การเจริญเติบโต การรอดตาย และ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus (Beta-Cyclodextrin Cysteamine Hydrochloride)

Growth, Survival and Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Aquanin plus (Beta-Cyclodextrin Cysteamine Hydrochloride)

คำนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้ขยายตัวเพิ่มมาก เพื่อทดแทนปริมาณสัตว์น้ำที่ลดลงในธรรมชาติและความต้องการของผู้บริโภคที่นิยมบริโภคสัตว์น้ำมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ซึ่งผลผลิตโดยรวมส่วนใหญ่ เพื่อการส่งออกยังต่างประเทศ โดยเฉพาะกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ซึ่งกรมประมงอนุญาตให้นำกุ้งขาวแวนนาไม ที่ปลอดเชื้อ Specific Pathogen Free (SPF) เข้ามาทดลองเลี้ยงในประเทศไทยปี พ.ศ. 2545 เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไม มีการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน ทำให้กุ้งมีขนาดสม่ำเสมอ เจริญเติบโตเร็ว สามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูง จึงได้รับความนิยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งขาวชนิดนี้มีอัตราความหนาแน่นสูงมาก ผลที่เกิดตามมาพบว่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยงจะมีการสะสมของเสียที่ในบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้สภาพแวดล้อมภายในบ่อเสื่อมโทรมลง มีผลทำให้กุ้งอ่อนแอ ระดับภูมิคุ้มกันลดลง ระหว่างการเลี้ยงจึงมีปัญหากุ้งป่วยเป็นโรคซึ่งส่วนใหญ่พบได้ทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรคไวรัสดวงขาวหรือโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) เกิดกับกุ้งทะเลทุกชนิด ซึ่งมักระบาดในช่วงที่อุณหภูมิของน้ำต่ำ ในระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม กุ้งป่วยมีลักษณะจุดสีขาวบริเวณใต้เปลือกพบเด่นชัดที่ส่วนหัว เมื่อดึงเปลือกบริเวณส่วนหัวออกมาดู อีกโรคหนึ่งที่พบคือโรคทอร่า (Taura syndrome virus : TSV) กุ้งที่ป่วยมีอาการตัวแดงหรือเห็นเป็นสีชมพูเข้ม ส่วนของตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มองเห็นเป็นสีเหลืองเข้มกว่าปกติ กุ้งในบ่อมีการตายขึ้นอย่างรวดเร็ว มักพบในบ่อที่มีการเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น หลังจากนั้นกุ้งที่รอดตายจะพบเกิดแผลสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำขึ้นตามลำตัว ส่วนโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญและทำความ

เสียหายมากที่สุด ได้แก่ โรคเรืองแสง ซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จะทำให้กุ้งป่วยในบ่อ เกิดการเรืองแสงและขึ้นมาเกยตามขอบบ่อ กุ้งอ่อนแอ และตายในที่สุด (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

จากปัญหาการเกิดโรคดังกล่าวเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งได้มีการใช้ยาเพื่อรักษาโรคที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ซึ่งอาจส่งผลกระทบในเรื่องของยาตกค้าง ถ้าหากมีการใช้อย่างไม่ถูกต้อง ตั้งแต่ พ.ศ. 2547 รัฐบาลได้กำหนดให้เป็นปีของอาหารปลอดภัย ต้องการให้ทุกขั้นตอนในการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงผู้บริโภคปลอดภัยจากสารตกค้าง และป้องกันการกีดกันทางด้านการค้าของประเทศซื้อกุ้งจากประเทศไทย (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) จึงมีการศึกษาค้นคว้าแนวทางในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์น้ำ โดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) ชนิดต่างๆ ได้แก่ วิตามินอี (สุนีย์รัตน์, 2541; Salte *et al*., 1988; Furones *et al*., 1992) วิตามินซี (วาสนา, 2539; นัฏพร, 2541; พชรวดี, 2549) และ เบต้ากลูแคน (พรเลิศ และ คณะ, 2541; ฉัทชนัน, 2549) แทนการใช้ยาและสารเคมี ซึ่งนอกจากจะลดปัญหาการเกิดโรคได้ส่วนหนึ่งแล้วยังจะสามารถลดปัญหาการเกิดยาและสารเคมีตกค้างได้อีกด้วย

