



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตรการประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและความต้านทานเชื้อ
แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ

Effect of Omega-3 Fatty Acid on Growth, Survival and Prevention to *Vibrio harveyi*
of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Laboratory Conditions

นามผู้วิจัย นางสาวนิศารัตน์ เอี่ยมมณี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อนงค์ จีระภัทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย
Vibrio harveyi ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ

Effect of Omega-3 Fatty Acid on Growth, Survival and Prevention to *Vibrio harveyi* of Pacific
White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Laboratory Conditions

โดย

นางสาวนิศารัตน์ เอี่ยมฉวี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2557

นิสารัตน์ เอี่ยมณี 2557: ผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง) สาขาวิชาวิทยาศาสตรการประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D. 75 หน้า

การศึกษาผลของอาหารเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาาร์ว่า 12 ในห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 60 วันนั้น ได้ดำเนินการทดลองโดยแบ่งทดลองโดยแบ่งกุ้งระยะโพสลาาร์ว่า 12 ออกเป็น 3 กลุ่มทดลอง (กลุ่มละ 3 ซ้ำ) แล้วนำไปเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร (ที่ความเค็ม 25 พีพีที และอุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส) ถึงละ 50 ตัว โดยผสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 กับอาหารสำเร็จรูป ในอัตราส่วนที่ต่างกัน คือ ที่ 0 , 0.5 และ 1 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมในอัตรา 1 , 0.5 และ 0 กรัม มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยคือ $57.33 \pm 6.11\%$, $45.33 \pm 2.67\%$ และ $36.89 \pm 2.04\%$ ตามลำดับและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทุกกลุ่มการทดลอง ส่วนการเจริญเติบโตพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมในอัตรา 1 และ 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีน้ำหนักเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันที่ 5.68 ± 0.23 และ 5.62 ± 0.22 กรัมตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 4.77 ± 0.36 กรัม

การศึกษาผลของ อาหารเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการได้ดำเนินการทดลองโดยสุ่มกุ้งจากการทดลองที่แล้ว (ตัวละ 10-12 กรัม) มาเลี้ยงในถังขนาด 500 ลิตร จำนวน 12 ถัง โดยแบ่งเป็นกลุ่มทดลองละ 4 ซ้ำ แล้วจึงเติมเชื้อ *V. harveyi* ลงไปในน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^7 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงกุ้งแต่ละกลุ่มด้วยอาหารเดิมอีกเป็นเวลา 14 วัน มีการควบคุมคุณภาพน้ำเช่นเดียวกับการทดลองที่แล้ว ส่วนผลการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมมีอัตราการรอดตายสูงสุดคือ $81.67 \pm 2.89\%$ ตามด้วยกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมในอัตรา 0.5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมมีอัตราการรอดตายเท่ากับ $78.33 \pm 2.89 \%$ และกลุ่มควบคุม $71.67 \pm 5.77\%$ สำหรับน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมในอัตรา 1 และ 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีน้ำหนักเฉลี่ย 7.86 ± 0.04 และ 7.73 ± 0.08 กรัม ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเพียง 6.26 ± 0.08 กรัม การศึกษาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งพบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ทั้งสองกลุ่ม มีกิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งและ กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุม การศึกษาด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบการฟกช้ำของเซลล์ hepatopancreas ในกุ้งกลุ่มควบคุม แต่กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 พบลักษณะทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนที่เป็นปกติ

Nisarath Aiamanee 2014: Effect of Omega-3 Fatty Acid on Growth, Survival and Prevention to *Vibrio harveyi* of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Laboratory Conditions. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Assistant Professor Niti Chuchird, Ph.D. 75 pages.

A study of the effect of Omega-3 fatty acids (extracted from *Schizochytrium* sp.) on growth and survival rate of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was carried out under laboratory conditions. Tests were carried out in three treatments (with three replicates/treatment). Postlarvae 12 were stocked in 500-L fiberglass tanks (salinity 25 ppt and temperature $29 \pm 1^\circ\text{C}$) at a density of 50 PL/tank. Shrimp were fed four times daily with pelleted feed containing Omega-3 fatty acids at 0, 0.5 and 1 g./ 1kg. feed. After 60 days of dietary administration, shrimp fed with 0.5 and 1 g./ 1kg feed. of Omega-3 fatty acids had an average body weight of 5.62 ± 0.22 g and 5.68 ± 0.23 g., which were significant higher ($p < 0.05$) than the control group without Omega-3 fatty acids (4.77 ± 0.36 g). Shrimp fed 1 g./ 1kg feed. of Omega-3 fatty acids had the highest survival rate at 57.33 ± 6.11 %, higher than the group fed with 0.5 g./ 1kg feed. of Omega-3 fatty acids (45.33 ± 2.67 %) and the control group without Omega-3 fatty acids (36.89 ± 2.04 %). Statistically differences ($p < 0.05$) were observed among the three treatments.

A study of the effects of Omega-3 fatty acids on preventing *Vibrio harveyi* in rearing of Pacific white shrimp was conducted under laboratory conditions. Thirty shrimp (10-12 g) from each tank in the previous experiment were randomly sampled and stocked in 12 x 500-L fiberglass tanks with four replicate tanks per treatment. *V. harveyi* were added into each tank to obtain final concentration of 10^5 CFU/ml. Each treatment group was received aforementioned diets four times daily for another 14 days. All water quality parameters were maintained as the previous experiment. A study of the effects of Omega-3 fatty acids on preventing *Vibrio harveyi* revealed that shrimp fed 1 g./ 1kg feed. of Omega-3 fatty acids had the survival rate of 81.67 ± 2.89 %, higher than the group fed with 0.5 g./ 1kg feed. of Omega-3 fatty acids (78.33 ± 2.89 %) and the control group (71.67 ± 5.77 %). The average weight of shrimp fed with 0.5 and 1 g./ 1kg feed. of Omega-3 fatty acids were 7.86 ± 0.04 and 7.73 ± 0.08 gram, respectively. These were significantly higher ($p < 0.05$) than the control group. The study on immune characteristics of shrimp revealed that shrimp in both groups that fed with Omega-3 fatty acids had significant ($p < 0.05$) improvements in immune parameters, such as the percentage phagocytosis and phenoloxidase activity than the control group. The histopathological study revealed a sign of collapse hepatopancreas in control shrimp, whereas shrimp in the group that fed 1 and 0.5 g. of Omega-3 fatty acids showed normal histopathology.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิติ ชูเชิด ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษา แนะนำ และ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และรองศาสตราจารย์ ดร.ชลอ ลีมสุวรรณ กรรมการที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์คณะประมงทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันมี คุณค่าอย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในวันข้างหน้า

ขอขอบพระคุณบริษัท บริษัท ชีสเคม แอครีคัลเจอร์รัล จำกัด ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ปริญญาเอก และเพื่อนพี่น้องทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการศึกษา เป็นอย่างดีในทุกๆด้าน

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา รวมทั้งญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

นิศารัตน์ เอี่ยมมณี

มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	40
ผล	40
วิจารณ์	53
สรุปและข้อเสนอแนะ	56
สรุป	56
ข้อเสนอแนะ	57
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	58
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	75

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 น้ำหนักของเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไม(กรัม)ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 40 , 50 และ 60 วัน	40
2 อัตรารอดตาย ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 60	42
3 น้ำหนักเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน ก่อนและหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> 10 ⁵ CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน	43
4 อัตรารอดตาย(ร้อยละ) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน ก่อนและหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> 10 ⁵ CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน	45
5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (10 ⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3ในระดับที่แตกต่างกัน	48
6 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน	49
7 ปริมาณความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50% หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน	50
8 กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน	51
9 กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide activity ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน	52
10 คุณสมบัติของน้ำเนื้อตลอดระยะเวลา 60 วัน ของการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน	53

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD @superoxide dismutase	38
2 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมัน กลุ่มโอเมก้า-3 ใน ระดับที่แตกต่างกันหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 40, 50 และ 60 วัน	41
3 อัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ใน ระดับที่แตกต่างกันหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน	42
4 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ซึ่งได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่ม โอเมก้า-3 ใน ระดับที่แตกต่างกัน ก่อนและหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน	44
5 อัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ใน ระดับที่แตกต่างกันหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน	45
6 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งที่อยู่ในกลุ่มควบคุม (control) ที่ ไม่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า -3 แสดงอาการเซลล์ตับและตับอ่อน ฝ่อ ลีบ พบปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนจำนวนน้อย (H&E : bar = 500 μ m)	46
7 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมัน กลุ่มโอเมก้า -3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แสดงเซลล์ตับและ ตับอ่อนปกติมีปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนจำนวนมาก (H&E : bar = 500 μ m)	47
8 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรด ไขมันกลุ่มโอเมก้า -3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แสดงเซลล์ตับ และตับอ่อนปกติมีปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนจำนวนมาก (H&E : bar = 500 μ m)	47

ผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และความต้านทาน
เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ใน
ห้องปฏิบัติการ

Effect of Omega-3 Fatty Acid on Growth, Survival and Prevention to *Vibrio*
harveyi of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Laboratory
Conditions

คำนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เพราะเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว เนื่องจากถูกพัฒนาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง แต่ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาว แวนนาไมในประเทศไทยประสบปัญหาการเกิดโรคอีเอ็มเอส (Early Mortality Syndrome : EMS) ส่งผลให้ผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมของไทย และหลายประเทศในเอเชีย ลดลงมาก (Joshi *et al.* (2014) การศึกษาของ ญัฐินี (2556) รายงานว่าคุณภาพของลูกกุ้งที่ปล่อยลงเลี้ยงมีผลต่อการเกิดโรคอีเอ็มเอสในบ่อเลี้ยง โดยลูกกุ้งที่มีเซลล์ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ที่ไม่สมบูรณ์ มีพู่ตับที่ลีบ คด หรือคอดกั่ว มีปริมาณเม็ดไขมันน้อย เมื่อนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพ จะพบการฟ่อและลอกหลุดของเซลล์ตับและตับอ่อน และมีปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* ใกล้เคียงกันอยู่มาก กุ้งพวกนี้จะตายอย่างรวดเร็วเพียง 11-14 วันหลังจากปล่อยเลี้ยงในบ่อ โดยมีอาการคล้ายการเกิดโรคอีเอ็มเอส (Tran *et al.*, 2013) ดังนั้นการพยายามทำให้ลูกกุ้งแข็งแรงมีปริมาณเม็ดไขมันมากขึ้น โดยใช้อาหารเสริมพวกกรดไขมันต่างๆซึ่งพบมากในสัตว์ทะเล เพื่อทำหน้าที่สำคัญในการเป็นตัวนำวิตามินที่ละลายในไขมันไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย เพราะกรดไขมันประเภทนี้เป็นกรดไขมันประเภทพันธะคู่ ซึ่งจะมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำเมื่อมีจำนวนพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้สัตว์น้ำสามารถย่อยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่อยู่ในสภาพของเหลวได้ดีและสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเสริมสร้างความแข็งแรงของสัตว์ได้ โดยเฉพาะ สัตว์น้ำวัยอ่อนและวัยเจริญพันธุ์ เพราะร่างกายของสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่มนี้ได้ สัตว์น้ำจะต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น (วีรพงศ์, 2536; เวียง, 2543 และ Cuzon *et al.*, 2004) ประกอบกับในปัจจุบันอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงกุ้งทั่วไปนั้น มีการใช้วัตถุติดทนโปรตีนและไขมันจากสัตว์ทะเลมากขึ้นเพื่อควบคุมต้นทุนการผลิตให้เหมาะสม จึงอาจทำให้อาหารที่ให้กุ้งกินในปัจจุบันนั้นมีสารอาหารที่สำคัญไม่

เพียงพอหรืออาจไม่เหมาะสมต่อความต้องการของกุ้งสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาให้โตเร็วในปัจจุบัน ส่งผลทำให้กุ้งอ่อนแอและทยอยตายได้ สังเกตได้จากรายงานของ Limsuwan (2013) ซึ่งระบุว่า การเลี้ยงกุ้งที่มีการให้อาหารในช่วงหนึ่งเดือนแรกในประมาณที่สูงกลับส่งผลให้กุ้งในบ่อมีโอกาสป่วย และตายด้วยโรค อีเอ็มเอส ได้มากกว่าการเลี้ยงที่มีการให้อาหารอย่างเหมาะสม

จุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม *Schizochytrium* sp. ซึ่งทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในระบบบิโเวสค์และยังสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า 3 โดยเฉพาะ DHA ในเซลล์ได้ในปริมาณมาก (Yongmanitchai *et al.*, 2007) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นแหล่งของกรดไขมัน จำเป็นทดแทนกรดไขมันจากสัตว์ทะเล เนื่องจาก *Schizochytrium* sp. มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว สามารถนำมาเลี้ยงเพื่อขยายและคัดเลือกพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งกรดไขมันที่ได้จาก *Schizochytrium* sp. ยังมีราคาถูก ทำให้มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์น้ำรวมทั้งอาหารกุ้ง (Lewis *et al.*, 2000)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของอาหารเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ซึ่งสกัดมาจาก *Schizochytrium* sp. ต่อการเจริญเติบโต การรอดตายและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ โดยผลการศึกษาที่ได้จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการสร้างความแข็งแรงให้กับกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินของเกษตรกรและศึกษาถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำกรดไขมันจากจุลินทรีย์ชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม การเลี้ยงกุ้งของไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL 12 ในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 ต่อการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 ต่อระดับภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

1.1 ความเป็นมาและอนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) หรือ Pacific white shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ ได้ถูกนำเข้ามาในทวีปเอเชียครั้งแรกที่ประเทศไต้หวันเมื่อปี พ.ศ. 2539 ต่อมาได้ถูกนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศจีนเมื่อ พ.ศ. 2541 ส่วนประเทศไทยนั้นได้มีการนำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จมากนัก จนกระทั่งกรมประมงได้อนุญาตนำเข้าแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยงเมื่อพ.ศ. 2545 ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับที่ประเทศไทยกำลังประสบกับปัญหากุ้งกุลาดำที่โตช้า ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาการขาดทุน จึงทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมกันมากขึ้น เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว เนื่องจากถูกพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งลักษณะของกุ้งขาวที่สังเกตเห็นได้คือ บริเวณกรี (หนาม) ทางด้านบนจะเป็นหยักและถี่ทางปลายกรีจะตรง ที่พินกรีด้านล่าง 2 อันและด้านบน 8 อัน ความยาวกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนว่ากุ้งขาวแวนนาไมจะเห็นลำไส้ได้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวอื่นๆ (ชลอและ พรเลิศ, 2547)

เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ดี โดยทำการเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35ppt แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดี คือ 10-22 ppt โดยมีอุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส (ปิยนุตร, 2546)

อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม ตามการจำแนกของ Pérez Farfante and Kensley (1997) มีดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

Litopenaeus vannamei Boone, 1931

1.2 ลักษณะภายนอก

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว คือเป็นกุ้งขนาดกลาง ลำตัวและขาไม่มีสีขาวใส ลักษณะของกริยาวตรง ฟันบนกริด้านบน มี 9 ซี่ ฟันกริด้านล่าง 2 ซี่ ในวัยอ่อนกริยาวกว่า antennular peduncle และเมื่อโตจะมีขนาดที่สั้นลง ที่เปลือกส่วนหัว (carapace) มี antennal spine และ hepatic spine มีสันข้างกริ (adrostral carina) ยาวถึงฟันกริด้านสุดท้าย (epigastric tooth) แต่ไม่เกินครึ่งหนึ่งของ carapace (ประจวบ, 2543) หนวดของกุ้งขาวแวนนาไมในระยะวัยรุ่นจะมีสีแดงตลอดเส้น อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย (thelycum) มีลักษณะเป็นแบบเปิดตั้งอยู่บริเวณฐานของขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (petasma) สมมาตรกัน มีลักษณะกึ่งเปิดคล้ายรูปตะขอพบบริเวณ endopod ของขาว่ายน้ำ (pleopod) คู่ที่ 1 (ประจวบ, 2525) ส่วนหาง (telson) เรียบ ลักษณะที่สังเกตได้เด่นของกุ้งขาว คือ สีลำตัวจะเป็นสีขาว กริด้านบนจะหยักและถี่ปลาย กริมีลักษณะตรง โดยมีฟันกริด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวกริจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และสามารถเห็นลำไส้ได้ชัดเจนกว่ากุ้งชนิดอื่นๆ (ภิญโญ, 2545)

1.3 แหล่งที่อยู่อาศัย

กุ้งขาวแวนนาไมมีถิ่นกำเนิดจากแถบชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก พบแพร่กระจายตั้งแต่เขต Sonora ในประเทศเม็กซิโกไปจนถึงเขต Tumbes ในประเทศเปรู ซึ่งน้ำทะเลบริเวณนี้มีอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียสตลอดทั้งปี ตัวเต็มวัยของกุ้งชนิดนี้อาศัยอยู่ในทะเลที่มีพื้นที่ตื้นน้ำเป็นโคลนที่ระดับความลึก 0-72 เมตร ส่วนตัวอ่อนอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยตามชายฝั่งทะเล (Holthuis, 1980; Dore and Frimodt, 1987; FAO, 2013a, 2013b)

