรี มหาสวัสดิ์ . 2533. **สรีรวิทยาสัตว์น้ำ.** ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

โสมทัต วงศ์สว่าง. 2538. **วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตว์แพทย์.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตว์แพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อดิษฐ์ ศุภไพบูลย์. 2549. **ผลของเบทาอีนต่อความทนทานความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็ม อุณหภูมิ และความเป็นพิษเฉียบพลันของแอมโมเนียในกุ้งกุลาดำวัยรุ่น (*Penaeus monodon*, Fabricius).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องอาจ เลาหวินิจ. 2533. **ภูมิคุ้มกันวิทยา. เอกสารประกอบการสอน วิชาจุลชีววิทยาทางสัตว์แพทย์ II.** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตว์แพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Akiyama, D.M. and W.G. Dominy. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry**. American Soybean Association,**. Singapore.

Anonymous. 1996. **The Finstim Briefing.** Finsugar bioproducts. 64 p.

_____ 2003. Betaine. **Alternative Medicine Review** 8(2) : 193-196.

Alava, V.R. and C. Lim, 1983. The quantitative dietary requirement of *Penaeus monodon* juvenile in a controlled environment. **Aquaculture** 30: 53-61.

_____ and F.P. Pascual. 1987. Carbohydrate requirement of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles. **Aquaculture** 61: 211-217.

AOAC (Association of Official Analysis Chemists). 1990. **Official Methods of analysis .13th ed.,** Association of Official Analytical Chemists. Verginia.

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

Baggott, J. 1994. **Net Biochem**. Department of Biochemistry, MCP Hahnemann school ofmedicine, Philadelphai.

Bautista, M.N. 1986. The response of Penaeus monodon juveniles to varying protein/energy ratios in test diets. **Aquaculture** 53:229-242.

Borja, P. and S.B. Rasalan. 1968. Aview of the culture of Sugpo, *Penaeus monodon* ***in*** **:the Philippines. FAO.Fish. Report**. 57(2) : 11-123.

Boye, C.E. 1990. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agriculture Experiment Stations, Auburn Univesity, Auburm. Alabama.

Brown, M.E. 1957. **The Physiology of Fishes.** Vol.1. Academic Press, New York.

Burg, M.B. 1992. Molecular basis for accumulation of compatible osmolytes in mammalian cell**.** *In* **: G.N. Somero, C.B. Osmond and Boi, C.L.(eds) : Water and Life** , Springer Verlag, Berlin/Heidellberg.

Cadongan, D.J., R.G. Campbell, D. Harrison and A.C. Edwards. 1993. The effects of betaine on growth performance and carcass characteristics of female pigs. *In* **Batterham, E.S. (ed.), Manipulating Pig Production IV. Australasian Pig Science Assocation**, Attwood, Victoria, Australia, 219 p

Cahu. C. 2001. Nutrition and feeding of penaeid shrimp laevae., pp. 253 - 262. *In* J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot and R. Metailler, eds. **Nutrition and feeding of fish and crustaceans.** Praxis publishing, Chichester, UK.

Carr, W. E. S. 1978. Chemoreception in the shrimp, Palaemonetes pugio: the role of amino acid and betaine in the elicitation of a feeding response by extracts Comp. **Biochem. Physiol.,** 61:127-132

Chen, H.Y., Y.T. Leu. and I. Roelants. 1992. Effective supplementation of arginine in the diets of juvenile marine shrimp. *Penaeus monodon*. **Aquaculture** 108: 229-233

Chen, J.C. and J.L. Lin. 1994. Osmolarity and chloride concentration in the haemolymph of subadult *Penaeus chinensis* subjected to different dalinity. **Aquaculture**. 125:167-174.

Chen, J.E., F.H. Nan., S.Y. Cheng., and Sheen S.S. 1993. Effects of ambient ammonia on ammonia-N and protein concentration in hemolymph and ammonia-N execretion of *Penaeus chinensis*. **Mar. Eco**l. 98 : 203-208.

Cheng, W., S.M. Chen, F.I. Wang, P.I. Hsu. C.H. Liu and J.C. Chen. 2003. Effects of Temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance

efficiency of giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcocus garvieae*. **Aquaculture**. 219: 111-121.