Aquanin plus เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบหลักคือ cysteamine hydrochloride และวิตามินอี ซึ่ง cysteamine hydrochloride มีการใช้ประโยชน์เพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง inhibiting growth hormone ซึ่งจัดเป็น peptide hormone ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 14 ชนิด ที่สังเคราะห์ขึ้นในเนื้อเยื่อร่างกายส่งเสริมพัฒนาการ การเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ เสริมทางด้านการดูดซึมของอาหาร การย่อย ช่วยเสริมสร้างอัตราแลกเนื้อของสัตว์น้ำ ในส่วนของวิตามินอีจะป้องกันการออกซิเดชันของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ขัดขวางการผลิตอนุมูลอิสระ (free radical) ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น เนื่องจากวิตามินอีสามารถจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายได้ ทำให้เม็ดเลือดแดงแข็งแรง ทั้งยังช่วยไม่ให้กล้ามเนื้อพัฒนาตัวผิดปกติ ควบคุมการสืบพันธุ์ให้เป็นปกติ (Grant, 1961) ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของสัตว์ (Reddy *et al*., 1987)

ยังไม่มีการทดลองวิจัยผลของ Aquanin plus ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบว่า สาร Aquanin plus มีผลต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมหรือไม่ ซึ่งถ้าผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการได้ผลดี สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในระดับฟาร์มต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของ Aquanin plus ที่ผสมในอาหารในระดับต่างกัน ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ในห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ในระดับต่างกัน

3. เพื่อศึกษาความต้านทานของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ในระดับต่างกัน ต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และ white spot syndrome virus

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

1.1 อนุกรมวิธาน

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 ลักษณะทั่วไป

กุ้งขาวแวนนาไมหรือกุ้งขาวแปซิฟิก มีลักษณะ ผิวมันเกลี้ยงและเรียบ ลำตัวมีสีขาวโปร่ง กรี (rostrum) มีขนาดยาวพอประมาณ โดยในระยะวัยอ่อนจะยาวกว่าก้านหนวด (antennular peduncle) พบว่าเมื่อโตขึ้นกรีจะมีขนาดที่สั้นลงพบมีฟันกรีด้านล่าง (ventral teeth) 2-4 อัน (Pérez Farfante and Kensley, 1997) สันข้างกรีจะมีความยาวไปจนถึงกรีอันสุดท้าย ฟันกรีมีจำนวน 9/2 (ฟันกรีอันบน 9 อัน ส่วนฟันกรีทางด้านล่างมีเพียง 2 อัน) พบว่าหนวดคู่ที่ 1 (antennule) ไม่มี parapenaeid spine, antennular flagella สั้นกว่าส่วน carapace มาก หนวดกุ้งขาวแวนนาไมในระยะวัยรุ่นจะมีสีแดงตลอดเส้น ขาว่ายน้ำมีสีขาวใส (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย (thelycum) มีลักษณะเป็นแบบเปิดตั้งอยู่บริเวณฐานของขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (petasma) สมมาตรกัน มีลักษณะกึ่งเปิดคล้ายรูปตะขอพบบริเวณ endopod ของขาว่ายน้ำ (pleopod) คู่ที่ 1 (ประจวบ, 2525) ส่วนหาง (telson) เรียบ ลักษณะที่พบสังเกตได้เด่นชัดของกุ้งขาว

Litopenaeus vannamei คือ สีของลำตัวเป็นสีขาว กรีด้านบนจะหยักและถี่ปลาย ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และเห็นลำไส้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวอื่นๆ (ภิญโญ, 2545)

1.3 การแพร่กระจาย

กุ้งขาวแวนนาไม เป็นกุ้งพันธุ์พื้นเมืองของชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกบริเวณอเมริกากลางและใต้ เช่น เอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส และโคลัมเบีย เป็นต้น ไปถึงทางตอนเหนือของประเทศเปรู (Rosenberry, 1993) กุ้งขาวอาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่ง บริเวณที่เป็นพื้นโคลนลงไปจนถึงระดับความลึก ประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต (Dore and Frimodt, 1987)