1.4 การสืบพันธุ์และวงจรชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมตัวเต็มวัยอยู่อาศัยและสืบพันธุ์ในทะเลเปิด ส่วนกุ้งวัยอ่อน-วัยรุ่น (ระยะ juvenile, adolescent, และ sub-adult) อยู่อาศัยในแถบชายฝั่งทะเล กุ้งตัวผู้และตัวเมียเจริญพันธุ์เมื่อมีขนาด 20 กรัม และ 28 กรัมตามลำดับ หรืออายุประมาณ 6-7 เดือน กุ้งขาวขนาด 30-45 กรัมจะให้ไข่ประมาณ 100,000-250,000 ฟอง (ไข่แต่ละฟองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร) หลังจากปฏิสนธิ 16 ชั่วโมงไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะแรกที่เรียกว่านอเพลียส (nauplius) ซึ่งมี 6 ระยะ จากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะโปรโตซุเอีย (protozoa) อีก 3 ระยะ และไมซิส (mysis) อีก 3 ระยะตามลำดับ โดยตัวอ่อนระยะนอเพลียสจะไม่กินอาหาร (แต่จะใช้ไข่แดงเป็นแหล่งพลังงาน) ส่วนตัวอ่อนระยะโปรโตซุเอียและไมซิสจะกินแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร ต่อมาจึงพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะโพสตาร์วา (postlarva) ซึ่งระยะนี้กุ้งจะเคลื่อนที่เข้าสู่ชายฝั่งโดยการพัดพาของกระแสน้ำและเปลี่ยนรูปแบบการดำรงชีพไปกินสารอินทรีย์พื้นท้องน้ำ หนอน หอย และครัสเตเชียนอื่นๆเป็นอาหาร (FAO, 2013a)

2. การเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทย

การเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทยนั้น ไทย ชลอ และพรเลิศ (2547) ได้แบ่งการเลี้ยงแยกตามความเค็มของน้ำเป็น 2 แบบ คือ การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำและการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ ดังนี้

2.1 การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำ

การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำ ในระหว่างการเลี้ยงจะใช้น้ำที่มีความเค็มต่ำมากจนเกือบจะเป็นระดับที่ถือว่าเป็นน้ำจืด ส่วนใหญ่พบในพื้นที่ทางภาคกลาง โดยเกษตรกรจะใช้น้ำเค็มจากนาเกลือซึ่งมีความเค็มสูงประมาณ 100-200 พีพีที มาเติมในน้ำจืดจนได้ความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที ส่วนใหญ่จะมีการกั้นคอกก่อน โดยใช้ผ้าพลาสติกพื้นที่ประมาณ 15 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือเข้าไปในคอกให้ได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นก็นำลูกกุ้งระยะโพสตาร์วา 10-12 จากโรงเพาะฟักที่ปรับความเค็มมาแล้ว มาปล่อยอนุบาลในคอกประมาณ 3-4 วันจึงเปิดคอกออกมา โดยจะไม่อนุบาลเป็นเวลานาน เพราะกุ้งขาวอาจกินกันเองได้ หรืออีกวิธีหนึ่งคือการเตรียมน้ำความเค็มประมาณ 3-5 พีพีที ทิ้งบ่อ แล้วจึงนำลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักที่ปรับความเค็มให้ใกล้เคียงแล้ว มาปล่อยโดยตรงโดยไม่มีการกั้นคอก โดยจะ

ปล่อยลูกกุ้งไม่หนาแน่นมาก ทั่วไปแล้วจะปล่อยลูกกุ้งที่ความหนาแน่นประมาณ 70,000-80,000 ตัว/ไร่

2.2 การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ

การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติจะใช้น้ำที่มีความเค็มประมาณ 10 พีพีทีขึ้นไป ส่วนใหญ่จะมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 120,000 ตัว/ไร่ ผลผลิตประมาณ 2 ตัน/ไร่ มีอัตราการรอดประมาณร้อยละ 80 มีการเลี้ยงกันอย่างมากในหลายจังหวัดทางภาคใต้ โดยเฉพาะชายฝั่งทะเลอันดามันซึ่งมีผลผลิตสูงมาก ถึง 3-4 ตันต่อไร่หากปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 150,000 ตัวต่อไร่ เกษตรกรบางรายมีการทยอยจับจับกุ้งออกไป เพื่อให้กุ้งที่เหลือในบ่อมีโอกาสโต ซึ่งการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติจะได้ผลผลิตดีกว่าที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ เนื่องจากการถ่ายน้ำในปริมาณมากในช่วงท้ายๆของการเลี้ยง

3. อาหารกุ้ง

อาหารสัตว์น้ำ ตามความหมายทางโภชนาการ (เวียง, 2542; Maynard and Loosli, 1969; Halver, 1972.) คือ สิ่งที่สัตว์น้ำกินเข้าไปแล้วเกิดประโยชน์ต่อร่างกายโดยจะซ่อมแซมส่วนสึกหรอ ให้พลังงานและช่วยควบคุมให้เกิดการปฏิบัติงานของกระบวนการต่างๆของร่างกายดำเนินไปตามหน้าที่แล้วส่งผลให้สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิต มีการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ได้อย่างปกติ อาหารของสัตว์น้ำ แบ่งเป็น 2 ประเภท (เวียง, 2543) คือ อาหารธรรมชาติ (natural food) และอาหารที่จัดเตรียมขึ้น (prepared food)

3.1 อาหารธรรมชาติ หมายถึง อาหารที่มีอยู่แล้วและเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

3.2 อาหารที่จัดเตรียมขึ้น หมายถึง อาหารที่ผู้จัดเลี้ยงจัดทำหรือจัดหาให้สัตว์น้ำกิน โดยมีเป้าหมายหลักคือการเพิ่มผลผลิตของสัตว์น้ำให้สูงขึ้นพร้อมกับย่นระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง อาหารที่จัดเตรียมขึ้นยังแยกเป็นอาหารสมบูรณ์ (complete feed) และอาหารสมทบ (supplemental feed)

3.2.1 อาหารสมบูรณ์ (complete feed) คืออาหารที่มีสารอาหารที่สัตว์น้ำต้องการครบถ้วนและเพียงพอกับระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่น การเลี้ยงในกระชังหรือในที่กักขังที่ไม่มีอาหารธรรมชาติเลยหรือมีในปริมาณจำกัด

3.2.2 อาหารสมทบ (supplemental feed) คือ อาหารที่ให้สัตว์น้ำกินเพิ่มเติมจากอาหารธรรมชาติ จึงไม่ต้องมีสารอาหารครบถ้วนเหมือนอาหารสมบูรณ์

4. ความต้องการสารอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

อาหารประกอบไปด้วยสารอาหารที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย สารอาหารที่สำคัญคือ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่และน้ำ ซึ่งจะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของร่างกายให้เป็นปกติ เป็นแหล่งพลังงาน ซ่อมแซมร่างกายให้เป็นปกติ เป็นต้น

4.1 ไขมัน (lipid)

ไขมัน พบทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืชและสัตว์ พบทั้งสถานะของแข็งและของเหลว ไขมันประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน นอกจากธาตุหลัก 3 ตัวนี้แล้วยังอาจมีฟอสฟอรัส ไนโตรเจนและกำมะถันรวมอยู่ด้วยโดยทั่วไปไขมันประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เรียกว่า กลีเซอรอล glycerol ซึ่งเป็นโพลีแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นหมู่ฟังก์ชันนัล (functional) 3 หมู่กับส่วนที่เรียกว่ากรดไขมัน (fatty acid) ซึ่งมีคาร์บอนต่อกันเป็นแถว ตรงส่วนปลายมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH)

กรดไขมันประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมเรียงต่อเป็นแถวยาวมากน้อยกันตามชนิดของกรดไขมัน โดยมักจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป ถ้าจำแนกตามพันธะก็จะแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. กรดไขมันอิ่มตัว (saturated) คือกรดไขมันที่คาร์บอนอะตอมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวตลอดทั้งโมเลกุล พบมากในไขมันสัตว์และน้ำมันพืชบางชนิดโดยเฉพาะ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม เป็นต้น

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated) คือ กรดไขมันที่มีพันธะคู่อยู่ภายในโมเลกุล กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid -PUFA) หรือ (highly unsaturated fatty acid - HUFA) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ขึ้นไป กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนั้นมีความสำคัญมากทางโภชนาการ โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดร่างกายของสัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ จึงจำเป็นต้องได้รับจากการกินอาหาร ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็น เช่น กรดไลโนลินิก (linoleic) หรือโอเมก้า 6 (18:2n-6) และกรดไลโนลินิก (linolenic) หรือโอเมก้า 3 (18:3n-3) และ eicosapentaenoic acid (20:5n-3) กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 อะตอมขึ้นไป และจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 3 คู่ขึ้นไปจะเรียกว่า highly unsaturated fatty acid (HUFA) โดยทั่วไปจะใช้เรียกรดไขมันในกลุ่ม โอเมก้า 3 ซึ่งประกอบด้วย eicosapentaenoic acid (EPA ; 20:5n-3) และ docosahexaenoic acid (DHA ; 22:6n-3) กุ้งต้องการกรดไขมันจำเป็นจากอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการรอดตาย กุ้งที่ไม่ได้รับกรดไขมันจำเป็นหรือได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอ นั้นจะแสดงอาการขาดกรดไขมันจำเป็นและมีการเจริญเติบโตช้า (Cuzon *et al.*, 2004) เนื่องจากกุ้งไม่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมันให้เป็น EPA และ DHA (Lim *et al.*, 1997) กุ้งจึงจำเป็นต้องได้รับกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากอาหารเท่านั้น ซึ่งกุ้งมีความต้องการกรดไขมันในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดหรืออายุ โดยแหล่งของกรดไขมันที่ใช้ในการผลิตอาหารกุ้งส่วนใหญ่ได้แก่ น้ำมันปลาทะเลและน้ำมันจากสัตว์ทะเลอื่นๆ

4.2 โปรตีน (protein)

โปรตีนเป็นสารอินทรีย์ที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งพืชและสัตว์ กุ้งแต่ละช่วงอายุมีความต้องการโปรตีนในปริมาณที่แตกต่างกัน กุ้งวัยอ่อนและกุ้งขนาดเล็กมีความต้องการโปรตีนมากกว่ากุ้งวัยรุ่นและกุ้งโตเต็มวัย ซึ่งอาหารกุ้งสำเร็จรูปจะมีระดับโปรตีนในอาหารสัมพันธ์กับขนาดกุ้ง อาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งควรมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 35-50 เปอร์เซ็นต์ (Peter, 1999)

แหล่งโปรตีนที่ใช้ในอาหารกุ้งส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์ เช่น หมึก ปลา และเปลือกหรือหัวกุ้ง นอกจากนี้ยังมีแหล่งโปรตีนจากพืชจำพวก กากถั่วเหลือง เป็นต้น (มะลิ, 2531) ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอาหารกุ้งเพราะมี กรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในระดับที่เหมาะสม โดยเฉพาะไลซีน (lysine) เมไทโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (threonine) และทริปโตเฟน (tryptophan) (Davis, 2000; Flicker, 2002)

4.3 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารอินทรีย์ที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ปกติพบในพืช ซึ่งในสัตว์จะพบน้อยมาก คาร์โบไฮเดรตเป็นโครงสร้างของร่างกาย โดยจะเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของเยื่อหุ้มเซลล์และสารพื้นฐานในเนื้อเยื่อตามอวัยวะต่างๆของร่างกาย เป็นต้นกำเนิดของสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น กรดนิวคลีอิก และกรดอะมิโน รวมทั้งช่วยสำรองโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโต

ด้วยเหตุนี้คาร์โบไฮเดรตจึงจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (เวียง, 2543)

4.4 วิตามิน (Vitamins)

วิตามินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่กึ่งต้องการในปริมาณน้อยที่สภาวะการเจริญเติบโตและการพัฒนาการปกติ วิตามินแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ วิตามินที่ละลายในน้ำและวิตามินที่ละลายในไขมัน วิตามิน B-Complex เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำและต้องการในปริมาณที่น้อยซึ่งมีหน้าที่หลักคือ เป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมหลายกระบวนการ วิตามินที่ละลายในน้ำที่ความต้องการในปริมาณมากและมีหน้าที่มากกว่าเป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) คือ วิตามินซี อินอซิทอล (inositol) และโคลีน (choline) ส่วนวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค ซึ่งในอาหารกึ่งจะเป็นวิตามินรวม ความต้องการวิตามินในกึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาด อายุ อัตราการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม การขาดวิตามินจะแสดงออกมาในลักษณะของอาการต่างๆ เช่น ตาบอด วัยรุ่นผิดปกติ เจริญเติบโตช้า กึ่งที่ขาดวิตามินซึ่งจะก่อให้เกิดโรค black death ซึ่งกึ่งจะเป็นแผลสีดำบริเวณใต้เปลือกตามลำตัวและเหงือก (Mararelli et al., 1979)

4.5 แร่ธาตุ (Minerals)

แคลเซียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างเปลือก ตามปกติแล้วแคลเซียมจะสะสมในตับและตับอ่อนในรูปเกลือแคลเซียมฟอสเฟต (CaPO_4) มีการสะสมแคลเซียมในเลือดและส่วนอื่นของร่างกาย เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน โดยทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ช่วยให้การย่อยคาร์โบไฮเดรตเป็นไปอย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ATPase ควบคุมการเต้นของหัวใจ (ประจวบ, 2537; เวียง, 2543; Guillaume et al., 2001) โดยความเข้มข้นแคลเซียมในเลือดกึ่งขาวมีค่าค่อนข้างคงที่ กล่าวได้ว่าความเข้มข้นไม่มี

อิทธิพลต่อระดับแคลเซียมในเลือด เช่นเดียวกับกึ่งกลาดำ พยายามรักษาระดับของแคลเซียมในเลือดให้คงที่ในระบบเลือดมีปริมาณไม่สูงรักษพบอยู่ในช่วง 13-16 mmol/L (บุญรัตน์ และคณะ, 2547; บุญรัตน์และสว่างพงษ์, 2553)

แมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ในร่างกายประมาณ 70% อีก 30% พบในเนื้อเยื่อและเลือด ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ให้ดีขึ้น อีกทั้งแมกนีเซียมยังมีส่วนในระบบ osmoregulation ถ้ามีแมกนีเซียมมากเกินไปจะถูกขับออกจากร่างกาย (ประจวบ, 2537; เวียง, 2543; Guillaume *et al.*, 2001; นงนุช, 2550)

โซเดียมทำหน้าที่รักษาสมดุลของ Osmotic pressure ควบคู่กับ K^+ รักษาความเป็นกรดเป็นด่างในร่างกายให้สมดุล ทำหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานของกล้ามเนื้อและระบบประสาท ถ้าโซเดียมมากเกินไปจะถูกขับถ่ายออกแต่ถ้าน้อยเกินไปจะทำให้กึ่งเนื้ออาหาร การเจริญเติบโตลดลง เกิดปัญหาเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ (นงนุช, 2550; Guillaume *et al.*, 2001)

โพแทสเซียมพบอยู่ในเซลล์ของร่างกายและเลือด โพแทสเซียมทำงานร่วมกับโซเดียม โดยรักษา Osmotic pressure รักษาความเป็นกรด-ด่างในร่างกาย มีผลต่อการเต้นของหัวใจ ถ้าขาดโพแทสเซียมจะมีปัญหาเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ ทำให้เลือดเป็นกรด มีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร แต่ถ้ามีโพแทสเซียมมากเกินไปหัวใจจะหยุดเต้น

คลอไรด์มีหน้าที่รักษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำย่อย รักษาสมดุลของระบบ Osmotic การเข้าออกของสารและน้ำภายในเซลล์ ร่างกายแลกเปลี่ยนคลอไรด์บริเวณเหงือกสลับกับการเข้าออกของโซเดียมในการรักษาสมดุล สัตว์น้ำจืดคลอไรด์จะแพร่เข้าตัว ส่วนสัตว์ทะเลคลอไรด์จะแพร่ออกนอกตัว (ประจวบ, 2537; เวียง, 2543; Guillaume *et al.*, 2001)

5. *Schizochytrium* sp.