Coman, G.J., H.Z. Sarac, D. Fielder and M. Thorne. 1996. Evaluation of crystalline amino acids, betaine and AMP as food attractants of the Giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Biochem. Physiol.** 113A (3): 247-253.

Davis, D.A., Lawrence A.L. and Gatlin D.M. I. 1993. Response of Penaeius vanamei to dietary calcium, phosphorus and calcium : phosphorus ratio.. **J. World Aquacult. Soc.** 24 : 504 - 515.

Felix, N. and M. Sudharsan. 2004. Effect of glycine betaine a feed attractant a effetive groueth and feed connecsion of juvenile freshwater prawn. *Macrobracium rosenbergii.* **Aquaculture Nutrition**. 90 : 193-197.

Fernandez-Figares, I., D. Wray-Cahen, N.C. Steele, R.G. Campbell, D.D. Hall and E. Virtanen. 2002. Effect of dietary betaine on nutrient utilization and partitioning in the young growing feed-restricted pig. **J. Anim. Sci.** 80: 421-428

Ferraris, R.P., F.D. Parado-Estepa, J.M. Ladja and E.G. De jesus.,. 1986. Effect on salinity on the osmtic, chloride, total protein and calsium concentration in the hemoglymph of prawn *Penaeus monodon* (Fabricius).. **Comp. Biochem physiol.** 66 (C): 217-224.

_____, _____, E.G. Jesus and J.M. Ladja. 1987. Osmotic and chloride regulation in the hemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon* during moilting invarious salinity. **Mar. Bio**. 95(3) : 377-385.

Goddard. S. 1996. **Feed management in intensive aquaculture.** Chapman & Hall Inc. New York.

Goh, T. and T. Tamura., 1980. Olfactory and gustatory responses to amino acids in two marine teleosts – red sea bream and mullet. **Comp Biochem. Physiology**. 66C : 217-224.

Gong, H., D.-H. Jiang, D.V. Lightner, C. Colling and D. Brock. 2004. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert. **Aquacuture Nutrition.** 10: 227-236.

Hall, M.R. and E.H. Van-Ham. 1998. The effects of diffeerrnt type of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. **J. World Aquaculture Soc**. 29(3): 290-299.

Halver, J.E. 1989. **Fish Nutrition** . Second Edition. Academic Press, New York.

Harpaz, S. 1997. Enhancement of growth in juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, through the use of chemoattractant. **Aquaculturer** 156: 225-231

Hose, J.E., G.E. Martin, V.A. Nguyen, J. Lucus. And T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Bio. Bull. Mar. Bio. Lab. Woods. Hole.** 173(1): 178-187.

Itami, T., Y Takahashi, E. Tsuchihira, L. Higusa. and M.Konda. 1994. Enchantment of disease resistane of Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in pagocytosis activity of prawn hemocytes ater oral adminidtration of β-1,3,-glucan. *In* The third asian fisheries forum. **Proceding of the third asian fisheries forum.** Singapore.

Jacob D., J. Timothy and A. Timothy. 1998. An assay for betaine-homocysteine methyltransferase activity base on the microbiolohycal detection of methionine. **J. Nutr. Biochem.** 9:351-354

Kasper, C.S. M.R. Craig, White and P.B. Brown. 2002. Betaine can replace choline in diet juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture.** (205): 119-126.

Lackie, A.M. 1986. **Immune mechanism in invertebrte vectors.** Clarendon press, Oxfoed.UK.

Lovell, R.T. 2002. Diet and fish husbandry., pp. 703-754. *In* J.E. Halver and R.W. Hardy, eds. **Fish nutrition 3th.** Elsevier Science, USA.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the foline phenol reagent. **J. Biol. Chem**. 19 : 265-275.

Mackie, A.M. and A.I. Mitchell. 1980. Further studies on the chemical control of feeding behavior in the Dover sole, *Solea solea***. Biochem. Physiol**. 73A:89-93.

_____. _____. 1983. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for the juvenile European eel, *Anguilla anguilla* (L.). **J. Fish. biol.** 22:425-430

_____._____. 1985. Indentification of gustatory feeding stimulant for fishapplications in aquaculture. pp. 177-189. *In* Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (eds.), **Nutrion and Feeding in Fish**. Academic Press, London. UK.

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

Marui, T., R.E. Evans ., B. Zielinski, and T.J. Hara. 1983. Gustatory responses of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) palate to amino acids and derivatives. **J. Comp. Physoil.** 153: 423-433.