2. ระบบการเพาะเลี้ยง

ระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม แบ่งออกเป็น 3 ระบบ (Arrignon *et al*., 1994) คือ

2.1 Extensive culture คือการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิม ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงมาจากธรรมชาติอัตราการปล่อยจะต่ำ เปลี่ยนถ่ายน้ำน้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ไม่มีการให้อาหารในระหว่างการเลี้ยง โดยลูกกุ้งจะหาอาหารตามธรรมชาติ ไม่มีเครื่องให้อากาศ ผลผลิตจะต่ำ

2.2 Semi-intensive culture คือ การเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนา ลูกกุ้งนำมาจากธรรมชาติหรือโรงเพาะฟักจากพ่อแม่พันธุ์ธรรมชาติ มีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง เปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 - 30 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ให้อาหารที่มีโปรตีน 25-35 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีเครื่องให้อากาศ ผลผลิตระดับปานกลางไม่สูงมากนัก

2.3 Intensive culture คือ การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา มีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงมาจากโรงเพาะฟักและพ่อแม่พันธุ์จากการเลี้ยง ให้อาหารโปรตีนสูง มีการใช้เครื่องให้อากาศและการจัดการในระหว่างการเลี้ยงโดยใช้ความรู้และวิชาการต่างๆเต็มรูปแบบ ให้ผลผลิตสูงมาก

ชลอ และ พรเลิศ (2547) แบ่งการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตามความเค็มของน้ำได้ 2 รูปแบบ คือ

1. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำ ในพื้นที่ภาคกลาง สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีแรก นำน้ำเค็มจากนาเกลือมีความเค็มระหว่าง 100-200 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) มาเติมในน้ำจืด เพื่อให้ได้ความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วเลี้ยงระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะมีการกั้นคอกก่อน เพื่ออนุบาลลูกกุ้ง โดยที่น้ำในคอกจะมีความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้น 3-4 วัน ก็เปิดคอกออกมา วิธีที่สอง จะมีการปรับความเค็มมาแล้วจากโรงเพาะฟักให้ใกล้เคียงกับน้ำในบ่อเลี้ยง เกษตรกรจะเตรียมน้ำให้มีความเค็มประมาณ 3-5 พีพีทีทั้งบ่อแล้วนำลูกกุ้งมาปล่อยโดยตรง โดยที่ไม่มีการกั้นคอก การปล่อยลูกกุ้งโดยตรงในบ่อ ในลักษณะนี้คือ น้ำมีความเค็มเหมาะสมทั้งบ่อทำให้อัตรารอดสูงกว่า การปล่อยในคอกที่น้ำภายในบ่อเป็นน้ำจืด เมื่อกุ้งมีขนาดโตพอที่จะจับขายได้จะใช้อวนตาห่างจับกุ้งที่มีขนาดใหญ่ออกขายก่อน ส่วนกุ้งขนาดเล็กจะลอดตาอวน หลังจากจับกุ้งออกบางส่วนจะมีการเติมน้ำเค็มซึ่งจะทำให้กุ้งที่เหลือมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และจะมีขนาดใหญ่เมื่อถึงเวลาที่จับขายครั้งต่อไป นอกจากนั้นกุ้งขาวแวนนาไมอาจจะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความเค็มต่ำมาก เกือบเป็นน้ำจืด (ภิญโญ, 2545)

2. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มปกติ โดยใช้น้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีทีขึ้นไป ส่วนมากพบบริเวณริมฝั่งทะเลทางภาคตะวันออกและทางภาคใต้ ส่วนมากจะมีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นมากกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ กุ้งมีอัตรารอดสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตดีกว่าน้ำความเค็มต่ำเนื่องจากต้องมีการถ่ายน้ำในปริมาณมาก ในช่วงท้ายของการเลี้ยง

3. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

ธนิษฐา (2543) กล่าวว่า การเจริญเติบโต (growth) เป็นผลต่างระหว่างกระบวนการสร้าง (anabolism) กับกระบวนการสลาย (catabolism) ของร่างกาย โดยที่สัตว์ทุกชนิดมีการเติบโตทั้งทางความยาวและน้ำหนัก โดยที่การเจริญเติบโตแบบไอโซเมตริก (isometric) คือ การเติบโตในทุกส่วนของร่างกายจะมีการเติบโตอย่างเป็นสัดส่วนกันโดยตรง เช่น น้ำหนักตัว (W) จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความยาวยกกำลังสาม (L^3) หรือ พื้นที่ผิวของร่างกาย กรณีการเติบโตเป็นแบบ อัลโลเมตริก (allometric) คือ การเติบโตของร่างกายไม่เป็นสัดส่วนกันโดยตรง ค่ายกกำลังในสมการจะไม่เท่ากับ 3 และ 2 ตามลำดับ การศึกษาการเจริญเติบโตสามารถวัดได้ดังนี้

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

อัตราการเจริญเติบโตแต่ละช่วงอายุ (กรัม / ตัว / วัน) = น้ำหนักกุ้งเฉลี่ยปัจจุบัน - น้ำหนักกุ้งเฉลี่ยครั้งก่อน / ระยะเวลาที่เพิ่มจากการชั่งครั้งก่อน

อัตราการเจริญเติบโตสะสม (กรัม / ตัว / วัน) = น้ำหนักกุ้งเฉลี่ยปัจจุบัน - น้ำหนักกุ้งตอนปล่อย / ระยะเวลาที่เพิ่มจากการชั่งครั้งก่อน

การศึกษาอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)

อัตราแลกเนื้อ = ปริมาณอาหารที่ให้ทั้งหมด (กิโลกรัม) / น้ำหนักกุ้งที่จับได้ทั้งหมด (กิโลกรัม / บ่อ)

การศึกษาอัตราการรอดตาย

อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) = จำนวนกุ้งที่เหลือ × 100 / จำนวนกุ้งที่ปล่อยทั้งหมด (ตัว / บ่อ)

4. คุณภาพน้ำกับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งคือคุณภาพน้ำ เนื่องจากคุณภาพน้ำมีผลต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง เนื่องจากปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม มีการปล่อยลูกกุ้ง ในอัตราความหนาแน่นสูง ทำให้มีการสะสมของเสียที่พื้นบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ คุณภาพน้ำจะเปลี่ยนไปในทางที่ไม่เหมาะสม กุ้งจะกินอาหารลดลง ในที่สุดกุ้งบางส่วนจะอ่อนแอและติดเชื้อป่วยเป็นโรค ทำให้อัตราการรอดตายลดลง (Boyd and Fast, 1992) คุณสมบัติของน้ำที่มีความสำคัญในการเลี้ยงกุ้งได้แก่

4.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen, DO)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีความสำคัญต่อกุ้งในบ่อเลี้ยงเป็นอย่างมาก เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่อยู่ภายในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจ รวมทั้งกระบวนการย่อยสลายของเสียโดยแบคทีเรียก็ต้องใช้ออกซิเจน ทำให้ในช่วงเวลากลางคืนปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ จะลดลงและมีค่าต่ำสุดที่ตอนเช้ามืด แต่หลังจากมีแสงแดดแพลงก์ตอนพืชเริ่มมีการสังเคราะห์แสง ทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น พุทธ (2544) รายงานว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นควรทำการวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในตอนเช้ามืดซึ่งเป็นช่วงที่ปริมาณออกซิเจนต่ำที่สุด น้ำที่มีออกซิเจนมากเพียงพอกุ้งจะเจริญเติบโตดี แต่ถ้ากุ้งอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกุ้งจะอ่อนแอมีโอกาสป่วยเป็นโรคได้ง่าย ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้กุ้งตาย ซึ่งสอดคล้องกับ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) กล่าวว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วงเช้ามืด กุ้งจะเจริญเติบโตดี หากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะไม่แข็งแรง กินอาหารน้อยลง ทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้า และถ้าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ความเค็มและอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ความสามารถของออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง

4.2 ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช (pH)

ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช หมายถึง ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน (H^+) ในน้ำ โดยน้ำที่มีความเป็นกลางจะมีพีเอช 7 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 7 แสดงว่า น้ำอยู่ในสภาพเป็นกรดและถ้าน้ำมีพีเอชมากกว่า 7 แสดงว่าอยู่ในสภาพเป็นด่าง ดังนั้นพีเอชจึงอยู่ระหว่าง 0-14 การวัดพีเอชของน้ำเป็นการวัดปริมาณของไฮโดรเจนอิออน ที่มีอยู่ในน้ำ ซึ่งปกติการแตกตัวของน้ำ จะแตกตัวได้ไฮโดรเจนอิออน (H^+) และ ไฮดรอกซิลอิออน (OH^-) เป็นดังสมการ (นิคม, 2546)

$$H_2O \longrightarrow H^+ + OH^-$$

พีเอชของน้ำมีความความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำตัวอื่นๆ เช่น เมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นความเป็นพิษของแอมโมเนียจะมากขึ้น หากพีเอชมีค่าที่ต่ำลงจะส่งผลให้ความเป็นพิษของไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในบ่อเลี้ยงกุ้งมักจะขึ้นอยู่กับ

ประมาณของแพลงก์ตอนในน้ำเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากแพลงก์ตอนจะมีการใช้และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ให้แก่แหล่งน้ำ ถ้ามีปริมาณแพลงก์ตอนมากจะทำให้เกิดความแตกต่างของค่าพีเอชต่ำสุดและสูงสุดในรอบวันมาก พีเอชของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.5–8.5 กล่าวคือ ค่าพีเอชที่ต่ำสุดในรอบวันไม่ควรต่ำกว่า 7.5 และค่าพีเอชสูงสุดในรอบวันไม่ควรเกิน 8.5 ซึ่งความแตกต่างของพีเอชในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในรอบวันสูงมาก จะเป็นสาเหตุทำให้กุ้งเครียดและอ่อนแอ จากการศึกษาของ Boyd (1982) พบว่าหากพีเอชของน้ำน้อยกว่า 4 หรือมากกว่า 11 กุ้งจะตาย หากพีเอชอยู่ระหว่าง 6 – 9 กุ้งจะมีการเจริญเติบโตดี

4.3 ความเป็นด่าง (alkalinity)

ความเป็นด่าง หมายถึง ความสามารถของน้ำที่จะรับไฮโดรเจนอิออน (H^+) เพื่อที่จะทำให้กรดเป็นกลาง หากพีเอชสูงขึ้นจะทำให้น้ำมีความเป็นด่างมากขึ้น ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญกับอัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งภายในบ่อ โดยค่าที่เหมาะสมของความเป็นด่างอยู่ระหว่าง 80 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ซึ่งสอดคล้องกับ (Boyd, 1989) รายงานว่าความเป็นด่างของน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ในช่วง 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร สารประกอบที่ทำให้เกิดความเป็นด่างมี 3 ชนิด คือ ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) และไฮดรอกไซด์ (OH^-) โดยพีเอชของน้ำเป็นตัวกำหนดชนิดของสารละลายด่างที่อยู่ในน้ำ คือ

น้ำที่มีพีเอชเป็นกลางจนถึง 8.3 จะมี HCO_3^- มาก
น้ำที่มีพีเอชตั้งแต่ 8.3 ขึ้นไปจะเริ่มมี CO_3^{2-}
น้ำที่มีพีเอชระหว่าง 9.5 - 10.5 จะมี CO_3^{2-} มาก
และน้ำที่มีพีเอช 11 หรือมากกว่าจะมี OH^- มาก