ลำดับทางอนุกรมวิธานของ Thraustochytrids มีดังนี้ Honda (2001)

Superkingdom Eucaryota

Kingdom Stramenopila

Phylum Labyrinthulomycota

Order Labyrinthulida

Family Thraustochytriidae

สมาชิกในกลุ่ม Thraustochytrids แบ่งออกเป็น 8 สกุล คือ *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Labyrinthulids*, *Ulkenia* และ *Corollochytrium* ซึ่งในแต่ละสกุลสามารถแบ่งได้อีกหลายสปีชีส์ (Moss, 1986)

จุลินทรีย์น้ำเค็ม *Schizochytrium* spp. ลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ multi layered ประกอบด้วย L-galactose เป็นหลัก เป็นจุลินทรีย์น้ำเค็มที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดไขมัน HUFA สะสมในเซลล์สูง โดยส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง n-3 ชนิด DHA วิเชียร (2551) รายงานว่า *S. Limacinum* มีไขมันสะสมในเซลล์สูงประมาณ 42% ของน้ำหนักแห้ง และมีกรดไขมัน DHA สูงถึง 35% ของปริมาณไขมันทั้งหมด

Schizochytrium spp. แพร่กระจายทั่วไปในสภาพแวดล้อมทางทะเล เช่น ดินตะกอน บริเวณชายฝั่ง ปากแม่น้ำ และซากเน่าเปื่อยของใบไม้บริเวณป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสารอินทรีย์อุดมสมบูรณ์ (Nakahara *et al.*, 1996) *Schizochytrium* spp. มีบทบาทต่อระบบนิเวศน์ป่าชายเลน เนื่องจาก *Schizochytrium* spp จัดเป็นพวกเห็ดราโทรฟ (heterothrop) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็น แซโพรไฟต์ (saprophyte) โดยอาศัยซากพืช ซากสัตว์ และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์สาร ซึ่งเป็นการเพิ่มและหมุนเวียนแร่ธาตุต่างๆในระบบนิเวศน์ (Naganuma *et al.*, 1998) จุลินทรีย์กลุ่ม Thraustochytrids มีความสำคัญในแง่ของแหล่งกรดไขมันในธรรมชาติ ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ในระบบนิเวศน์

การสืบพันธุ์ จะเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยอาศัยทลัสส์ จะพัฒนาไปเป็นสปอร์แรงเจียม ซึ่งมีลักษณะแบ่งครึ่งเป็นทวีคูณ จำนวน 4-5 ครั้ง แต่ละเซลล์จะผลิตชูโอสปอร์ ในชนิด *S. limacinum* พบว่าบางเซลล์มีลักษณะ แบบอะมีบอยด์เซลล์ (amoeboid cell) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างยาวขึ้น (elongate) และหดตัวเป็นทรงกลมก่อนแบ่งตัวสร้างชูโอสปอร์ (Honda *et al.*, 1998) ชูโอสปอร์มีรูปร่างรีหรือเกือบกลมมีแฟลกเจลลา (flagella) 2 เส้นทางด้านข้าง

บทบาทต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Schizochytrium spp. เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ซึ่งปัจจุบันในทางการค้านิยมใช้กรดไขมันจาก 3 แหล่งใหญ่ คือ น้ำมันปลา สาหร่ายขนาดเล็ก และ Thraustochytrids ซึ่งพบว่า Thraustochytrids มีสัดส่วน DHA สูงกว่า EPA ขณะที่น้ำมันที่ได้จากปลานั้นมีสัดส่วน DHA ต่ำกว่า EPA โดยทั่วไปสัตว์น้ำมีความต้องการปริมาณ DHA สูง (เวียง, 2543) จึงได้มีการนำ Thraustochytrids มาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับอาร์ทีเมียหรือโรติเฟอร์ เพื่อให้มีปริมาณ n-3 PUFAs สูง ก่อนที่จะนำไปใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ดังนั้นการเสริมปริมาณ DHA ให้กับสัตว์น้ำถือเป็นการถ่ายทอด DHA ไปตามห่วงโซ่อาหารเพื่อเพิ่มหรือเสริมปริมาณ DHA ให้กับมนุษย์ทางอ้อม (Barclay and Zeller, 1996) โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง *Schizochytrium* spp. เพื่อขยายและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณ DHA สูง รวมทั้งการนำ *Schizochytrium* spp. มาเสริมอาหารในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Kendrick and Ratledge (1992) ศึกษาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในจุลินทรีย์ทะเล *Thraustochytrium aureum* พบว่าผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า 3 ซึ่งมีปริมาณของ DHA สูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมดในไตรเอซิลกรีเซอรอล และพบกรดไขมันชนิดอื่นๆ ได้แก่ C20:5 C22:5 C24:2 และ C26:2 แต่จากการศึกษาของ Singh and Ward (1996) พบว่า DHA ใน *Thraustochytrium* และ *Schizochytrium* มีค่าอยู่ในช่วง 1.5 – 35 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด

Kamlungdee (2003) ศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids: PUFA) จากจุลินทรีย์น้ำเค็ม *Schizochytrium* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ (strains N-1, N-2, N-5, N-6 และ N-9) ที่แยกได้จากใบ *Kandelia candel* ในป่าชายเลนบริเวณเกาะฮองกง โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งในห้องทดลองเป็นเวลา 52 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์น้ำเค็ม *Schizochytrium* sp. ทั้ง 5 สาย

พันธุ์สะสมกรดไขมัน EPA ในปริมาณต่ำกว่ากรดไขมัน DHA ในเซลล์ ปริมาณกรดไขมัน DHA ในเซลล์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (strains N-1, N-2, N-5, N-6 และ N-9) มีค่าเป็น 174.9, 203.6, 186.1, 171.3 และ 157.9 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ สายพันธุ์ N-2 มีสัดส่วนของกรดไขมัน DHA สูงสุด

Jiang *et al.* (2004) ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายทะเลขนาดเล็ก *Schizochytrium mangrovei* ชนิดใหม่ 3 สายพันธุ์ ที่แยกจากซากเน่าเปื่อยของใบ *Kandelia candel* ในป่าชายเลนประเทศฮ่องกง พบว่ากรดไขมันที่พบใน *S. mangrovei* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ tetradecanoic acid (C14:0) hexadecanoic acid (C16:0) docosapentaenoic acid (C22:5n-6, DPA) และ docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) โดยพบ DHA สูงถึง 32.29 – 39.14 เปอร์เซ็นต์

ถลิศา (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ชนิด DHA ของ *Schizochytrium* 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนอ่าวทุ่งกระเบน จังหวัด จันทบุรี ผลปรากฏว่า *S. limacinum* BUCACD 032 มีปริมาณกรดไขมัน DHA มากที่สุดเท่ากับ 145.50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิต DHA 2,647.51 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ *S. limacinum* BUCARA 021 ปริมาณ DHA เท่ากับ 115.16 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิต DHA 2,070.59 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ *Schizochytrium* sp. 1 BUCAAA 093 มีปริมาณ DHA เท่ากับ 13.85 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิต DHA 68.21 มิลลิกรัมต่อลิตร)

มยุรา (2549) ได้คัดแยก *Schizochytrium* sp. จากใบไม้ป่าชายเลนจังหวัด สมุทรปราการพบ Thraustochytrids 3 ชนิด คือ *S. mangrovei*, *S. limacinum* และ *Schizochytrium* sp. โดยพบ *S. mangrovei* สูงที่สุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแล้ววิเคราะห์กรดไขมันพบว่าปริมาณ ของ DHA สูง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 15.41-180.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (8.79-48.60 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และมีกรดไขมัน EPA และ ARA ในปริมาณต่ำคือ 0.25-7.42 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.15-6.17 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) และ 0.16-3.85 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (0.09-3.94 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) ตามลำดับ

Barclay and Zeller (1996) ศึกษาการเสริม *Schizochytrium* sp. ซึ่งมี DHA สูงให้กับโร ดิเฟอร์และอาร์ทีเมีย พบว่าโรดิเฟอร์และอาร์ทีเมียที่ได้รับ *Schizochytrium* sp. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมี DHA สะสมจากที่ไม่สามารถวัดได้เพิ่มขึ้นถึง 0.8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มี EPA จาก 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มี DPA จากที่ไม่สามารถวัดได้เพิ่มขึ้นถึง 0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก

แห้ง และมี ArA 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งปกติโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียไม่มี ArA สะสมในเซลล์ จากการศึกษาสรุปได้ว่าโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียสามารถเปลี่ยน DHA (22:6n-3) เป็น EPA (20:5n-3) และเปลี่ยน DPA (22:5n-6) เป็น ArA (20:4n-6) ได้โดยกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (beta-oxidation)

Jaritkhuan (2001) พบว่าจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids มีปริมาณ DHA สูงถึง 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไปเป็นอาหารของอาร์ทีเมียพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ DHA ในอาร์ทีเมียได้ และเมื่อนำอาร์ทีเมียที่อุดมไปด้วย DHA ไปเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสตัวราว 4 ถึงโพสตัวราว 16 ทำให้ลูกกุ้งมีปริมาณ DHA สูงตามไปด้วยในลักษณะของการถ่ายทอดตามห่วงโซ่อาหารและสามารถนำไปผสมกับอาหารเม็ดในการเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำได้

Miller *et al.* (2007) ศึกษาการใช้กรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. ทดแทนน้ำมันปลาในอาหารอนุบาลลูกปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) โดยมี 4 ชุดการทดลองคือ อาหารผสมกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. 100 เปอร์เซ็นต์ อาหารผสมน้ำมันปลาล์ 100 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่ผสมน้ำมันปลาล์และกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. ในอัตราส่วน 4:1 และ อาหารผสมน้ำมันปลา พบว่าการเจริญเติบโตและความสามารถในการย่อยไขมันของลูกปลาทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน แต่ลูกปลาที่ได้รับกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. มีเปอร์เซ็นต์ของ DHA สะสมในกล้ามเนื้อสูงกว่าชุดการทดลองอื่น สรุปว่ากรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปลาในอาหารอนุบาลลูกปลา Atlantic salmon และสามารถเพิ่มปริมาณ DHA ในตัวปลาได้ ดังนั้น กรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำเป็นโดยเฉพาะ DHA สำหรับอาหารสัตว์น้ำ

Yamasaki *et al.* (2007) รายงานว่าการเสริม *Schizochytrium* sp. ให้กับโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีก่อนนำไปอนุบาลลูกปลาทะเลสามารถเพิ่มปริมาณ DHA ได้เพียงพอต่อความต้องการ DHA ของลูกปลาเพื่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย ซึ่งสามารถเพิ่มขนาดความยาวของลูกปลาได้อีกด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Harel *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าลูกปลา Atlantic halibut ที่ได้รับโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียที่เสริม *Schizochytrium* sp. มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น รวมทั้งลูกปลาทะเลชนิดอื่น ได้แก่ sea bream, European sea bass และ striped bass นอกจากนี้การทดแทนน้ำมันปลา menhaden ด้วย *Schizochytrium* sp. ในอัตราส่วน 60 เปอร์เซ็นต์ของไขมันทั้งหมดในอาหารพ่อแม่พันธุ์ปลา striped bass สามารถเพิ่มอัตราการฟักไข่ได้

Ganuza et al. (2008) รายงานการใช้ *Schizochytrium* sp. ทดแทนน้ำมันปลาในอาหารอนุบาลลูกปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) พบว่าลูกปลาที่ได้รับอาหารผสม *Schizochytrium* sp. มีอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค และความทนทานต่อสภาพอากาศได้ดีไม่แตกต่างจากลูกปลาที่ได้รับอาหารผสมน้ำมันปลา แสดงว่า *Schizochytrium* sp. สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปลาเพื่อแหล่งของ DHA ในอาหารอนุบาลลูกปลา gilthead seabream ได้

ทรงทรัพย์ และคณะ (2551) ศึกษาการใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม และผลที่มีต่อความทนทานต่อความเครียดและความต้านทานโรค โดยการทดแทนและเสริมคีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) ต่างกัน 3 ระดับ คืออัตราส่วนระหว่างคีโตเซอรอส และ *S. limacinum* เท่ากับ 50: 50 เปอร์เซ็นต์, 75: 25 เปอร์เซ็นต์ และคีโตเซอรอส 100 เปอร์เซ็นต์ เสริม *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้คีโตเซอรอส 100 เปอร์เซ็นต์ ในการอนุบาลลูกกุ้งตั้งแต่ระยะซุเอีย (zoëa) 1 ถึงระยะซุเอีย 3 และอนุบาลด้วยอาร์ทีเมียตั้งแต่ระยะไมซิส (mysis) 1 ถึงระยะโพสลาว่า 15 พบว่าลูกกุ้งระยะไมซิส 1 มีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 89.81 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออนุบาลด้วยคีโตเซอรอส 100 เปอร์เซ็นต์ เสริม *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลูกกุ้งระยะโพสลาว่า 1 มีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 67.31 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออนุบาลด้วยคีโตเซอรอส 50 เปอร์เซ็นต์ และ *S. limacinum* 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเจริญเติบโตพบว่าไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุมทั้งทางด้านการขยายและน้ำหนัก การทดสอบความทนทานต่อความเครียดโดยการแช่ฟอร์มาลินเข้มข้น 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับคีโตเซอรอส 100 เปอร์เซ็นต์ เสริม *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุดคือ 63.22 ± 15.16 เปอร์เซ็นต์ การลดความเค็มจาก 30 ppt เหลือ 5 ppt พบว่ากุ้งที่ได้รับคีโตเซอรอส 75 เปอร์เซ็นต์ และ *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุดคือ 24.33 ± 5.86 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายสะสมตลอดช่วงการทดลอง ($P > 0.05$) ของลูกกุ้งเมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

ปิยารมณ (2552) ได้ศึกษาผลของ *Schizochytrium* sp. ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาว่า 12 เป็นเวลานาน 30 วัน ในน้ำความเค็มต่างกันคือ 5 และ 25 ppt โดยใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมผสมกับ *Schizochytrium* sp. ในอัตราส่วน 2.0%, 5.0% และ 7.5% พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวผสมกับ *Schizochytrium* sp. ในอัตราส่วน 2.0% มีผลทำให้อัตราการรอดตายและเจริญเติบโตของกุ้งสูงขึ้นทั้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มต่ำและน้ำความเค็มปกติ และได้ทำการเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารต่างกันคือ อาหารกุ้งกุลาดำ (โปรตีน 38%) อาหารกุ้งขาว (โปรตีน

36%) อาหารสมทบ (โปรตีน 32%) และอาหารสมทบ (โปรตีน 32%) ที่ผสม *Schizochytrium* sp. ในอัตราส่วน 2.0% พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสมทบที่ผสม *Schizochytrium* sp. มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด แต่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งกุลาดำและอาหารกุ้งขาว

Nonwachai (2010) ได้ศึกษาผลของอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาาร์ว 12 ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA มีอัตราการรอดตายของกุ้งดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. อีกทั้งรวมไปถึงระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งที่ได้รับอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ก็ดีกว่ากุ้งในกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริม

6. แบคทีเรียสกุลวibriโอ

Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) ขนาดประมาณ $0.5-0.8 \times 1.4-2.6$ ไมโครเมตร รูปร่างตรงหรือแท่งโค้งเล็กน้อย ซึ่งโดยทั่วไปแล้วรูปร่างของ *Vibrio* ที่อยู่ในระยะแรกๆของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (early stationary phase) ในอาหารเหลวจะมีความโค้งมากกว่าในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (exponential growth), มี mol% G+C ของ DNA เท่ากับ 38-51, ไม่สร้าง endospores หรือ microcysts (Farmer III *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของกุ้งและปลาจำนวนมาก

แบคทีเรียสกุลนี้สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes), ได้รับพลังงานจากกระบวนการ oxidation ของสารอินทรีย์ (chemoorganotrophs), มีความต้องการโซเดียม (Na^+) ในการเจริญเติบโต ส่วนมากสามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ catalase ได้, ผลิต extracellular enzymes ที่ใช้ในการย่อย DNA, RNA, โปรตีน, ไขมัน, lecithin, mucin, ไคติน, agar, alginic acid, แป้ง ฯลฯ ได้, สามารถหมักน้ำตาล D-glucose, maltose, glycerol, และ D-mannitol ได้ โดยที่การหมักน้ำตาล D-glucose นั้นจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรด (เช่นกรด formic, acetic, lactic, succinic, และ pyruvic) และโดยทั่วไปไม่สร้างแก๊ส (anaerogenic fermentation) ยกเว้นบางชนิด เช่น *V. furnissii*, *V. gazogenes*, *V. mytili* จะให้แก๊ส CO_2 และ H_2 เป็นผลิตภัณฑ์ด้วย โดยทั่วไปไม่สร้าง H_2S และ urease, นอกจากนี้ *Vibrio* ยังสามารถ reduce nitrate ไปเป็น nitrite ได้ แต่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนหรือทำปฏิกิริยา denitrification ได้ (Whitman, 2004 ; Farmer III *et al.*, 2005; Austin and Austin, 2007)

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการจำกัดขอบเขตการแพร่กระจายของ *Vibrio* ในธรรมชาติคือ ปริมาณของโซเดียม เนื่องจาก *Vibrio* ส่วนใหญ่มีความจำเป็นต้องใช้โซเดียมในการเติบโตจึงทำให้สามารถพบ *Vibrio* ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำเค็ม น้ำกร่อย และตามผิวหนังหรือภายในลำไส้ของสัตว์ทะเล (ยกเว้นเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น เช่น *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, และ *V. furnissii* ที่มีรายงานว่าพบในแหล่งน้ำจืดด้วย) โดยปริมาณความต้องการโซเดียมต่ำสุดที่ต้องใช้เพื่อการเติบโตอยู่ในช่วงตั้งแต่ความเข้มข้นร้อยละ 0.029-0.087 (สำหรับ *V. cholerae* และ *V. metschnikovii*) ไปจนถึง 3.5-4.1 (สำหรับ *Salinivibrio costicola*) แต่ *Vibrio* ส่วนมากสามารถเติบโตได้ดีในอาหารแข็งหรืออาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ผสมอยู่ร้อยละ 0.5-2 อย่างไรก็ตามไม่มีความเข้มข้นของ NaCl ค่าใดค่าหนึ่งที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Vibrio* ทุกชนิด, *Vibrio* เกือบทุกชนิดสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียส (แม้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของ *Vibrio* เช่นเดียวกับกรณีความเค็ม), ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Vibrio* ส่วนใหญ่คือ 7-8, *Vibrio* ส่วนมากไม่ต้องการ specific organic growth factors (เช่น วิตามินหรือกรดอะมิโน) แม้ว่าบางชนิดจะต้องการสารอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วย เช่น *V. anguillarum* และ *V. logei* ต้องการ yeast extract, ส่วน *V. diabolis* ต้องการน้ำทะเล เป็นต้น (Farmer III et al., 2005)