Millamena, O.M., M.N. Bautista-Teruel and A. Kanazawa. 1996. Valine requirement of postlaval tiger shrimp *Penaeus monodon.* **Aquaculture Nutrition**. (in press)

Miller, A.L. 2003. The methionine-homocysteine cycle and as affects on cognitive disesses. **Altern Med Rev**. 8: 7-19.

Millian, N.S. and T.A. Garrow. 1998 Human betaine–homocystiene methyltransferase is a zine metalloenzyme. **Arch Biocherm Biophys**. 356 : 93 – 98.

Moullac, G.L., M.L. Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard and P. Levy. 1997. Haematological and phenaloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle : protection against vibriosis. **Fish & Shellfish Immunol**. 7:227-234.

Murai, T., A. Sumalangcay and F.P. Pascual. 1983. Supplement of Various attractants to a practical diet for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius. **Fisheries Research Jounal of the Philippines**. 8: 2-6.

National Research Council, 1983. **Nutrient Requirements of Fish.** National Academy Press, Washington, D.C.

_____, 1993. **Nutrient Requirements of Fish.** National Academy Press, Washington, D.C.

Papatryphon, E. and J.H. Soares. 2000. Indentification of feeding stimulants for striped bass, Morone saxitilis. **Aquaculture.** 185: 339-352.

Parrazzolo, L.M., and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factor. **Dev. Comp. Immunol**. 21(5): 385-295.

Penaflorida, V. and E. Vertanen. 1996a. Effects of FinnStim on growth and sea water adaptation of coho salmon. **Aquaculture.** 168: 423-429.

_____. 1996b. Growth, survival and feed conversion of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) fed a betaine/amino acid additive. **Aquaculture.** 170: 862-869.

Rodrigurez, G.A. 1981. Osmoreguration and totalserum protein of two species of penaeidean shrimp from the pacific coat of mexico. **J.Crust. Biol.** 1 (3): 392-400.

Rumsey, G.L. 1991. Choline-betain requirement of rainbow trout. **Aquaculture**. 95 : 107-116.

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

Schwahn B.C, Hatner D. And Hohlfeld T. 2003. Pharmacokinetics of oral bataine in healthy subjects and patients with homocystinuria. **Br. J. Clin Pharmacol.** 55 : 6-13.

Setiarto, A., C.A. Strussmann, F. Takashima and S. Watanabe. 2004. Short-term responses of adut kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate) to environmental salinity: osmotic regulation, oxygen consumption and ammonia excretion.. **Aquaculture Research.** 35: 669-677.

Shiau. S.Y., 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. **Aquaculture**. 164 : 77-93.

_____. 1998. Nutrient requirement of penaeid shrimps. **Aquaculture.** (164): 11-93. *Cited* O. Deshimaru and Y. Yone. 1978. Requirements of prawn for dietary menerals. **Bull. Jpn. Soc Sci, Fish.** (44): 907 - 910.

_____. 1998. Nutrient requirement of penaeid shrimps. **Aquaculture** (164): 11-93. *Cited*. A. Kanazawa, S. Teshima, and S. Sasaki. 1984. Requirement of juvenile prawn for cancium, phosphorus, mangnesium, potassium. Copper, manganese and iron. **Mem. Fac. Fihs. Kogoshima Univ.** 33: 63-71.

_____. 1998**.** Nutrient requirements of penaeid shrimps. **Aquaculture** 164 (77-93). *Cited* C.H.Liou and S.D.Yang. 1994. Dietary methionine requirements of *Penaeus monodon*.

A paper presented at the Annual Meeting of Taiwan Fisheries Society. Dec. 5-8, Taipei, Taiwan.

_____, K.C. Wok. And B.S. Chou. 1991. Optimal dietary protein level of *Penaeus monodon* reared in seawater and brackish water. **Aquaculture.** 102 : 347-353.

_____, and C.Y. Peng. 1994. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*. **Aquaculture.** 125 : 139-145.

Sindermann, C.L. and D.V. Lightner. 1998. **Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture**. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

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

_____, and N. Ratcliffe. 1980. Cellular defense reaction the shore crab. *Carinus maenas*. **J. Inver Pathol.** 35 : 333-346

_____ . and K. Soderhall. 1983. β-1,3 Glucan activation of crustacean hemocytes. in vitro and in vivo**. Biol. Bull.** 164 (2) : 299 – 314.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustracean immunity. **Annual Rev of Fish Diceases**. 2: 3-23.