น้ำที่มีค่าความเป็นด่างต่ำประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและพีเอชต่ำกว่า 7.5 ลูกกุ้งจะลอกคราบไม่ออกและตายเนื่องจากปริมาณแคลเซียมในน้ำไม่เพียงพอ หากน้ำมีค่าความเป็นด่างที่สูงมากและพีเอชของน้ำตอนเช้าเกิน 8.3 จะพบว่าพีเอชในตอนบ่ายจะสูงขึ้นอีก กุ้งในบ่อจะเป็นตะกรันตามเปลือกและเจริญเติบโตช้ากว่าปกติมากการควบคุมความเป็นด่างให้คงที่นั้นจะใช้วัสดุปูนในกลุ่มคาร์บอเนต ส่วนการเพิ่มความเป็นด่างใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตหรือโซเดียมคาร์บอเนตขึ้นอยู่กับระดับพีเอชของน้ำประกอบกันด้วย (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

4.4 ความกระด้าง (hardness)

ความกระด้างของน้ำเกิดจากแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) และตะกอนของแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ในน้ำ ซึ่งสามารถวัดออกมาเป็นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) อิออนของโลหะวาเลนซีสองเป็นสาเหตุหลักของความกระด้างของน้ำ ความกระด้างที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งไม่ควรต่ำกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร(ศิริเพ็ญ, 2543) ซึ่ง Sawyer and McCarty (1967) สามารถแบ่งความกระด้างของน้ำ โดยถือเอาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต เป็นเกณฑ์คือ

1. น้ำอ่อน 0 – 75 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$
2. น้ำค่อนข้างกระด้าง 75 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$
3. น้ำกระด้าง 150 – 300 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$
4. น้ำกระด้างมาก > 300 มิลลิกรัมต่อลิตรในรูปของ $CaCO_3$

4.5 แอมโมเนีย (ammonia)

แอมโมเนียเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งและสัตว์น้ำอื่น ๆ หากแต่มีประโยชน์กับพวกแพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่ใช้แอมโมเนียเป็นอาหาร แอมโมเนียเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์น้ำ กระบวนการเน่าสลายของเศษอาหารที่เหลือ แพลงก์ตอนที่ตาย เศษซากพืชซากสัตว์และสารอินทรีย์อื่น ๆ โดยจุลินทรีย์ (Boyd, 1982) แอมโมเนียที่พบในน้ำมี 2 รูปแบบ คือ แอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ และแอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำต่ำ ระดับของแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียจะอยู่ในรูปใดขึ้นอยู่กับพีเอชของน้ำ

$$NH_3 + H_2O \underset{\text{พีเอชต่ำ}}{\overset{\text{พีเอชสูง}}{\rightleftharpoons}} NH^+_4 + OH^-$$

โดยเฉพาะเมื่อค่าของพีเอชสูง ปริมาณแอมโมเนียจะสูงขึ้นด้วยจะส่งผลต่อกุ้งคือ กุ้งขับถ่ายแอมโมเนียได้น้อยลงทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียในเลือดและเนื้อเยื่อทำให้การใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อกุ้งสูงขึ้น ส่งผลให้พีเอชของเลือดเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แอมโมเนียจะไปทำลายเหงือกและความสามารถในการขนส่งออกซิเจน ทำให้กุ้งอ่อนแอและเป็น

โรคในที่สุด (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ในทางตรงข้าม ถ้าพีเอชของน้ำลดลง แอมโมเนียจะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมอิออนทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลง

4.6 ไนไตรท์ (nitrite)

ไนไตรท์เป็นสารประกอบที่อยู่ในรูปของไนโตรเจนจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ของแอมโมเนีย ในสภาพที่มีออกซิเจนแบคทีเรียพวกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) จะมีการใช้แอมโมเนียในน้ำเป็นอาหาร โดยจะเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรท ในสภาพที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียจะไม่สามารถทำการเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรทได้สมบูรณ์ทำให้แอมโมเนียเหลือในแหล่งน้ำเป็นอันตรายต่อกุ้งในบ่อ โดยทั่วไปไนไตรท์จะเปลี่ยนเป็นไนเตรทอย่างรวดเร็วจึงไม่สะสมอยู่ในแหล่งน้ำ แต่ในบางสภาวะหากอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียเร็วกว่าการออกซิไดซ์ไนไตรท์ก็จะเกิดการสะสมของไนไตรท์ขึ้นได้ Boyd and Tucker (1998) รายงานว่า ไนไตรท์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำมักจะน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเนื่องจากแอมโมเนียซึ่งเป็นสารตั้งต้นถูกแพลงก์ตอนพืชนำไปใช้ ส่วนไนไตรท์เป็นพิษต่อสัตว์น้ำเช่นเดียวกับแอมโมเนีย โดยไนไตรท์ไปลดประสิทธิภาพในการขนส่งออกซิเจนของเลือดและทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ ความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำและพีเอชลดลง นอกจากนี้ค่าความเป็นพิษของไนไตรท์จะถูกยับยั้งโดยคลอไรด์ในน้ำ ดังนั้นในน้ำทะเลซึ่งมีคลอไรด์สูงความเป็นพิษของสัตว์น้ำจึงค่อนข้างต่ำ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