การก่อโรคในกุ้งโดยแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

ในธรรมชาติสามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ทั้งในน้ำและในดินตะกอน บางครั้งพบว่า มีแบคทีเรียกลุ่มนี้จำนวนมากอยู่บนผิวหนังสัตว์ ในทางเดินอาหารหากสภาพแวดล้อมดีไม่ทำให้สัตว์เครียด เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ก็ไม่สามารถทำอันตรายสัตว์ได้หรือกรณีที่พบเชื้อในปริมาณน้อย ร่างกายสัตว์จะใช้ระบบป้องกันตัวกำจัดเชื้อออกไปจากร่างกายได้ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้สัตว์เครียดหรืออ่อนแอเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ก็จะทำให้เกิดโรคในสัตว์ หรือที่เรียกกันว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาส (สุภชัย, 2538) สำหรับโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* นี้ จะเรียกรวมๆว่าโรค vibriosis หรือโรคติดเชื้อวibriโอ (ชลอ, 2543) โรค vibriosis พบว่าเกิดจาก *V. harveyi* *V. vulnificus* *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* (Brock and Lightner, 1990; Ishimaru et al., 1995). และมีการรายงานไว้ว่า vibriosis เกิดจาก *V. damsela*, *V. fluvialis* และที่ไม่ได้กำหนดชนิดแต่พบเป็นส่วนน้อย (Lightner, 1996) โรค Vibriosis เป็นหนึ่งในปัญหาโรคที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ vibriosis เป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียที่ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของการเพาะเลี้ยงกุ้ง ทั่วโลก (Lightner and Lewis, 1975; Adams, 1991; Lightner et al., 1992; Lavilla-Pitogo et al., 1996; Lavilla-Pitogo et al., 1998; Chen et al., 2000) กุ้งที่เป็นโรค vibriosis มักมี

อาการขึ้นมายุ่ตามขอบบ่อหรือลอยตามผิวน้ำ การกินอาหารลดลง ลำตัวสทปรก มีจุดลายดำหรือตะกอนตามผิวหนัง ตัวหลวม สีตัวเข้มหรืออาจผิดปกติ ส่วนหางมักจะกร่อนและขอบดำ เหงือกดำ บริเวณแผ่นปิดเหงือกบวมหรือมีจุดสีดำจำนวนมาก ในเนื้อตามลำตัวอาจมีจุดสีดำขนาดเล็ก hepatopancreas มักจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ ในบางครั้งกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio* อาจไม่แสดงอาการผิดปกติเลย (พรเลิศ และคณะ, 2537; ชลอ, 2543) โดย *Vibrio* ชนิดที่มีความสำคัญสำหรับกุ้งทะเล ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Lightner, 1996; Sung et al., 1999)

Vibrio alginolyticus เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม vibrio ที่พบว่ามีกระจายตัวกว้างขวางในทะเลและมักพบจากการแยกเชื้อในปลา หอย และจากอาหารทะเลหลายชนิด (Chan et al., 1989) สามารถแยกได้จากกุ้งที่ป่วยเสมอ (สุกชัย, 2538) และยังพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคกุ้งขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้มากในส่วนของตับและตับอ่อน และน้ำเลือดจากตัวอย่างกุ้งที่ป่วย (Ruangpan, 1995)

Vibrio anguillarum รูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้ง ขนาด $0.5 \times 1.0-2.0$ ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วย flagella 1 เส้น ไม่เป็น acid-fast และไม่มีการสร้างสารสี เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีเกลือ 1-1.5 เปอร์เซ็นต์ (Egusa, 1992) เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคปลาชนิดแรกที่สามารถแยกได้ในห้องปฏิบัติการ โดยแยกจากปลาไหล ในปี ค.ศ. 1974 และยังเป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่ได้ระบุชื่อลงไปใน The European Literature อีกด้วย (Frerichs and Millar, 1993) *V. anguillarum* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้ปลาทะเลและปลาน้ำกร่อยทั่วไปเป็นโรค โดยเฉพาะแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งและในทะเล ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาเป็นโรค vibriosis ถ้ามีอยู่ในตัวปลาหรือรอบๆ ตัวปลาในไม่ช้าจะทำให้เกิดโรคได้

Vibrio harveyi เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ มีขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้ flagella เติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิของน้ำ 25-32 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5-9 (สุกญา และคณะ, 2543) พบในน้ำทะเลและชายฝั่งร่วมหรือพื้นผิวและลำไส้ของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ใน น้ำเลี้ยงกุ้งและดินตะกอนที่พื้นบ่อ (Otta et al., 1999). มีรายงานว่า *V. harveyi* เป็นสาเหตุของ vibriosis ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), pearl oyster (*Pinctada maxima*), (Pass et al., 1987; Lavilla- Pitago et al., 1990; De la Pena et al., 1993). และการตายจำนวนมากของกุ้ง

ในโรงเพาะฟักและกุ้งที่มีขนาดเล็ก ในบ่อเลี้ยง (juvenile) (Lightner, 1988; Graindorge and Flegel, 1999)) สอดคล้องกับรายงานของ Sunaryanto and Mariyam, (1986) ว่าพบการตายของกุ้งจำนวนมากในโรงเพาะฟัก และบ่อเพาะเลี้ยงในประเทศแถบเอเชีย

Kannapiran *et al.*, (2009) ได้ศึกษาการศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ Nambuthalai ชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของอินเดีย เป็นเวลา 120 วัน พบการกระจายของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและแบคทีเรียรวมในน้ำ ดินตะกอนพบว่ามีความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียรวมในน้ำ 1.3×10^4 - 25.3×10^4 CFU/ml และ 1.5×10^6 - 26.2×10^6 CFU/g และพบว่ามีความหนาแน่นของเชื้อ *V. harveyi* ในน้ำอยู่ระหว่าง 0.6×10^4 - 8.8×10^4 CFU/ml และ 1.2×10^6 to 10^{10} CFU /g ในช่วงที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้ง

Vibrio harveyi จัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเรืองแสงได้เช่นเดียวกับ *V. fischeri*, *V. logei*, และ *V. splendidus* (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998) โดยให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมาผ่านทางปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ luciferase โดยสารตั้งต้นเป็น long chain aldehyde (tetradecanal) สารดังกล่าวได้มาจากการสังเคราะห์ของกรดไขมัน ระหว่างปฏิกิริยาการออกซิโดชันของ aldehyde และการรีดิวซ์ของ flavin (FMNH₂) โดยเอนไซม์ luciferase จะทำให้เกิดการเรืองแสงของแบคทีเรียขึ้น สามารถเรืองแสงได้ในที่มืด (Meighen, 1991; Prosser *et al.*, 1996) ดังสมการ



กุ้งที่ป่วยจะมีลักษณะตัวเรืองแสงมองเห็นชัดในที่มืด กุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบบริเวณขอบบ่อ หรือลอยตามผิวน้ำ มีตั้งแต่กุ้งตัวสกปรก มีตะกอนตามผิวตัว กุ้งตัวสีส้ม จับคู่ตัวหลวม ตามลำตัวสกปรก หางมักจะกร่อน บางลักษณะจะพบว่าตามลำตัวมีจุดดำขนาดเล็ก บริเวณแผ่นปิดเหงือกบวม หรือตามเปลือกจะมีจุดขาว เมื่อนำมาเขี่ยเชื้อจากตับและตับอ่อน หรือน้ำเลือด จะพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก ขนาดของตับและตับอ่อนมักจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ กุ้งที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในลักษณะดังกล่าวนี้ทำการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล เนื่องจากกุ้งลักษณะอาการเหล่านี้มีการป่วยมาเป็นเวลานานจนถึงระยะที่กุ้งไม่กินอาหาร (ชลอ, 2543) จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่นเชื้อ *V. harveyi* ตั้งแต่เริ่มกระบวนการผลิตกุ้งภายในโรงเพาะฟัก (Karunasagar *et al.*, 2007). และมีการควบคุมปัจจัยต่างเพื่อป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรีย (Kannapiran *et al.*, 2009)

Vibrio parahaemolyticus มีรูปร่างโค้ง มีขนาดความกว้าง 0.4-0.5 ไมโครเมตร และความยาว 1-3 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 5-45 องศาเซลเซียส และพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37.5 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5-11 และช่วงที่เหมาะสมคือ 7.5-8.8 พบอาศัยอยู่ในแหล่งต่างๆ ทั้งในส่วนของสภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเล เขตน้ำกร่อย ตะกอนดิน รวมทั้งปลาทะเล หอยและสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย (Twedt, 1969; Beuchat, 1974) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2-4 เปอร์เซ็นต์ โคโลนีที่บ่งแสง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว *V. parahaemolyticus* สามารถสร้าง flagella ที่มีเยื่อหุ้มขนาดใหญ่ 1 เส้น ติดอยู่กับส่วนของ outer membrane ของเซลล์เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าแบคทีเรียจะหยุดการแบ่งเซลล์และเริ่มยืดขยายตัวออก ขนาดประมาณ 30 ไมโครกรัม เป็น 40 ไมโครกรัม พร้อมสร้าง flagella จำนวนมาก ซึ่งมีโครงสร้างต่างกับ polar flagella โดยพบว่าไม่มีส่วนห่อหุ้ม เรียกว่า lateral flagella เรียงรายอยู่รอบเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่ในการ เคลื่อนที่บนผิวในอาหารแข็ง (Shinoda and Okamoto, 1977) เมื่อย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเหลวแบคทีเรียจะเริ่มแบ่งเซลล์ พร้อมกับหยุดการสร้าง lateral flagella และส่วนที่เหลือจะถูกสลัดให้หลุดออกไปในสภาพแวดล้อมดังกล่าว (Belas and Colwell, 1982)

Vibrio parahaemolyticus พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้จากอาหารทะเลที่มีการบริโภค (Joseph *et al.*, 1983; Wong *et al.*, 1993) ในทางการแพทย์พบว่าส่วนใหญ่ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทำให้มีเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เนื่องจากการสร้างฮีโมไลซินที่ทนต่อความร้อนโดยตรง (TDH: thermostable direct hemolysin) มีสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ฮีโมไลซินนี้เป็นสารจากโปรตีนที่ทนต่อความร้อนจัดเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรค (Kelly and Stroh, 1989; Okuda *et al.*, 1997a). พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* มักจะไม่ก่อโรคของมนุษย์โดยตรง แต่ ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง, หอยนางรม, หอยและสัตว์ทะเลอื่นๆ (Puente *et al.*, 1992; Montilla *et al.*, 1994) และในปลา (Chen and Hanna, 1992) การได้รับเชื้อในมนุษย์มาจากการกินอาหารทะเลที่มีเชื้อ ปะปนอยู่ในได้วันพบว่า สาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ กว่า 80% เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งพบเป็นประจำทุกปี (Chiou *et al.*, 1991; Okuda *et al.*, 1997b)

Vibrio vulnificus เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเส้นดำในกุ้ง (black splint หรือ melanosis) ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดการตายอย่างรุนแรงแต่สามารถทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจพอสมควร เนื่องจากกุ้งที่เป็นโรคเส้นดำจะมีการสะสมเม็ดสี (melanin) ฝังลงไปในกลุ่มเนื้อ มักจะพบที่บริเวณกล้ามเนื้อส่วนท้อง เมื่อนำไปประกอบอาหารเช่นต้มสุก จะทำให้เห็นเป็นสีดำ แทรกอยู่ทำไม่น่ารับประทานและไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (Limsuwan, 1993) การติดเชื้อเป็น

แบบเรื้อรังทำให้กึ่งมีการตอบสนองโดยการสร้างสารต่อต้านในบริเวณนั้น (พรเลิศ และคณะ, 2537) แบคทีเรียชนิดนี้พบได้น้อยในน้ำที่มีความเค็มสูง (Chanratchakool, 1992)

นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ในคนสามารถเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ร่างกายอ่อนแอเนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการก่อโรครุนแรงมากซึ่งทำให้ผู้ติดเชื้อตายภายใน 1 -2 วันหลังจากติดเชื้อสาเหตุของการติดเชื้อส่วนใหญ่พบได้ 2 ทางคือ การกินอาหารทะเลดิบและการติดเชื้อทางบาดแผลมีรายงานในสหรัฐอเมริกาว่า 66% ของผู้ป่วยได้รับเชื้อทางอาหาร อีก 34% มาจากทางบาดแผล (Dechet *et al.*, 2005) และพบว่าอัตราการตายจากการบริโภคหอย สูงขึ้นเป็น 67% จาก 53% เนื่องจากการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Centers for Disease Control and Prevention, 1993) ผู้ที่ติดเชื้อจากการกินจะมีทำให้กระเพาะอักเสบมีอาการหนาวสั่น ปวดขา ความดันเลือดลดต่ำอย่างรวดเร็ว ส่วนผู้ที่ติดเชื้อทางบาดแผลจะมีอาการปวด บวมบริเวณบาดแผลที่ได้รับเชื้อ (Stivers, 2008)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 12 ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม (treatment) ในแต่ละกลุ่มการทดลองมี 3 ซ้ำ (replication) ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 คือกลุ่มควบคุม (control) ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม
กลุ่มการทดลองที่ 2 ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตราส่วน 0.5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

กลุ่มการทดลองที่ 3 ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตราส่วน 1 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 9 จากโรงเพาะฟักเอกชน โดยนำมาปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ที่มีน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt โดยทำการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง ก่อนเริ่มทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 วัน ให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) 4 ครั้งต่อวัน เวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 19.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างพอเพียงตลอดเวลา เมื่อครบ 3 วัน กุ้งจะได้ระยะโพสลาร์วา 12 คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดความยาวใกล้เคียงกัน ส่วนหนึ่งนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ด้วยน้ำความเค็ม 25 ppt ปริมาตร 300 ลิตร ใส่กุ้งถึงละ 50 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) อีกส่วนหนึ่งจำนวน 110 ตัวจะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพก่อนการทดลองโดยใช้วิธีซึ่งดัดแปลงจากวิธีหริณพิไลโอเทก (กรรณวิท และ คำธณ, 2546) โดยมีวิธีการดังนี้

การตรวจคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไม

การตรวจคุณภาพลูกกุ้งโดยวิธีคัดแปลงจากวิธีหริมพีไบโอเทค (กรรมวิท และ คำรณ, 2546) ใช้เป็นแนวทางในการตรวจคุณภาพลูกกุ้งก่อนทำการปล่อยลงเลี้ยงเพื่อให้แน่ใจว่าการวิจัยครั้งนี้มีการนำลูกกุ้งที่มีคุณภาพดีมาศึกษาเพื่อลดปัญหากุ้งอ่อนแอและตายด้วยอาการ อีเอ็มเอสในระหว่างการศึกษาจนทำให้ผลการทดลองไม่น่าเชื่อถือ โดยเกณฑ์สำคัญในเงื่อนไขและขั้นตอนการตรวจมีดังนี้

เงื่อนไขการตรวจคุณภาพลูกกุ้งเบื้องต้น

- ลูกกุ้งที่นำมาตรวจควรอยู่ในช่วงโพสลาร์วา 10-12 หรือลูกกุ้งที่หนามบนกรีไม่น้อยกว่า 3 กรี
- จำนวนลูกกุ้งที่นำมาตรวจต้องมีไม่น้อยกว่า 800 ตัว เหมาะสมที่สุดคือควรมีประมาณ 1,000 -2,000 ตัว ซึ่งได้จากการสุ่มแบบไม่เลือกในบ่อเดียวกัน
- ลูกกุ้งที่นำมาตรวจต้องเป็นลูกกุ้งที่มีชีวิตเท่านั้น ลูกกุ้งที่บอบช้ำมาจากการขนส่ง หรืออดอาหารนานเกิน 3 ชั่วโมง หรือมีตัวตายมากกว่าปกติ ไม่ควรนำมาตรวจ

1) การตรวจให้คะแนนความสมบูรณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจนี้เป็นการตรวจเพื่อดูความสมบูรณ์และความผิดปกติเบื้องต้นของลูกกุ้ง วิธีการตรวจให้สุ่มลูกกุ้งมาจำนวน 10 ตัว ในกุ้งแต่ละตัวให้ทำการตรวจโดยส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์และทำการบันทึกคะแนนลงในตารางบันทึกผลเป็นรายตัว โดยวิธีการตรวจและเกณฑ์การให้คะแนนมีดังนี้

1.1) ความสมบูรณ์ของตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง

ดูจากลักษณะและสีของตับและตับอ่อน ซึ่งลักษณะของตับและตับอ่อนที่สมบูรณ์จะมีลักษณะเต็ม ไม่หดซิด มีสีเข้ม อาจมีสีส้ม เหลือง น้ำตาล หรือสีอื่นๆ ขึ้นอยู่กับอาหารที่ลูกกุ้งได้รับ ส่วนลักษณะของตับและตับอ่อนที่ไม่สมบูรณ์จะมีขนาดเล็กไม่เต็ม หดซิด สีจาง ใสและขาวขุ่น เป็นต้น

การบันทึกผลและเกณฑ์การให้คะแนนในตารางบันทึกผลการตรวจคุณภาพลูกกุ้ง

- ในกรณีที่ผลการตรวจเป็น **เข้ม** ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ **เข้ม** (20)
- ในกรณีที่ผลการตรวจเป็น **จาง** ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ **จาง** (0)

1.2) ปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง

ตรวจสอบโดยการนำพู่ตักของลูกกุ้งมาวางบนสไลด์ แล้วนำแผ่นปิดสไลด์มาวางปิดแล้วนำไปส่องดูปริมาณเม็ดไขมันในตับ โดยเกณฑ์การให้คะแนนมีดังนี้

- กรณีที่ผลตรวจเป็น **เต็ม** หมายถึง มีเม็ดไขมันอยู่เต็ม ทั่วไปในตับ ให้บันทึกผลในคอลัมน์ **เต็ม** (10)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **ปานกลาง** หมายถึง มีเม็ดไขมันปริมาณปานกลาง ให้บันทึกผลในคอลัมน์ **ปานกลาง** (5)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **น้อย** หมายถึง มีเม็ดไขมันในปริมาณเล็กน้อย หรืออาจไม่มีเลย ให้บันทึกผลในคอลัมน์ **น้อย** (0)