_____, L. Cerenius and M.W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. *In* : Sodehall, K., S. Iwanga, and G.R. Vasto. (Eds) , **New directions in invertebrate immunology**. Sos publication fais haven : 229-253

Spaargaren, D.H. and P.A. Haefner. 1987. The effect of environmental osmotic condition on blood and tissue glucose levels in the brown shrimp, Carngon carngon(L). **Com. Biochem. Physiol**. 87A (4) :1045-1050.

Sritunyalucksana, K., L.Cerenius and K. Soderhall. 1999. Molecular cloning and charaterrization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon.* **Dev. Comp. Immunol**. 23(3):179-186.

Sung, C.P. and R.M. Johnstone. 1969. Evidence for the existence of separate transport mechanism for choline and betains in rat kidney . **Biochim. Biophys. Acta.** 173:543-553

Sung , H.H., Y.L. Yang and Y.L. song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crustacean. Biol.** 16: 278-284.

Takaoka, O., K. Takii, M. Nakamura and M. Takeda . 1995. Indentification of feeding stimulants for tiger puffer. **Fish. Sci**. 61: 833-836.

Takeda, M. and K. Takii. 1992. Gustation and nutrition in fishes: application to aquaculture. *In* **Fish Chemoreption (ed. T.J. Hara)**. Chapman & Hall, London, 271-281p.

Virtanen, E. and L. Rosi. 1995. Effect of betaine on methoinine requirement of broilers under various environmental conditions. **Proc. Aust. Poult. Sci. Sym**. 7: 88-92.

_____, E., R. Hole., J.W. Risink., K. E. Slinning. and M. Junnila. 1994. Betaine/amino acid additive enhances the seawater performance of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) fed standard fish-meal-based diets. **Aquaculture,** 124 : 219-222.

_____, M. Junnila. and A. Soivio. 1989. Effect of Food containing betaine/amino

acid additive on the osmotic adaptation of young Atlantic salmon, *Samol salar* **Aquaculture**. 83: 109-122.

_____, _____ , K.E. Slinning. and R. Hole. 1992. Betaine Supplementation enhances the seawater adaptation of salmon . **Aquaculture**. 101 : 226-239

Wang, L.U. and J.C. Chen. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. **Fish & Shellfish Immunology.** : 269-278.

Wunz, T.M. and Wright, S.H., 1993. Betaine transport in rabbit renal brush-border membrane vesicles. **J. Physiol**. 264 : 948-955.

Yancey, P.H. 1992**. Compatible and counteracting aspects of organic osmolytesin mammalian kidney cell in vivo and in vitro**. *In:* G.N. Somero, C.B. Osmond and C.L. Boi.(eds)9 : Water and Life , pp. 33-51, Springer Verlag, Berlin/Heidellberg.

ภาคผนวก

วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง

1. การวิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ (osmolarity)ในน้ำเลือดกุ้ง

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งแต่ละตัวไปวิเคราะห์ค่าออสโมลาริตี้ในเลือดกุ้ง โดยดูดเลือดกุ้งบริเวณ ventral sinus 100 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ทันที เพื่อหาค่าออสโมลาริตี้ด้วยเครื่อง Osmometer (the advanced osmometer :3D3)

2.วิธีวิเคราะห์ค่าอิเลคโตรไลท์ (serum electrolyte) คือ Na^+ Cl^- และ K^+

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งแต่ละตัวโดยดูดเลือดมา 200 ไมโครลิตร นำไปวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์ Eletrolyte analyzer (Ciba corning : 644) เพื่อหาค่า Na^+ Cl^- และ K^+

3.ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (protein in haemolymph) ตามวิธี Lowry *et a*l.(1951)

การเตรียมสารละลาย

Reagent A : 2% (W/V) $NaCO_3$ ละลายใน 0.1 M NaOH

Reagent B : 0.5% $CuSO_4$ ละลายใน 1% Patassium tatrate

Reagent C : 50 มล. A + 1 มล.B

Reagent D : Folin 1 + น้ำกลั่น 2 ส่วน

*Reag A และ B เก็บในตู้เย็นไม่เกิน 1 เดือน Reag C และD เตรียมแล้วใช้ทันที แช่เย็นตลอดเวลา