1.3) ปรสิตภายนอก

ตรวจดูความสะอาดภายนอกลำตัว และระยางค์ต่างๆทั้งหมดเป็นรายตัว โดยดูว่าพบปรสิตภายนอก เช่น ซูโอแทมเนียม (*Zoothamnium* sp.) วอตีเซลล่า (*Vorticella* sp.) อีพิสไตลิส (*Epistylis* sp.) แบคทีเรียภายนอก (จำพวกฟิลาเมนทัสแบคทีเรียและอื่นๆ) หรือตะกอนอื่นๆที่เกาะติดอยู่ตามระยางค์ต่างๆ แล้วบันทึกผล

- กรณีที่ผลตรวจเป็น **ไม่พบ** ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ **ไม่พบ** (10)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **ปานกลาง** ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ **ปานกลาง** (5)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **มาก** ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ **มาก** (0)

1.4) ความสมบูรณ์ของระยางค์

ดูความสมบูรณ์และความผิดปกติของระยางค์ต่างๆ ทั้งขาเดิน ขาวัยน้ำ รวมทั้งหนวดคู่หน้าด้วย

- กรณีที่ผลตรวจเป็น **สมบูรณ์** หมายถึง ระยางค์ครบสมบูรณ์ปกติ ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ **สมบูรณ์** (10)

- กรณีที่ผลตรวจเป็น **ปานกลาง** หมายถึง พบระยะยาวหรือขาบางส่วนกุด กร่อนเล็กน้อย (ขาเดินต้องพบไม่สมบูรณ์ไม่เกิน 1 คู่ ส่วนขาว่ายน้ำต้องไม่ขาดเกิน 2 คู่) ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ ปานกลาง (5)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **มาก** หมายถึง พบระยะยาวต่างๆ ขาด กร่อนเป็นจำนวนมาก ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ มาก (0)

1.5) อัตราส่วนเนื้อต่อลำไส้ หรือ M:G ratio

การประเมินความกว้างของกล้ามเนื้อส่วนหางเปรียบเทียบกับความกว้างของลำไส้ตรง (hindgut)

- กรณีที่ผลตรวจเป็น **มากกว่า 75 เปอร์เซนต์** หมายถึง อัตราส่วนความกว้างของกล้ามเนื้อหางต่อความกว้างลำไส้ มากกว่า 4:1 ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ มากกว่า 75 เปอร์เซนต์ (10)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **น้อยกว่า 75 เปอร์เซนต์ แต่มากกว่า 50 เปอร์เซนต์** หมายถึง อัตราส่วนความกว้างของกล้ามเนื้อหางต่อความกว้างลำไส้ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4:1 แต่ยังมากกว่า 2:1 ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ น้อยกว่า 75 เปอร์เซนต์ แต่มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ (5)
- กรณีที่ผลตรวจเป็น **50 เปอร์เซนต์ หรือ น้อยกว่า** หมายถึง อัตราส่วนความกว้างของกล้ามเนื้อหางต่อความกว้างลำไส้ เป็น 2:1 หรือน้อยกว่านั้น ให้บันทึกผลลงในคอลัมน์ 50 เปอร์เซนต์หรือน้อยกว่า (0)

สรุปผลการให้คะแนนสำหรับการตรวจคุณภาพลูกกึ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

คำนวณผลที่บันทึกในตารางบันทึกผลการตรวจคุณภาพลูกกึ่ง โดยนำผลคะแนนในช่องคะแนนรวมทั้งหมด คูณด้วย 0.1667 เหน้ที่มาตรฐานการยอมรับสำหรับการตรวจคุณภาพลูกกึ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ควรมีคะแนนการตรวจตั้งแต่ 85 เปอร์เซนต์ ขึ้นไป จึงจะถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

2) การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส

เพื่อตรวจหาการติดเชื้อแบคทีเรียสกุลไวรัส ซึ่งถือว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่ก่อโรคในกุ้งทะเล โดยทำการสุ่มตัวอย่างลูกกุ้งจำนวน 100 ตัว มาตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียไวรัสรวมโดยใช้อาหารเฉพาะ (selective media) สำหรับการเพาะเชื้อไวรัส คือ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS agar)

เกณฑ์มาตรฐานการยอมรับสำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสขั้นตอนนี้ คือ

- พบโคโลนีสีเหลืองไม่เกิน 1,000 โคโลนี
- พบโคโลนีสีเขียวไม่เกิน 100 โคโลนี
- และต้องไม่พบโคโลนีที่เรืองแสง

สำหรับผลการตรวจคุณภาพลูกกุ้งโดยวิธีดัดแปลงจากวิธีหริมพ์ไบโอเทค พบว่าคุณภาพของลูกกุ้งที่นำมาใช้ศึกษาผ่านเกณฑ์มาตรฐาน โดยการตรวจคุณภาพภายใต้กล้องได้คะแนนที่ 89 % ปริมาณแบคทีเรียไวรัสพบโคโลนีสีเหลือง 270 โคโลนี โคโลนีสีเขียว 61 โคโลนีและไม่พบโคโลนีเรืองแสง ซึ่งถือว่าได้ลูกกุ้งที่มีคุณภาพดี จึงนำมาใช้ทำการศึกษา

1.3 การเตรียมน้ำ

ทำการฆ่าเชื้อในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตรก่อนทำการทดลอง โดยการเติมคลอรีนผงลงในถังไฟเบอร์กลาสทุกถังให้ได้ความเข้มข้น 30 พีพีเอ็ม แช่ทิ้งไว้นาน 1 วัน หลังจากนั้นล้างทำความสะอาดแล้วตากให้แห้งประมาณ 2 วัน ส่วนน้ำที่จะใช้เลี้ยงกุ้งในการทดลอง เตรียมโดยการนำน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน 30 พีพีเอ็ม แล้วเปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลาเป็นเวลาประมาณ 3 วันเพื่อกำจัดคลอรีนให้หมดไปก่อนจะนำมาใช้เลี้ยงกุ้ง ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยใช้โพแทสเซียมไอโอไดน์ (KI) หยดลงไปในน้ำ ถ้าน้ำยังมีคลอรีนอยู่จะมีสีน้ำตาล

1.4 การเตรียมอาหารทดลอง

สำหรับการเตรียมอาหารทดลองใช้วิธีสเปรย์ กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 บนอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ในแต่ละกลุ่มการทดลองให้ทั่ว แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันและผสมให้แห้ง ให้อาหารวันละ 4 ครั้งต่อวัน เวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น.

15.00 น. และ 19.00 น. โดยปริมาณการให้อาหารใช้ตามวิธีของ ชลอและพรเลิศ (2547) ซึ่งมีการสังเกตและปรับลดปริมาณอาหารตามปริมาณการกินของกุ้ง ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง 60 วัน

1.5 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

สุ่มตัวอย่างกุ้งในแต่ละถัง ถึงละ 10 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักและบันทึกผลทั้งหมด 3 ครั้งคือในวันที่ 40, 50 และ 60

1.6 การศึกษาอัตราการรอดตาย

นับจำนวนกุ้งที่รอดชีวิตในแต่ละถังในวันที่ 60 โดยจำนวนที่นับได้ในแต่ละครั้งจะนำมาคำนวณหาอัตราการรอดตายตามสูตร ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมดที่ปล่อยลงไป}} \times 100$$

1.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยง

ในระหว่างการเลี้ยงทุกกลุ่มการทดลองจะมีการตรวจคุณภาพน้ำให้มีค่าที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) อุณหภูมิ (Temperature) ความเค็ม (Salinity) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) แอมโมเนียรวม (total ammonia) และไนไตรท์ (nitrite) จะมีการวิเคราะห์ เปลี่ยนถ่ายน้ำและนับอัตราการรอดตาย ทุก ๆ 10 วัน ตลอดการเลี้ยง

- ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) และอุณหภูมิ (temperature) วัดโดยใช้เครื่อง YSI DO 200-4M
- ความเค็ม (salinity) วัดโดยใช้เครื่อง YSI 30/10 FT
- ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) วัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชรุ่น Ecoscan pH 5
- ความเป็นด่าง (total alkalinity) วัดโดยใช้วิธี titration (APHA *et al.*, 1995)
- ปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia-nitrogen) วัดโดยใช้วิธี phenol-hypochlorite method (APHA *et al.*, 1995)
- ปริมาณไนไตรท์ (nitrite-nitrogen) วัดโดยใช้วิธีของ APHA *et al.* (1995)

1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 60 วันทำการนับจำนวนกุ้งและชั่งน้ำหนัก นำข้อมูลมาคำนวณ อัตรารอดตายและการเจริญเติบโต วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตรารอดตายและการเจริญเติบโต โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย ระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

2. การศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ทดลองโดยใช้ถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 12 ถัง แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

- กลุ่มการทดลองที่ 1 คือกลุ่มควบคุม (control) ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม
- กลุ่มการทดลองที่ 2 ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตราส่วน 0.5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม
- กลุ่มการทดลองที่ 3 ใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตราส่วน 1 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 14 วันแล้วบันทึกอัตราการเจริญเติบโต, อัตราการรอดตาย, ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเลือดกุ้ง, และลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (histopathology) ของทุกกลุ่มทดลอง

แต่ละกลุ่มทดลองในการศึกษานี้ประกอบด้วยหน่วยทดลองย่อยจำนวน 4 ซ้ำ โดยแบ่งเป็นกลุ่มทดลองที่ใช้สำหรับการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายจำนวน 3 ซ้ำ ส่วนอีก 1 ซ้ำจะใช้ในการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเลือดกุ้งและการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมจากการทดลองแรกมาคัดเลือกกุ้งที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตรที่มีน้ำทะเลความเค็ม 25 พีพีที ปริมาณ 300 ลิตร จำนวน 12 ถัง โดยปล่อยในอัตราความหนาแน่น 100 ตัวต่อตารางเมตรหรือ 50 ตัวต่อถัง มีการให้อาหารตลอดเวลาและควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ 29 ± 1 องศาเซลเซียส

2.3 การให้อาหาร

ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง เวลา 7.00 น., 11.00 น., 15.00 น. และ 19.00 น. สำหรับกลุ่มการทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มการทดลองที่ 2 และ 3 ให้อาหารเช่นเดียวกับกลุ่มการทดลองที่ 1 แต่ผสมกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลุ่มโอเมก้า-3 มีการปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้งตามวิธีของชโล และ พรเลิศ (2547)

2.4 การเติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ลงไปในถังเลี้ยงกุ้ง

นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ผ่านการต่อเชื้อมาแล้ว 2 วัน เติมลงไปในถังเลี้ยงกุ้งทุกกลุ่มทดลองให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10^5 CFU/มิลลิลิตร บันทึกอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของทุกกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาที่เลี้ยง 14 วัน

2.5 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

สุ่มตัวอย่างกุ้งในแต่ละถัง นำมาชั่งน้ำหนักและบันทึกผลในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงที่ 14 วัน

2.6 การศึกษาอัตราการรอดตาย

นับจำนวนกุ้งที่รอดชีวิตในแต่ละถังหลังสิ้นสุดการทดลอง จากนั้นนำมาคำนวณหาอัตราการรอดตายตามสูตร ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมดที่ปล่อยลงไป}} \times 100$$

2.7 การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

สุ่มกึ่งแต่ละกลุ่มทดลองกลุ่มละ 5 ตัวในวันที่ 14 ของการทดลอง จากนั้นนำมาแช่ในน้ำยา Davison's fixative แล้วนำไปศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยวิธีของ Bell and Lighter (1998)

2.7.1 วิธีการดองตัวอย่าง

ตัวอย่างกึ่งจะนำมาดองในน้ำยา Davison's fixative โดยให้น้ำยามีปริมาตรประมาณ 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการดองจะขึ้นอยู่กับขนาดของกึ่ง ดังนี้

1. กึ่งระยะโพสลาว่า จะแช่ในน้ำยาทั้งตัว
2. กึ่งขนาดน้อยกว่า 2 กรัม จะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อนด้วยเข็มฉีดยา และอาจฉีดเข้าบริเวณท้องด้วย แล้วค่อยแช่ลงในน้ำยาดองทั้งตัว
3. กึ่งขนาด 2-12 กรัม จะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับ ตับอ่อนและกล้ามเนื้อ
4. กึ่งที่มีขนาดใหญ่กว่า 12 กรัม ควรตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน บริเวณรอยต่อของส่วนหัวอกกับส่วนท้อง และส่วนท้องระหว่างปล้องที่ 3 กับ 4 ก่อนแช่ลงในน้ำยาดอง

ปริมาตรน้ำยาที่ฉีด ประมาณ 0.1-10 มิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของกึ่ง หลังจากตัวอย่างที่แช่ในน้ำยาดองประมาณ 24-72 ชั่วโมง จะเปลี่ยนไปเก็บไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50% ซึ่งเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง

2.7.2 วิธีการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา

1. การเตรียมชิ้นเนื้อ ในกึ่งขนาดเล็กจะใช้ทั้งตัว ส่วนในกึ่งที่มีขนาดใหญ่จะตัดใช้เฉพาะบางส่วนที่ต้องการศึกษา ซึ่งในการทดลองนี้จะศึกษาเฉพาะอวัยวะในระบบท่อหุ้มร่างกาย เท่านั้น โดยจะตัดให้มีขนาดหนาไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

2. นำชิ้นเนื้อมาบรรจุลงใน embedding cassette แล้วนำมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ในเครื่อง Automatic Tissue Processor ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาหาลอมให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน

3. นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้หนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่น 40-45°C เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วใช้สไลด์ซ้อนขึ้นมาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน กรณีถ้าจะย้อมสีพิเศษจะต้องใช้ adheseive ทาบนสไลด์ก่อนซ้อนตัวอย่าง

4. เมื่อเนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้ว ก็นำมาย้อมสี ด้วยการละลายพาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ hydration คือการดูดน้ำเข้าด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูงไปต่ำ แล้วทำการย้อมสี หลังจากนั้นจึงนำมาผ่านกระบวนการ dehydration การดึงน้ำออก ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง แล้วแช่ในไซลีน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และสารละลาย Permount

2.7.3 การอ่านผล

นำสไลด์ถาวรที่ได้มาทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของระบบท่อหุ้มร่างกายในกุ้งขาวแวนนาไม แล้วทำการรวบรวมผลการศึกษาดังนี้

2.8 การศึกษาคุณสมบัติของน้ำบางประการ

เก็บตัวอย่างน้ำในแต่ละถังทดลองมาวิเคราะห์น้ำทุกๆ สัปดาห์ โดยค่าที่ต้องนำมาวิเคราะห์ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเป็นด่าง ปริมาณแอมโมเนียรวมและปริมาณไนไตรท์ ด้วยวิธีการดังนี้

- ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) และอุณหภูมิ (temperature) วัดโดยใช้เครื่อง YSI DO 200-4M
- ความเค็ม (salinity) วัดโดยใช้เครื่อง YSI 30/10 FT
- ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) วัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชรุ่น Ecoscan pH 5
- ความเป็นด่าง (total alkalinity) วัดโดยใช้วิธี titration (APHA *et al.*, 1995)
- ปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia-nitrogen) วัดโดยใช้วิธี phenol-hypochlorite method (APHA *et al.*, 1995)
- ปริมาณไนไตรท์ (nitrite-nitrogen) วัดโดยใช้วิธีของ APHA *et al.* (1995)

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (Steel and Torrie, 1980) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

3. การศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการนั้น ในแต่ละชุดการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งขาวในแต่ละกลุ่มการทดลองซ้ำละ 3 ตัว ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละถัง หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 14 วัน โดยทำการเจาะเลือดบริเวณแอ่งเลือด (ventral sinus) ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) แล้วนำเลือดที่ได้ไปใช้วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง วิเคราะห์ กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง วิเคราะห์กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase โดยมีวิธีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเบื้องต้นของกุ้งดังนี้

3.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

1. ดูดเลือดจากแอ่งเลือด โดยในหลอดฉีดยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

2. ใช้ micropipette ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยหาค่าได้จาก

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

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ $\times 10^4 \times$ ค่า dilution

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

1. เจาะเลือดกึ่งจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (เลือดกึ่ง : anticoagulant) 1:2 โดยเจาะเลือดกึ่ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดนํ้าที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง นำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือดโดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้น-ลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

3. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

4. ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และใช้ pipette ดูดขึ้น-ลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

5. นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตรและสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตรเพื่อนำมานับจำนวนเม็ดเลือดใน hemacytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

6. นำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เลี้ยงบน cover glass โดย spread ทิ้งไว้ 20 นาที

7. ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

8. หยอดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

9. ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

10. หยอดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

11. ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง

12. ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

13. ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

14. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

15. ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

16. ปิดสไลด์ด้วย permout

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์ คำนวณค่าจาก

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

กลืนกินสิ่งแปลกปลอม (%phagocytosis)

3.3 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543 น)

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (เนื่องจากเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สามารถนำไปละลายในน้ำเกลือได้ง่ายกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร TCBS จึงนิยมเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA)

2. เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวละลายในน้ำเกลือ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ที่ประมาณ 0.08 – 0.1

3. เจาะเลือดกึ่งจากแองเกล็ด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด อัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกึ่ง 1 มิลลิลิตร โดยในเข็มฉีดยามีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดอยู่ประมาณ 1 มิลลิลิตร

4. หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm. 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบน

5. นำซีรัมที่แยกได้มาเจือจาง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในระดับ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

6. นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรัม ในที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเติมสารละลายแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7. นำแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางสารละลายแต่ละหลอด โดยใช้ น้ำเกลือความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

3.4 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกึ่งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543 จ)

1. เก็บตัวอย่างเลือดกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด
2. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 rpm. เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้มาล้างในสารละลาย K-199 และสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4
4. ทำให้อส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที
5. นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. แยกส่วนใสด้านบนซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase โดยดัดแปลงจากวิธีของ Söderhäll and Hall (1984) มีวิธีการดังนี้

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

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

3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารป้องกันการแข็งตัว สารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายทริปซิน L- dihydroxyphenylalanine และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์

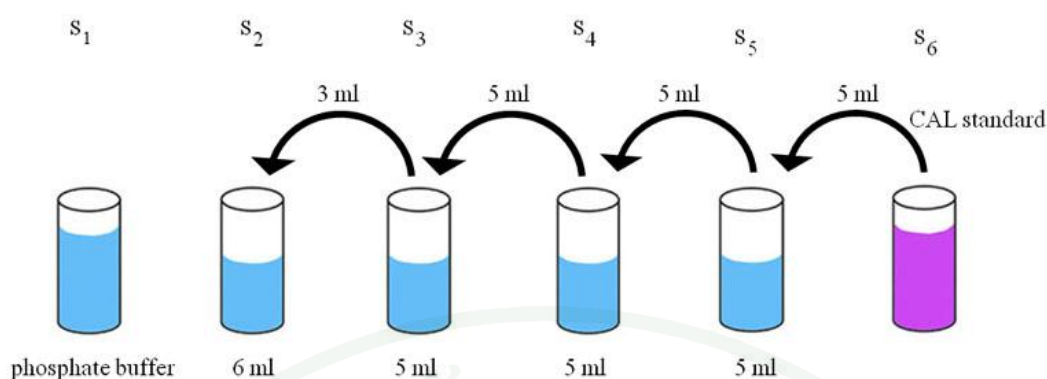
4) นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยคำนวณหาค่าดังนี้

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta OD_{490} / \text{นาที/มิลลิกรัมโปรตีน}$$

3.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

ทำการศึกษาโดยใช้ชุดทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD @superoxide dismutase โดยเตรียมชุดมาตรฐานใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

1.เตรียมสารมาตรฐาน S₁-S₆ จากสารละลาย CAL standard และสารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD @superoxide dismutase

2. นำสารละลายมาตรฐาน S₁-S₆ เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R₁ 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R₂ 250 ไมโครลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A₁ ที่ 30 วินาที และจดค่า A₂ ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

1) เก็บเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดจนได้ปริมาตรครบ 1 มิลลิตร

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

3) นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ

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

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

6) ละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตร มิลลิตร

7) นำสารละลายเม็ดเลือดที่เตรียมไว้ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร

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

9) นำค่า A_1 และ A_2 ที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition โดยคำนวณหาค่าดังนี้

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

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(B_n * 100)}{B_{s1}}$$

10) นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของสารมาตรฐาน S1-S6 มาสร้างกราฟ log ฐาน 10 เพื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของตัวอย่างเลือดกึ่งมาหาค่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในหน่วยเอนไซม์ superoxide dismutase unit ต่อมิลลิกรัม (SOD unit/ml)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ระหว่างเดือน มิถุนายน พ.ศ.2556 – กุมภาพันธ์ 2557

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 12 ในห้องปฏิบัติการ

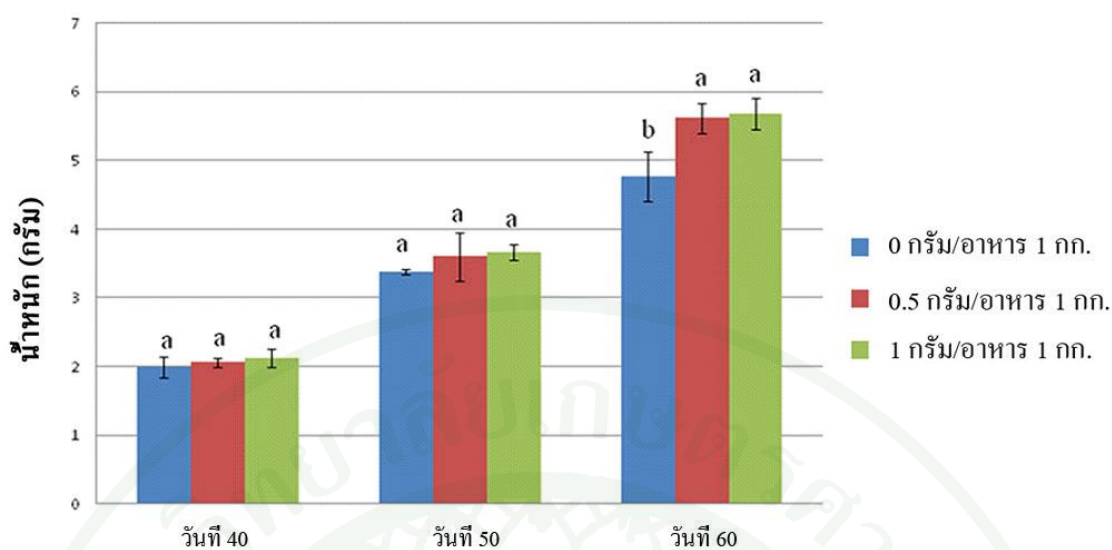
1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโต

จากการศึกษาเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วันในแต่ละกลุ่มการทดลองนั้นพบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม และกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม นั้น มีน้ำหนักเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันที่ 5.68 ± 0.23 และ 5.62 ± 0.22 กรัม ตามลำดับ แต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเพียงอย่างเดียวซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 4.77 ± 0.36 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 40, 50 และ 60 วัน

กลุ่มการทดลอง	ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง (วัน)		
	40	50	60
กลุ่มควบคุม	1.99 ± 0.15^a	3.38 ± 0.04^a	4.77 ± 0.36^b
0.5 กรัมต่ออาหาร 1กก.	2.06 ± 0.07^a	3.60 ± 0.36^a	5.62 ± 0.22^a
1 กรัมต่ออาหาร 1กก.	2.12 ± 0.13^a	3.67 ± 0.11^a	5.68 ± 0.23^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 2 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 40, 50 และ 60 วัน

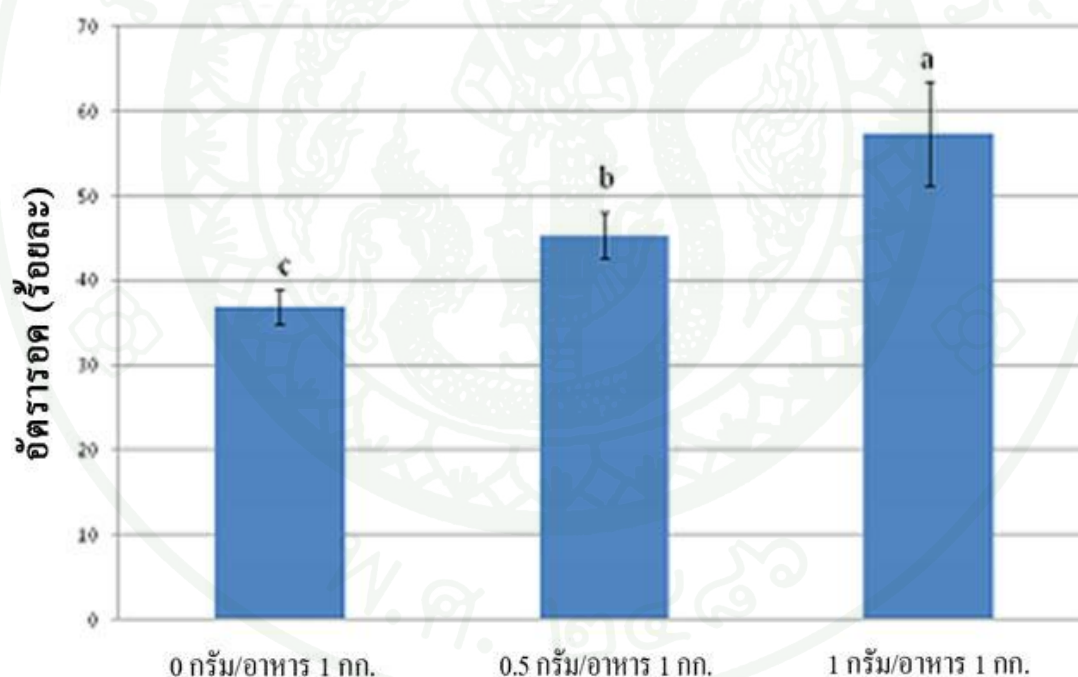
1.2 ผลการศึกษ้อัตราการรอดตาย

สำหรับการศึกษาการใช้อาหารเสริม กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ผสมกับอาหารสำเร็จรูป สำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้น พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงที่สุด คือ $57.33 \pm 6.11\%$ รองลงมาคือ กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย คือ $45.33 \pm 2.67\%$ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเพียงอย่างเดียวซึ่งพบอัตราการรอดตายเพียง $36.89 \pm 2.04\%$ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 อัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกันหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

กลุ่มการทดลอง	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
	วันที่ 60
กลุ่มควบคุม	36.89 ± 2.04^c
0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	45.33 ± 2.67^b
1 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	57.33 ± 6.11^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 3 อัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกันหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

2. ผลการศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

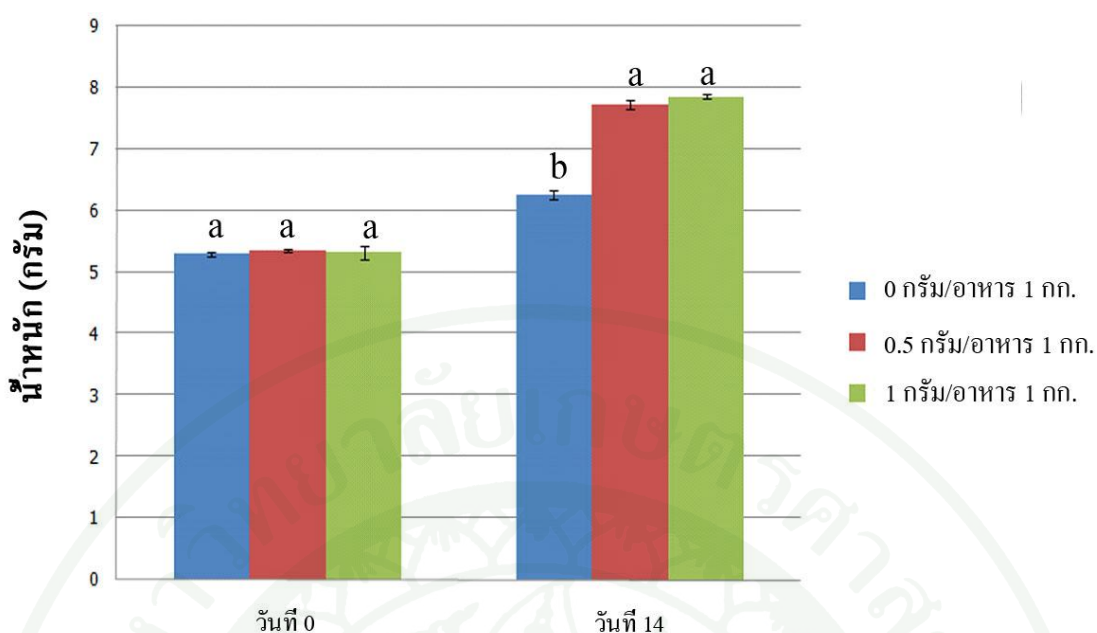
2.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

ในขณะที่ยอดการเจริญเติบโตของกุ้งหลังจากใส่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/ml แล้วตรวจสอบการเจริญเติบโตเป็นเวลา 14 วัน พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.86 ± 0.04 กรัม ตามด้วยน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 7.73 ± 0.08 กรัม ในขณะที่กุ้งในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากับ 6.26 ± 0.08 กรัม

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ซึ่งได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน ก่อนและหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน

กลุ่มการทดลอง	ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง (วัน)	
	0	14
กลุ่มควบคุม	5.30 ± 0.04^a	6.26 ± 0.08^b
0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	5.35 ± 0.02^a	7.73 ± 0.08^a
1 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	5.32 ± 0.12^a	7.86 ± 0.04^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไม (กรัม) ซึ่งได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน ก่อนและหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน

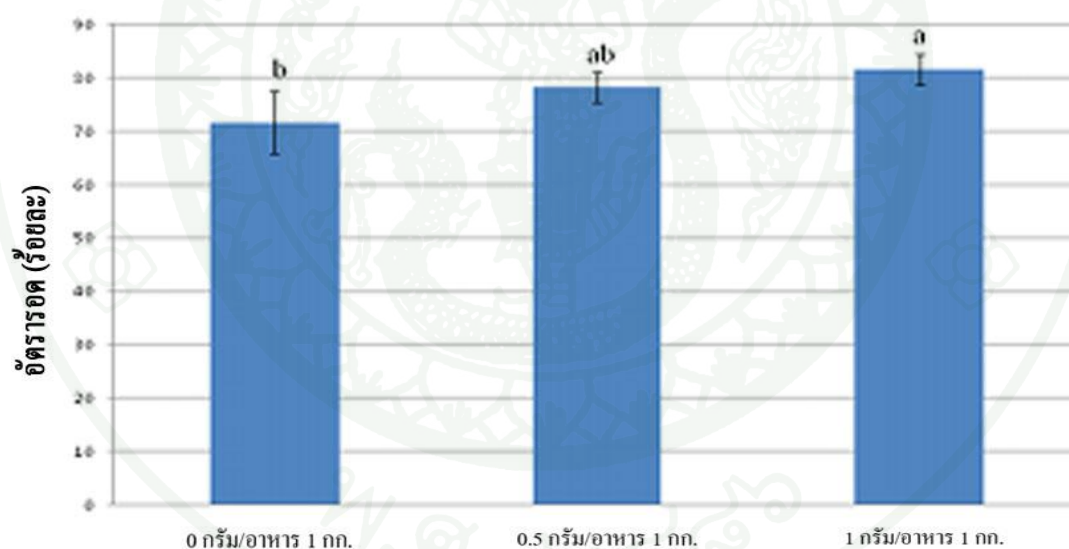
2.2 ผลการศึกษาอัตราการรอดตาย

ผลการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (โดยเริ่มทำการทดลองหลังจากการทดลองแรกเป็นเวลา 7 วัน) โดยนำกุ้งจากการทดลองแรกมาเลี้ยงต่อในน้ำที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/ml แล้วตรวจสอบการเจริญเติบโตเป็นเวลา 14 วัน พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายสูงสุด คือ $81.67 \pm 2.89\%$ รองลงมากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม คือ $78.33 \pm 2.89\%$ และกุ้งในกลุ่มควบคุมจะมีอัตราการรอดตายที่ต่ำสุด คือ $71.67 \pm 5.77\%$ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดตาย (ร้อยละ) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกันหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน

กลุ่มการทดลอง	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
	วันที่ 14
กลุ่มควบคุม	71.67 ± 5.77^b
0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	78.33 ± 2.89^{ab}
1 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	81.67 ± 2.89^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



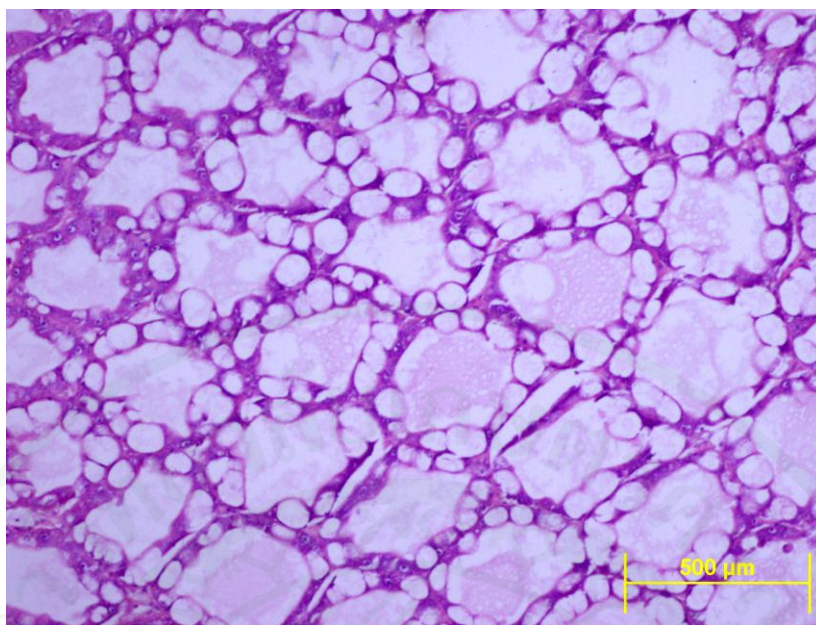
ภาพที่ 5 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกันหลังแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน

2.3 ผลการศึกษาพยาธิสภาพ

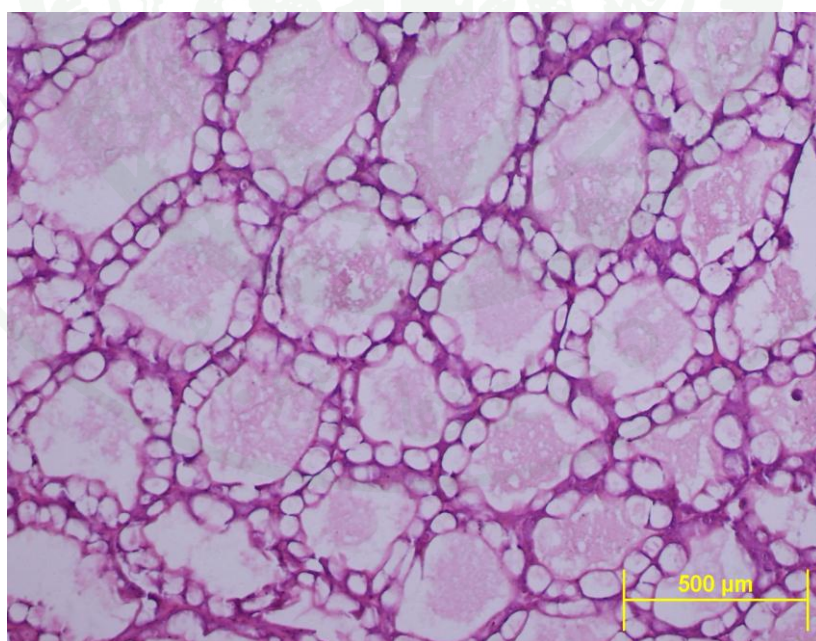
ผลการศึกษาด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวในแต่ละกลุ่มการทดลองหลังจากได้รับการแช่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งทุกกลุ่มการทดลองไม่พบลักษณะของการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียอย่างรุนแรงในตับและตับอ่อนของกุ้งเลย อย่างไรก็ตามพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งในกลุ่มควบคุมส่วนใหญ่แสดงอาการเซลล์ตับและตับอ่อนลึบฝ่อและมีปริมาณของเซลล์ไขมันในตับและตับอ่อนน้อย ดังแสดงในภาพที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในปริมาณ 0.5 และ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งพบว่าตับและตับอ่อนมีความสมบูรณ์และมีการสะสมของเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนในปริมาณที่สูงกว่าตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 7 และ 8)



ภาพที่ 6 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งที่อยู่ในกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 แสดงอาการเซลล์ตับและตับอ่อนลึบฝ่อ ลึบพบปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนจำนวนน้อย (H&E : bar = 500 μ m)



ภาพที่ 7 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกึ่งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนปกติมีปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนจำนวนมาก (H&E : bar = 500 μm)



ภาพที่ 8 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกึ่งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนปกติมีปริมาณเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนจำนวนมาก (H&E : bar = 500 μm)

3. ผลการศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

3.1 ผลการตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

ตารางที่ 5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน

กลุ่มการทดลอง	THC (10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร)
กลุ่มควบคุม	12.63 ± 11.03^a
0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	17.07 ± 10.86^a
1 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	22.77 ± 9.02^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลของปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับต่างๆแสดงในตารางที่ 5 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งสูงที่สุดเท่ากับ $22.77 \pm 9.02 \times 10^5$ รองลงมาคือกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งเท่ากับ $17.07 \pm 10.86 \times 10^5$ และต่ำที่สุดคือกุ้งในกลุ่มควบคุม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $12.63 \pm 11.03 \times 10^5$ แต่ทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1)

3. 2 ผลของกิจกรรมกระบวนการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง

ตารางที่ 6 ร้อยละของเม็ดเลือดของกึ่งขาวเวนนาไมที่เกิดการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอมที่ได้รับ
อาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน

กลุ่มการทดลอง	ร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอม
กลุ่มควบคุม	3.22 ± 0.44^c
0.5 กรัมต่ออาหาร 1กก.	6.78 ± 2.11^b
1 กรัมต่ออาหาร 1กก.	9.22 ± 1.56^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน
มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลของการศึกษากิจกรรมกระบวนการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งของกึ่งขาว
เวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกึ่งขาวเวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันกลุ่ม
โอเมก้า-3 ในระดับต่างๆเปรียบเทียบกับชุดควบคุมแสดงในตารางที่ 6 พบว่ากึ่งในกลุ่มที่ได้รับ
อาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีร้อยละของ
เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอมที่สูงที่สุดเท่ากับ 9.22 ± 1.56 รองลงมาคือ กึ่งในกลุ่ม
ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีร้อย
ละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอม เท่ากับ 6.78 ± 2.11 ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความ
แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลั่นกินสิ่ง
แปลกปลอมสูงกว่ากึ่งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกึ่งขาวเวนนาไมเพียงอย่าง
เดียว เท่ากับ 3.22 ± 0.44

3.3 ผลของกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

ตารางที่ 7 ปริมาณความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ 50% หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน

กลุ่มการทดลอง	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง
กลุ่มควบคุม	1:4
0.5 กรัมต่ออาหาร 1กก.	1:4
1 กรัมต่ออาหาร 1กก.	1:4

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลของกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (โปรตีน 36%) ที่ผสมกับกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับต่างๆ เปรียบเทียบกับกุ้งในกลุ่มควบคุม แสดงในตารางที่ 7 พบว่ามีอัตราส่วนการเจือจางที่ต่ำสุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากันคือ 1:4 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันกับชุดควบคุม

3.4 ผลของกิจกรรม phenoloxidase activity

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน

กลุ่มการทดลอง	phenoloxidase activity (นาฬิกา/มิลลิกรัม โปรตีน)
กลุ่มควบคุม	96.27±3.30 ^b
0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	113.28±4.49 ^a
1 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	114.56±4.61 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับต่างๆเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงในตารางที่ 8 พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity เท่ากับ 114.56±4.61 และ 113.28±4.49 หน่วย/นาฬิกา/มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity เท่ากับ 96.27±3.36 หน่วย/นาฬิกา/มิลลิกรัม โปรตีน

3.5 ผลของกิจกรรม superoxide activity

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide activity ของกุ้งขาวหลังจากที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน

กลุ่มการทดลอง	การผลิตเอนไซม์ superoxide activity (SOD/มิลลิลิตร)
กลุ่มควบคุม	3.54±3.12 ^a
0.5 กรัมต่ออาหาร 1กก.	3.56±3.09 ^a
1 กรัมต่ออาหาร 1กก.	5.43±2.67 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide activity ของกุ้งขาว หลังจากที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 เปรียบเทียบกับกุ้งในกลุ่มควบคุมแสดงในตารางที่ 9 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide activity สูงที่สุดเท่ากับ 5.43±2.67 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ส่วนกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมเท่ากับ 3.56±3.09 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ส่วนกุ้งในกลุ่มควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide activity เท่ากับ 3.54±3.12 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ซึ่งทุกกลุ่มการทดลองมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide activity ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4. ผลการศึกษาคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยง

คุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงตลอดระยะเวลาในการศึกษานาน 60 วัน ได้แก่ ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO), อุณหภูมิ (temperature), ความเค็ม (salinity), ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH), ค่าความเป็นด่าง (total alkalinity), ปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia-nitrogen) และปริมาณไนไตรท์ (nitrite-nitrogen) ทุกพารามิเตอร์ ถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 คุณสมบัติของน้ำเกลือตลอดระยะเวลา 60 วันของการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในระดับที่แตกต่างกัน

คุณสมบัติของน้ำ	กลุ่มควบคุม	0.5g/kg feed	1g/kg feed
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	7.13 ± 0.69	7.26 ± 0.62	7.01 ± 0.83
พีเอช	7.93 ± 0.30	7.82 ± 0.36	7.99 ± 0.38
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	29.19 ± 0.89	29.31 ± 0.69	29.29 ± 0.72
ค่าความเค็ม (พีพีที)	25.86 ± 0.69	25.71 ± 0.95	25.57 ± 0.79
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	117.43 ± 6.95	118.43 ± 4.86	118 ± 4.20
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.5 ± 0.21	0.53 ± 0.25	0.55 ± 0.19
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01

วิจารณ์

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 หรือกลุ่มกรดไลโนเลนิก (linolenic acid series) มาเป็นอาหารเสริมในลูกกุ้งระยะโพสลาร์วา 12 จนถึงระยะ juvenile นั้น สามารถเพิ่มอัตราการรอดตายและช่วยให้กุ้งมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวทั่วไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ปิยารมณ และคณะ (2552) ที่ทำการศึกษผลของอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำและความเค็มปกติโดยพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริม *Schizochytrium* sp. ซึ่งมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่นั้นจะมีอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับแต่อาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียว สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม นั้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงที่สุด ตามด้วยกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 มีน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการรอดตายต่ำสุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ทั้งสองกลุ่ม เมื่อพิจารณาจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ ทาริกา (2543) ศึกษาผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตั้งแต่ระยะโพสลาร์วา 15 โดยการผสม HUFA ในอัตราส่วน 0, 0.5 และ 1.0

เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่กุ้งที่ได้รับผสม HUFA ในอัตราส่วน 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตาย 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ Rees *et al.* (1994) ซึ่งศึกษาปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) โดยเสริมให้อาร์ทีเมียในอัตราส่วน 100, 200, 300 และ 400 ppm ก่อนนำไปอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาว่า 5 ถึงระยะโพสลาว่า 15 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 100 ppm มีการเจริญเติบโตสูงไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 200 ppm แต่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 200 ppm มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 100 ppm นอกจากนี้ Gonzalez-Felix *et al.* (2002b) รายงานว่าปริมาณที่น้อยที่สุดของ HUFA ในอาหารที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาในระยะเวลา juvenile เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด แต่ปริมาณของ HUFA 2.0 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลงในขณะที่อัตราการรอดตายปกติ

สำหรับผลการศึกษาเกี่ยวกับความสำคัญของกรดไขมันต่อสรีระวิทยาของกุ้งนั้น Palacios *et al.* (2004) รายงานว่ากุ้งขาวแวนนาในระยะเวลาโพสลาว่า 20 ที่ได้รับอาหารผสม HUFA มีการแตกสาขาและพื้นที่ผิวของเหงือกเพิ่มขึ้นมากกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ HUFA ซึ่งการมีพื้นที่ผิวของเหงือกมากขึ้นช่วยในการขนส่งออกซิเจนและการทำงานของเอนไซม์ $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase pump}$ ในการแลกเปลี่ยนไอออน รวมทั้งควบคุมการผ่านเข้าและออกนอกเซลล์ของน้ำหรือช่วยรักษาปริมาณน้ำในร่างกายให้อยู่ในสภาวะปกติ ทำให้กุ้งมีความต้านทานต่อความเครียดโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ดีมีความแข็งแรงขึ้น

การศึกษาลักษณะประสิทธิภาพของอาหารเสริม กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการการรอดตายและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไม่ พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายสูงสุด คือ $81.67 \pm 2.89\%$ แตกต่างจากกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียที่พบในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งของกรดไขมันกลุ่ม โอเมก้า-3 ที่กุ้งทดลองได้รับตามที่แสดงไว้ในผลการทดลองในส่วนจากระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เพิ่มขึ้นซึ่งพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 และ 1 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัมจะมีระดับภูมิคุ้มกันได้แก่ กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดของกุ้งขาว และ กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับกรดไขมัน กลุ่ม

โอเมก้า-3 สอดคล้องกับการศึกษาของ Nonwachai และคณะ (2010) ซึ่งทำการศึกษาผลของ *Schizochytrium* sp. ที่มีต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมและความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งพบว่า ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้แก่ Total hemocyte count (THC), Percentage phagocytosis, Bacteriacidal activity, Phenoloxidase activity (PO) และsuperoxide dismutase activity (SOD) ของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. มีระบบภูมิคุ้มกันในทุกพารามิเตอร์สูงกว่ากุ้งในกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารที่เสริม *Schizochytrium* sp.



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 12 เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในกลุ่ม ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม และกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม นั้น มีน้ำหนักเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันที่ 5.68 ± 0.23 และ 5.62 ± 0.22 ตามลำดับ ในวันที่ 60 ซึ่งทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเพียงอย่างเดียวซึ่งน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 4.77 ± 0.36 กรัม

2. การศึกษาผลของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ต่ออัตราการรอดตาย โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงที่สุด คือ $57.33 \pm 6.11\%$ รองลงมาคือ กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย คือ $45.33 \pm 2.67\%$ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีอัตราการรอดตายสูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเพียงอย่างเดียว เท่ากับ $36.89 \pm 2.04\%$

3. ผลการศึกษาด้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอดตายสูงที่สุด คือ $81.67 \pm 2.89\%$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุม แต่กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกุ้งทั้งสองกลุ่ม

4.การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมที่สูงที่สุด เท่ากับ 9.22 ± 1.56 รองลงมาคือ กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เท่ากับ 6.78 ± 2.11 และตามด้วยกลุ่มควบคุม ทุกกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และผลของกิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity พบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในอัตรา 1 และ 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase activity เท่ากับ 114.56 ± 4.61 และ 113.28 ± 4.49 หน่วย/นาทีก/มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุม

5.การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งทุกกลุ่มการทดลองไม่พบลักษณะของการตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งเลย แต่พบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมจะแสดงพยาธิสภาพเซลล์ตับและตับอ่อนเล็กน้อย ฝ่อพบการสะสมของเซลล์ไขมันที่ค่อนข้างน้อย ในขณะที่กุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ในปริมาณ 1 และ 0.5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมแสดงพยาธิสภาพเซลล์ตับและตับอ่อนมีความสมบูรณ์พบการสะสมของเม็ดไขมันในตับและตับอ่อนในปริมาณที่มาก

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อแสดงให้เห็นว่ากรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ซึ่งสกัดจากจุลินทรีย์กลุ่ม *Schizochytrium* sp. สามารถนำมาใช้เป็นอาหารเพื่อเสริมความแข็งแรงและกระตุ้นการเจริญเติบโตแก่กุ้งได้ ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับแนวทางการนำสารสกัดจากสาหร่ายหรือจุลินทรีย์ชนิดต่างๆซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 มาประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เพื่อลดการใช้โปรตีนจากสัตว์ทะเลและเพื่อควบคุมต้นทุนการผลิตให้มีความเหมาะสมสอดคล้องกับปริมาณสัตว์ทะเลในธรรมชาติซึ่งมีแนวโน้มที่ลดลงไปเรื่อยๆทำให้ต้นทุนการนำสัตว์น้ำเหล่านี้มาใช้ประโยชน์สูงขึ้นตามไปด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

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

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

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

_____, จีพร เรืองศรี, สุภา คีร์รัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคใน
 กุ้งกุลาคำ: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาคำบนพื้นฐานของ
 เพศ และวงจรการลอกคราบ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22
 (ฉบับพิเศษ): 623-632.

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

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

กรรมวิทย์ รุจิรวัฒน์ และคำรณ ไวยครุฑา. 2546. การตรวจคุณภาพลูกกุ้งโดยวิธี ขมิ้นไปโอเทค, น. 30-48. ใน รายงานการสัมมนาเรื่อง การเลี้ยงกุ้งคุณภาพเพื่อการบริโภคและการส่งออก วันที่ 30 กันยายน 2546. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

ชลอ ลี้มสุวรรณ. 2530. โรคกุ้งทะเลที่มีสาเหตุมาจากไวรัสและแบคทีเรีย, น. 9-26. ใน ชลอ ลี้มสุวรรณ, ยนต์ มุสิก, ชีระ เล็กชลยุทธ, กังวาลย์ จันทรโชติ และ นงนุช รักสกุลไทย, บรรณาธิการ. เอกสารประกอบการสัมมนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลครั้งที่ 1 โรคกุ้งทะเลและการใช้เคมีภัณฑ์. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ชมรมวิทยาศาสตร์การประมง.

_____. 2543. กุ้งไทย 2000 คู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

_____ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ณัฐินี มั่นคงวงศ์ศิริ, ชลอ ลี้มสุวรรณ และ นิติ ชูเชิด. 2556. ผลของคุณภาพลูกกุ้งต่อการเกิดโรค Early Mortality Syndrome ในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม, น. 174-181. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 สาขาสัตวแพทยศาสตร์, สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ถิรวัฒน์ รายรัตน์. 2557. ผลของ Sangrovit ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการป้องกัน การติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทรงทรัพย์ อรุณกมล, นนทวิทย์ อารีชัยน, วิเชียร ขงมานิตย์ชัย, สาวิตรี ลิ้มทอง และเดือนรัตน์ ชลอุดมกุล. 2551. การใช้สาหร่ายขาว *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) และผลที่มีต่อความเครียดและความต้านทานโรค, น. 138-146. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (สาขaprะมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. 2550. **ชีววิทยาของครัสเตเชียน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพมหานคร.

ประจวบ หล้าอุบล. 2543. อติต-อนาคตกุ้งไทย, น.1-66. ใน **เสวนาวิชาการเรื่องกุ้ง**. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิยารมณ พวงช่อ, ปัทมา ระตะนະอาพร , ชลอ ลี้มสุวรรณ และ นิติ ชูเชิด. 2552. ผลของ *Schizochytrium* sp. ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone) ในน้ำความเค็มต่ำและปกติ. น. 117-123. ใน **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 47 (สาขาประมง)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิษณุ ฤกษ์วิถิ. 2557. ผลของ AMASIL[®] NA และ Lucantin[®] Pink CWD ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

พรเลิศ จันทร์รัชกุล, เจ เอฟ เทอร์นบอล และ ชลอ ลี้มสุวรรณ. 2537. **คู่มือการเลี้ยงและป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ**. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

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

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

มยุรา ประยูรพันธ์. 2549. **กรดไขมันในทรอสโทลิตริดส์ที่คัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ลิลลา เรื่องแป้น. 2530. โรคกุ้งทะเลในประเทศไทย : กุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย, น. 46-62. ใน ชลอ ลีมสุวรรณ, ยนต์ มุสิก, ชีระ เล็กชลยุทธ, กังวาลย์ จันทระโชติ และ นงนุช รักสกุลไทย, บรรณาธิการ. เอกสารประกอบการสัมมนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลครั้งที่ 1 โรคกุ้งทะเลและการใช้เคมีภัณฑ์. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ชมรมวิทยาศาสตร์การประมง.