*Blank: suspendion buffer (caco) 0.3 มล.+ น้ำกลั่น 1.8 มล. เขย่าด้วย voltex แล้วนำมา 0.5 มล. + reagent C 5 มล. + reagent D 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

1) หมุนเหวี่ยงแยกซีรั่มที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นำเฉพาะซีรัมมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยเจือจางซีรั่มกุ้งแต่ละตัว 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น (0.1 มล.ซีรั่ม + 0.9 มล. น้ำกลั่น) เขย่าให้เข้ากัน

2) ดูดซีรั่มกุ้งที่เจือจางแล้วมา 0.1 มล. จากนั้นเติม 1 มล. สารละลาย alkaline copper solution : reagent C เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 10 นาที

3) เติมสารประกอบ folin reagent : reagent D 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้ Sodium carbonate รวมกันกับโปรตีนทิ้งไว้ แล้วเติม สารประกอบโฟลีนอีก reagent D 0.1 มล. (จะทำให้โปรตีนแต่ละตัวที่มี ไอออนอยู่เกิดสีขึ้น หลังจากเติม reagent C. ไป กลุ่มของ copper ที่แยกตัวออกมาจะเข้าแทนที่ copper ที่มีอยู่ในโปรตีนเดิม ทำให้สามารถวัดความเข้มข้นของ enzyme ที่ได้จากการไปสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนทั้งหมด ทิ้งไว 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง 28^0C

4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ albumine

สารละลายมาตรฐาน BSA ละลาย bovine serum albumine 1.0 มก. ในน้ำกลั่น Deionized 10 มล. แล้วเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำกลั่น DI ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้น 10-100 ไมโครลิตร /มล. ควรทำStandard ทุกครั้งที่วัด เนื่องจากสารเคมีต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด (blood glucose) (Wedemcyer, *et al.,* 1977)

การเตรียมสารละลาย

- สารละลาย TCA (trichloro acetic acid) 3% ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บในอุณหภูมิห้อง
- Color reagent ละลาย thio urea 1.5 กรัม ใน glacial acetic acid 940 มล. เติม O-tuluidine 60 มล. ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง
- Boric acid 0.2% ละลาย Boric acid 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.
- สารละลายมาตรฐาน Glucose (100 mg/100 มล.) ละลาย glucose 0.1 กรัม ในสารละลาย boric acid 0.2% 100 มล.l เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิเคราะห์ boold glucose

1) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มม. ดูดเลือดกุ้งโดยไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัว ให้ได้ปริมาณ 0.2 มล. ถ่ายใส่หลอดพลาสติกและทำการวิเคราะห์ทันที โดยเติมน้ำเลือด 0.1 มล. ในหลอดพลาสติกที่มีสารละลาย TCA 3% 1 มล.

2) ผสมให้เข้ากันทันที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 นาที แยกส่วนใส 0.5 มล. เติมในหลอดทดลองขนาด 10 มล. ที่มี color reagent 4.5 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปแช่น้ำเดือด 8 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เทียบกับสารละลาย Trichloro acetic acid (TCA) 3% 0.5 มล. แทนสารละลายตัวอย่าง (blank) แล้วนำปริมาณกลูโคสในเลือดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน

อุปกรณ์สำหรับเตรียมสารละลาย เครื่องแก้ว ขวดเก็บสารเคมี และน้ำกลั่นสำหรับเตรียมสารจะต้องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. M-199 ละลาย M-199 1 ซอง น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปรับปริมาตร 500 ml แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 μm (เก็บในตู้เย็น ได้ 1 เดือน ถ้าตกตะกอนเตรียมใหม่)
2. Salt mixture ประกอบด้วย
   - KCl 0.4 กรัม
   - $MgCl.6H_2O$ 3.3 กรัม
   - $MgSO_4.\ 7H_2O$ 3.0 กรัม
   - $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.05 กรัม
   - ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปรับปริมาตร 100 มล. เก็บในตู้เย็น
3. NaCl ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 100 มล.
4. $CaCl_2.\ 2H_2O$ ละลาย $CaCl_2.\ 2H_2O$ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น100 มล.
5. L-glutamine ละลาย L-glutamine ในน้ำกลั่น 1 มล. ผสมให้เข้ากันสารนี้เตรียมใช้ทันที
6. Hepes 0.238 กรัม เตรียมใช้ทันที

การเตรียมสารละลาย K-199 จำนวน 100 ml ที่ pH 7.3-7.6

- สารละลาย M-199 solution 50 มล.
- สารละลาย Salt mixture 10 มล.
- สารละลาย NaCl 10 มล.
- สารละลาย $CaCl_2$. $2H_2O$ 10 มล.
- สารละลาย L-glutamine 1 มล.
- Hepes 0.238 กรัม
- น้ำกลั่น De-ionzed water ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

(สารละลายนี้เตรียมแล้วเก็บในตู้เย็น ใช้ทันที เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

การเตรียมสารละลายป้องกันการแข็งตัวของเลือดกุ้ง

เตรียมจาก สารละลาย K-199 100 มล. ผสม L-cysteine 5% (5 กรัม) หรือ Sodium citrate dihydrogen ($C_6H_5Na_3.2H_2O$) 10% (1กรัม)

5. วิธีนับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ

1) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. เข็มเบอร์ 24 ดูด anticoagulant สำหรับละลายเซลล์เม็ดเลือด อัตราส่วน 1:1

2) ดูดเลือดกุ้งจาก บริเวณ ventral sinus ผสมเลือดกับสารละลายให้เข้ากัน

3) หยดสารละลายน้ำเลือดกุ้งบนสไลด์นับเม็ดเลือดฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacyto meter) นับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้ว คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นปริมาณ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากสูตร

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง x ยาว สูง

= 1 มม. x 1 มม. x 0.25 มม.

= 0.1 ลบ.มม^3

จำนวนแซลล์เม็ดเลือด / ลบ.มม^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

6. การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity)

การเตรียมสารละลาย Shrimp saline 1000 มล.

- NaCl 28.4 กรัม
- $MgCl.6H_2O$ 10 กรัม
- $MgSO_4.\ 7H_2O$ 2.0 กรัม
- CaCl2. 2H2O 2.25 กรัม
- KCl 0.7 กรัม
- Glucose 1.0 กรัม
- Hepes 2.38 กรัม

ผสมสารละลายในน้ำกลั้น ปรับปริมาตร 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μm เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น

การเตรียมสารละลาย Cacodylate buffer pH 7.4

1) Stock solution

- สารละลาย Sodium cacodylate 0.2 M เตรียมจาก $Na(CH_3)_2.3H_2O$ 42.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้ง เก็บในตู้เย็น 4 ^oC (ใส่ถุงมือทุกครั้งที่เตรียม และทำใน hood เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง)

- สารละลาย HCl 0.2 M เตรียมจาก HCl cone. 73 มล./ลิตร เก็บในขวดแก้วฝาเกลียว

2) Working buffer solution (0.1 M cacodylate buffer)

- ใช้สารละลาย 0.2 M ($Na(CH_3)_2.3H_2O$) ปริมาตร 50 มล. ผสม HCl 0.2 M ปริมาตร 2.7 มล. เติมน้ำกลั่น 47.3 มล. ปรับ pH 7.4 ด้วย HCl 0.2 M ทีละน้อย สารละลายที่เตรียมแล้วเก็บในตู้เย็นตลอดเวลา

การเตรียม Heat-Killed Yeast

1) ละลาย baker's yeast ใน 0.9% NaCl Solution แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างต้มคนตลอดเพื่อไม่ให้ yeast ไหม้ (อาจใช้วิธี autoclave 1 ชั่งโมงก็ได้) ทิ้งให้เย็นตกตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้ง

2) น้ำสารละลาย yeast ที่ต้มสุกแล้วไปล้างด้วย shrimp saline 5 ml ปั่นความเร็วรอบ 3,000 rpm 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำการล้างทั้งสิ้น 5 ครั้ง

3) ละลาย yeast ที่ล้างแล้วด้วย shrimp saline อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย hymacyto meter ให้มีจำนวนเซลล์ยีสต์ ประมาณ 5 x 10^8 เซลล์/มล. เก็บในตู้เย็น

การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียม Hemocyte Lysate (HLS)

1) เก็บตัวอย่างเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.5 มล. ให้แช่ในถังน้ำแข็งตลอดทุกขั้นตอนการวิเคราะห์

2) ผสมกับ K-199 (modified M-199) pH 7.4 มีสารละลายแอลซิสเตอีน 5% (5% L-cysteine) เป็นสารป้องก้นเลือดแข็งตัว (anticoagulant) จนได้ปริมาตรครบ 1 มล.

3) ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{0}C เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ ดูดส่วนใสทิ้งไปและนำเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดที่รวบรวมได้จากกุ้งแต่ละตัว

4) นำตะกอนที่ได้มาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

5) ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonicator) ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

6) นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที ที่ 4^{0}C

7) แยกเฉพาะสารละลายส่วนใสซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไวใช้ในขั้นต่อไป

การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activity) วิเคราะห์ตามวิธีดัดแปลงจาก Smith and Soderhall (1983); Soderhall *et al.,* 1988) โดยใช้ L-DOPA (L-dihydroxyphelylalanine) เป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยา โดยมีวิธีการดังนี้

1) นำ HLS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายทริปซิน (0.1%trypsine ใน cacodylate buffer) ปริมาตร 200 ไมโคลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 นาที

2) หลังจากนั้นเติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, 4 มก./มล.) 200 ไมโครลิตร

3) ปล่อยทิ้งไวที่อุณหภูมิห้อง (28^{o}C) แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆช่วง 2 นาทีเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม

4) สารละลายควบคุมใช้ทรีปซิน ผสมกับ L-DOPA และ Cacodylate buffer แทน HLS

5) วัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

6) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธี Lowry et al., (1951)

7) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย/นาที (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามิน (dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001/นาที/มก. ของโปรตีนในสารละลาย โดยกำหนดค่าดังนี้

1 หน่วยของฟีนอลออกซิเดส $\Delta = OD_{490}$ / นาที / มก.โปรตีน

7. วิธีวิเคราะห์ Phagocytic activity

เทคนิคการวิเคราะห์ให้แช่ในถังน้ำแข็งตลอดทุกขั้นตอนการวิเคราะห์

1) เก็บเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 1 มล. ในหลอดฉีดยาขนาด 2.5 มล. ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1.5 มล.

2) เก็บสารละลายเลือดในข้อ 1 ลงในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดอยู่ 2.5 มล. (อัตราส่วนเลือดกุ้ง : anticoagulant = 1:4) ผสมให้เข้ากัน

3) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 5°C นำส่วนใสด้านบนทิ้งไปโดยใช้ dropper ดูดออกค่อยๆ ดูด อย่าให้ตะกอนเม็ดเลือดฟุ้งขึ้นมา

4) เติม shrimp saline 2-3 มล. โดยใช้ ไมโครปิเปต และค่อยๆ ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

5) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 5°C เพื่อล้างตะกอนโดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

6) ละลายตะกอนใน shrimp saline 1 มล. และค่อยๆ ใช้ ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

7) นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ trypan blue 50 ul และสารละลายเม็ดเลือด 50 ul ดูดใส่ hemocytometer นับจำนวน แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ ประมาณ 1 x 10^6 cell/ml.

8) นำสารละลายเซลล์จำนวน 200 ul เลี้ยงบน cover slip โดย spread ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9) หยดสารละลาย heat-killed yeast /2 มล. (5 x 10^8 cell/ml.) เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10) ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง หยดน้ำยา fixative 1 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

11) ผสม Giemsa stain 15 นาที ตั้งทิ้งไว 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน ย้อมสีด้วย eulitt หรือน้ำยาอื่น

12) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดโดยสุ่มนับจำนวนในแต่ละตัว 3 cover slip ประมาณ 300 เซลล์ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ Phagocytic

$$\% \text{ Phagocytosis} = \frac{\text{เซลล์ทั้งหมดที่กินเซลล์ ยีสต์(B)}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด(A)}} \times 100$$

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสุทิน สมบูรณ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	31 ธันวาคม 2513
สถานที่เกิด	อุดรธานี
ประวัติการศึกษา	ปี 2537 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาส่งเสริมและสื่อสารการเกษตร วิทยาลัยครูนครราชสีมา ปี 2546 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยบูรพา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการประมง
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ ฝ่ายสนับสนุนวิชาการ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-