ลลิตา เชาวน์เรืองฤทธิ์. 2548. ผลของความเค็มและอุณหภูมิต่อการผลต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดดีเอชเอโดย *Schizochytrium* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2543. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2 ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 255 น.

ศุภชัย ประพัศกร. 2538. แบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio* spp. ต่อยาต้านจุลชีพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 2550. คำแนะนำการปฏิบัติที่ดีสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แบบพัฒนา. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง, กรมประมง.

สุกัญญา กิริรัฐนิคม, จีรพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, อภิญา ส่องประดิษฐ์, นเรศ ช้วนยุค, วีรพงษ์ เทพอักษร และ กิจการ สุขมาตย์. 2543. ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อไวรัสโอเรโอโรส (Vibrio harveyi) ในน้ำทะเล. ว. สงขลานครินทร์ วทท 22 (ฉบับพิเศษ): 697-706.

อกนิษฐ์ ญาณโกมุท, วรวิทย์ วัลลา, วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, นิติ ชูเชิด และ ชลอ ลีมสุวรรณ. 2553ก. ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กับการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ, น. 363-368. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อกนิษฐ์ ญาณโกมุท, วชิรยา ภูริวิโรจน์กุล, นิติ ชูเชิด และ ชลอ ลิมสุวรรณ. 2553ข. ผลของ MERATM Cid ต่อความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*), น. 12-20. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อริสา ศรีหมากสุก. 2555. การเจริญเติบโต การรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเศษเซลล์ยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adams, A. 1991. Response of Penaeid Shrimp to Exposure to *Vibrio* Species. **Fish Shellfish Immunol.** 1: 59-70.

APHA, AWWA and WPCF. 1995. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. American Public Health Association, Washington DC.

Austin, B. and D. Austin. 2007. **Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish**. 4th ed. Springer-Praxis, Germany.

Barclay, W., and S. Zeller. 1996. Nutrition enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in Rotifers and Artemia nauplii by feeding spray-dried Schizochytrium sp. **J. World Aquac. Soc** 27 (3): 314-322.

Belas, M.R. and R.R. Colwell. 1982. Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Bacteriol.** 150: 956-959.

Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Beuchat, L.R. 1974. Combined effect of water activity solute and temperature on growth of *Vibrio parahaemolyticus*. **Appli. Microbiol.** 27: 1075-1081.

- Boone, L. 1931. Anomuran, macruran Crustacea from Panama and Canal Zone. **Bull Am Mus Nat Hist** 63(2): 137-189.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R. Subasinghe and M. Phillips. 2004. **Introductions and Movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific**. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok
- Briggs, M.R.P. and S.J. Funge-Smith. 1994. A nutrient budget of some intensive marine shrimp ponds in Thailand. **Aquaculture** 25: 789-911.
- Brock, J.A. and D.V. Lightner. 1990. Chapter 3: Diseases of Crustacea. *In: O. Kinne (ed.) Diseases of Marine Animal Vol. 3, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg*. Pp. 245-424.
- Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei***. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA.
- Chan, K., M.L. Woo, L.Y. Lenn and G.L. French. 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. **J. Appl. Bacteriol.** 66:57-64.
- Chen, F.R., P.C. Liu and K.K. Lee. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kurama Prawn *Penaeus japonicas*. **Zool Naturforsch.** 55: 94-99.
- Chen, D. and P.L. Hanna. 1992. Attachment of *Vibrio* pathogens to cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J.Fish. Dis.** 15, 331-337.
- Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.

- Chiou, A., L.H. Chen and S.K. Chen. 1991. Foodborne illness in Taiwan, 1981–1989. **Food Australia**. 43: 70–71.
- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics** 54: 442–445.
- Cuzon, G., A. Lawrence., G. Gaxiola., C. Rosas and J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture** 235: 513–551.
- Davis, D.A. 1990. **Dietary Mineral Requirements of *Penaeus vannamei*: Evaluation of the Essentiality for Thirteen Minerals and the Requirements for Calcium, Phosphorus, Copper, Iron, Zinc and Selenium**. Ph.D. Dissertation, Texas A&M University, College Station, TX, USA.
- _____. 2000. Replacement of fishmeal in practical diet for the Pacific white shrimp. **Int. Aqua Feed**, 3: 35–37.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A.V. Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.** 272: 28398–28406.
- De La Pena, L.D., K.T. Tamaki, T.N. Momoyama and K. Muroga. 1993. Characteristic of causative bacterium of vibriosis in kuruma prawn *Penaeus Japonicus* **Aquaculture**. 115: 1–12.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World**. Osprey Books, Huntington, New York.
- Dunlap, P.V. 1999. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. **J Molec Microbiol Biotechnol** 1(1): 5–12.

- Egusa, S. 1992. **Infectious Disease of Fish**. Oxonian press, New Delhi, India.
- Farmer III, J.J., J.M. Janda, F.W. Brenner, D.N. Cameron and K.M. Birkhead. 2005. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411^{AL}, pp. 494-545. In D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, and G.M. Garrity, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**. 2nd ed. Springer, New York.
- Flicker, J. 2002. Fish meal: High protein does not stand for high quality. **Feed Int.** 23: 13-16.
- Frerichs, G.N. and S.D. Millar. 1993. **Manual for the Isolation and Identification of Fish Bacteria Pathogens**. Pisces Press, Stirling.
- Food and Agriculture Organization. 2013a. **Cultured Aquatic Species Information Programme *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)**. Available Source: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en, July 11, 2013.
- _____. 2013b. **Species Fact Sheets *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)**. Available Source: <http://www.fao.org/fishery/species/3404/en>, July 11, 2013.
- Ganuza, E., T. Benítez-Santann, E. Atalah, O. Vega-Orellana, R. Ganga and M.S. Izquierdo. 2008. Crypthecodinium cohnii and Schizochytrium sp. As potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. **Aquaculture**. 277: 109-116.
- Gomez-Gil, B., A. Roque, J.F. Turnbull, V. Inglis and A.L. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 163 (1-2): 1-9.
- Graindorge, V., A.D. V. and T.W. Flegel. 1999. **Diagnosis of Shrimp Disease with Emphasis on the Black Tiger Prawn *Penaeus monodon***. Multimedia Asia.

- Halver, J.E. 1972. **Fish Nutrition**. Academic Press, New York. 712 p.
- Harel, M., W. Koven, I. Lein, Y. Bar, P. Bahrens, J. Stubblefield, Y. Zohar and A.R. Place. 2002. Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. **Aquaculture**. 213: 347-362.
- Henke, J.M. and B.L. Bassler. 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. **J Bacteriol** 186 (12): 3794-3805.
- Holthuis, L.B. 1952. Support for Mr. Francis Hemming's proposal for the correction in the "Official List of Generic Names in Zoology" of the erroneous entry in "Opinion" 104 relating to the name *Penaeus* Fabricius, 1798 (Class Crustacea, Order Decapoda). **Bull Zool Nom** 6: 320.
- _____. 1980. **FAO Species Catalogue Vol.1 - Shrimps and Prawns of the World: An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries**. FAO, Rome.
- Honda, D., T. Yokochi, T. Nakahara, M. Erata and T. Higashihara. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. Nov., a new thraustochytrids from a mangrove area in the west pacific ocean, **Mycol. Res** 102 (4): 439-448.
- Honda, D. 2001. Phylogeny and taxonomy of labyrinthulids. **Aquabiology** 23 (1): 7-17.
- Ishimaru, K., M. Akarawa-Matsushita and K. Muroga. 1995. *Vibrio penaeicida* sp. Nov., apathogen of kuruma shrimps (*Penaeus japonicus*). **Int. J. Syst. Bacteriol.** 43: 8-19.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). **In Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992**. The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.

- Jiang, Y., K. W. Fan, R. T. Y. Wong and F. Chen. 2004. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalgae *Schizochytrium mangrovei*. **J. Agric. Food Chem.** 52: 1196-1200.
- Joseph, S.W., R.R. Colwell and J.B. Kaper. 1983. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. CRC Crit. **Rev. Microbiol.** 10: 77-123.
- Joshi, J., J. Srisala, V.H. Truong, I.T. Chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C.F. Lo, T.W. Flegel, K. Sritunyalucksana and S. Thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Aquaculture** 428-429: 297-301.
- Kamlangdee, N. and K.W. Fan. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 25(5): 643 – 650.
- Kannapiran, E., J. Ravindran, R. Chandrasekar and A. Kalaiarasi. 2009. Studies on luminous, *Vibrio harveyi* associated with shrimp culture system rearing *Penaeus monodon*. **J. Environ. Biol.** 30(5): 791-795.
- Karunasagar, I, M.M. Shivu, S.K. Girisha, G. Krohne and I. Karunasagar. 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. **Aquaculture**. 286: 288-292.
- Kelly, M.T and E.M. Stroh. 1989. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. **J. Clin. Microbiol.** 27: 2820-2822.
- Kendrick, A. and C. Ratledge. 1992. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid. **Lipids**. 27: 15-20.

Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. de la Pena. 1990.

Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines.

Aquaculture 91 (1-2): 1-13.

_____, E.M. Leano and M.G. panar. 1998. **Mortalities of Pondcultured Juvenile Shrimp**

Penaeus monodon Associated with Dominance of Luminescent, *Vibrio harveyi* in the Rearing Environment. SICCPPS book of abstracts, SEAFDEC, Iloilo City, Philippines.

P. 40.

_____, E.M. Leano and M.G. panar. 1998. Mortalities of pond-culture juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent Vibrios in the rearing environment.

Aquaculture. 164: 337-349.

Lemm, C.A. and D.P. Lemarie. 1991. Survival and growth of larval striped bass

(*Morone saxatilis*) fed Artemia enriched with highly unsaturated fatty acid (HUFA).

Aquaculture. 99: 117-126.

Lewis, T., P., Nichola and T. Mcmeekin. 2000. Production of polyunsaturated fatty acid by

Australian Thrauschytrids: aquaculture applications. pp. 43-49. In **Hatchery Feeds:**

Proceedings of Workshop Held in Cairns. Australia.

Lowry, O.H., N.J. Rosebroough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the

folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. 193: 265-275.

Lightner, D.V. 1988. **Disease of cultured penaeid shrimp and prawns, pp. 8-127. In C.S.**

Sinderman and D.V. Lightner (eds) Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, Elsevier, Amsterdam.

_____, and D.V. 1996. **A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for**

Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Lightner, D.V. and D.H. Lewis. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37(5-6): 25-28

_____, and T.A. Bell, R.M. Redman, L.L. Mohny, J.M. Natividad, A. Rukyani and A.

Poernomo. 1992. **A Review of some Major Disease of Economic Significance in Penaeid Shrimps/Shrimps of the Americas and Indo-Pacific.** In: M. Shariff, R. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Proceedings 1st Symposium on Disease in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. Pp. 57-80.

Lim, C., H. Ako, C. L. Brown and K. Hahn. 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. **Aquaculture.** 151: 143-153.

Limsuwan C. 2013. How to prevent early mortality syndrome (EMS) in shrimp farm practical approach. **The Plact. Asian. Aquac.** 4(12)

Magarelli, P.C., B. Hunter, D.V. Lightner and L.B. Colvin. 1979. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. **Comp. Biochem. Physiol.** 63: 103-108.

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

Meighen, E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. **Microbiol Rev.** 55 (1): 123-142.

Miller, M.R., P.D. Nichols and C.G. Carter. 2007. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. **Comp. Biochem. Physiol. A.** 148: 382-392.

- Montilla, R., J. Palomar, M. Santmarti, C. Fuste and M. Vinas. 1994. Isolation and characterization of halophilic *Vibrio* from bivalves bred in nurseries at the Ebro Delta. **J. Invertebr. Pathol.** 63: 178–181.
- Moss, S.T. 1986. The biology of the Thraustochytriales and Labyrinthuloides. In S. T. moss (ed), **The Biology of Marine Fungi**. n.p.
- Naganuma, T., H. Takasugi and H. Kimura. 1998. Abundance of thraustochytrids in coastal plankton. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 162: 105-110.
- Nakahara, T., T. Yokochi, T. Higashihara, S. Tanaka, T. Yaguchi and D. Honda. 1996. Production of decosaheptaenoic acid and decosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. **J. Am. Chem. Soc** 73(11): 1421-1426.
- Nonwachai, T., W. Purivirojkul, C. Limsuwan, N. Chuchird, M. Velasco and A.K. Dhar. 2010. Growth, nonspecific immune characteristics, and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) raised on diets containing algal meal. **Fish Shellfish Immunol.** 29(2):298-304.
- Okuda, J., M. Ishibashi, S.L. Abbott, J.M. Janda, M. Nishibuchi. 1997a. Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1965-1971.
- _____, M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A.K. Mukhopadhyay, S. Garg, S.K. Bhattacharya, G.B. Nair and M. Nishibuchi. 1997b. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. **J. Clin. Microbiol.** 35: 3150–3155.

- Otta, S.K., I. Karunasagar and I. Karunasagar. 1999. Bacterial flora associated with shrimp culture ponds growing *Penaeus monodon* in India. **J.Aqua. Trop.** 14: 309-318.
- Palacios, E., A. Bonilla, A. Pérez, I.S. Racotta and R. Civera. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acid on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 299: 201-215.
- Pass, D.A., R. Dybdahl and M.M. Mannion. 1987. Investigation into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. **Aquaculture.** 65: 149-169.
- Patnaik, S., T.M., Samocha, D.A., Davis, R.A., Bullis and C.L., Browdy. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. **Aquac. Nutr.** 12: 395-401.
- Peter, V.W. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. pp. 125-139. **In Farming Marine Shrimp in Recirculation Freshwater Systems.** Florida Department of Agriculture and Consumer Service.
- Prayitno, S.B. and J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture** 132 (1-2): 105-112.
- Prosser, J.I., K. Killham, L.A. Glover and E.A.S. Rattray. 1996. Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment. **Crit. Rev. in Biotech.** 16 (2): 157-183.
- Puente, M.E., F. Vega Villasante, G. Holguin and Y. Bashan. 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea-water. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 465-471.

Rao, G.R.M. 2000. **Shrimp Diseases: Symptoms, Causes, Diagnosis, Prevention and Control**. Central Institute of Brackishwater Aquaculture, Indian Council of Agricultural Research, Chennai, India.

Ree, J.F., K.Cure., S.Piyatiratitivorakul., P.Sorgeloos and P.Menasveta. 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae:an experimental approach based on *Artemia* enrichment. **Aquaculture**. 122: 193-207.

Robertson, P.A.W., J. Calderon, L. Carrera, J.R. Stark, M. Zherdmant and B. Austin. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. **Dis Aquat Organ** 32 (2): 151-155.

Ruangpan, L. 1995. **Studies on Marine *Vibrio* Isolated from Cultured Shrimp (*Penaeus monodon*) In Thailand**. Ph.D. Thesis. Kagoshima University, Japan.

Ruangpan, L. 1998. Luminous bacteria associated with shrimp mortality. In T.W. Flegel, ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Shinoda, S. and K. Okamoto. 1977. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. **J. Bacteriol.** 129: 1266-1271.

Singh, A and O.P. Ward. 1996. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. **J. Ind. Microbiol.** 16: 370-373.

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

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

- Smith, V.J. and J.R.S Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunol.** 2(1): 1-31.
- Somboon, M., W. Purivirojkul, C. Limsuwan and N. Chuchird. 2012. Effect of *Vibrio* spp. in white feces infected shrimp in Chanthaburi, Thailand. **KU Fish Res Bull** 36 (1): 7-15.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. J. Fish. Dis.* 2: 3-23.
- _____ and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10: 23-28.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. Analysis of covariance, *In Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach*. McGraw-Hill, New York
- Sunaryanto, A. and A. Mariyam. 1986. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. **Bull. Brackish Water Aqua. Devl. Centre.** 8: 64-70.
- Sung, H.H., H.C. Li., F.M. Tsai., Y.Y. Ting and W.L. Chao. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp, **J. Exp. Mar. Bio. Eco.** 236: 261-271.
- Tran, L., L. Nunan., R.M. Redman., L.L. Mohny., C.R. Pantoja., K. Fitzsimmons and D.V. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 105: 45-55
- Twedt, R.H. 1969. Morphological cultural biochemical and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related culture isolated in the United States. **J. Bacteriol.** 98: 511-518.

- Whitman, K.A. 2004. **Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures**. Iowa State Press, Ames, Iowa.
- Wong, H.C., W.R. Shieh and Y.S. Lee. 1993. Toxigenic characterization of vibrios isolated in foods available in Taiwan. **J. Food Prot.** 56: 980–982.
- Yamasaki, T., T. Aki, Y. Mori, T. Yamamoto, M. Shinozaki, S. Kawamoto and K. Ono. 2007. Nutritional of enrichment of larval fish feed with Thraustochytrid producing polyunsaturated fatty acid and xanthophylls. **J. Biosci. Bioeng** 104(3): 200-206.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable protein of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comp. Biochem. Physiol.** 121: 169-176.
- Yongmanitchai, W., W. Chatdumrong, S. Limtong and W. Worawattanamateekul. 2007. Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove in Thailand. **Kasetsart J.** 41: 324-334.
- Yu, J. 1993. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Ocean-Univ.** 23(1): 107-114.
- Zhou, J., W. Fang, X. Yang, S. Zhou, L. Hu, X. Li, X. Qi, H. Su and L. Xie. 2012. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "bacterial white tail disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp. **PLoS One** 7 (2): e29961.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-สกุล	นางสาวนิศารัตน์ เอี่ยมณี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 มิถุนายน 2532
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-