4.7 ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide)

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ หรือแก๊สไข่เน่า เกิดมาจากของเสียที่สะสมอยู่บริเวณพื้นบ่อเกิดการเน่าสลาย จะพบเห็นบริเวณพื้นบ่อเป็นสีดำและมีกลิ่นเหม็นคล้ายไข่เน่า เกิดจากในสภาวะที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียบางชนิดจะสามารถเปลี่ยนกำมะถันให้อยู่ในรูปของซัลไฟด์ ซึ่งได้แก่ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไฮโดรซัลไฟด์อิออน (HS^-) และไบซัลไฟด์อิออน (S^{2-}) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำตามพีเอชของน้ำ หากพีเอชของน้ำต่ำ ซัลไฟด์จะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ หากพีเอชสูงขึ้นจะมีสัดส่วนของไฮโดรซัลไฟด์อิออนและไบซัลไฟด์อิออนเพิ่มมากขึ้น ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำก็จะลดลงตามไปด้วย ซึ่งระดับสูงสุดของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งคือ 0.033 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

4.8 ความเค็ม (salinity)

ความเค็มหมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของอิออนที่ละลายในน้ำ หรือ ปริมาณเป็นกรัมของเกลืออนินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำทะเล 1 กิโลกรัม มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรหรือส่วนในพันส่วน (part per thousand:ppt) หรือย่อเป็น พีพีที อิออนที่อยู่ในน้ำที่เป็นองค์ประกอบในการก่อให้เกิดความเค็มของน้ำมีอยู่ 7 ชนิด ประกอบด้วยโซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม คลอไรด์ ซัลเฟต และไบคาร์บอเนต ความเค็มมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำมากโดยจะมีผลต่อการควบคุมปริมาณน้ำในร่างกาย และควบคุมปริมาณน้ำเข้าออกจากตัวของสัตว์น้ำ กุ้งขาวแวนนาไมสามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 0-35 พีพีที แต่ถ้าต้องการผลผลิตที่ดีความเค็มของน้ำไม่ควรต่ำกว่า 3 พีพีทีตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ส่วนความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำอยู่ระหว่าง 15-20 พีพีที (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

4.9 การนำไฟฟ้า (electrical conductivity หรือ EC)

คือความสามารถประสิทธิภาพในการนำไฟฟ้าของน้ำหรือของเหลวอื่นซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณอิออน mobility valence และ relative concentration ของน้ำหรือของเหลว การเคลื่อนที่ประจุและอุณหภูมิของน้ำหรือของเหลว ค่าการนำไฟฟ้าที่น้อยกว่า 1 มิลลิซิเมนซ์ต่อเซนติเมตรจะไม่มีความเค็ม ส่วนค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 9 มิลลิซิเมนซ์ต่อเซนติเมตรจะมีความเค็มสูง ค่าความนำไฟฟ้าสัมพันธ์กับปริมาณธาตุชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทะเล อนินทรียสารในน้ำสูง เป็นผลมาจากค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายและปริมาณของแข็งที่ละลาย (dissolved solids) มีปริมาณมาก ปริมาณอนินทรียสารที่ละลายในน้ำลดลง ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายลดลงเช่นกัน (สุธี, 2543; APHA *et al*., 1989)

4.10 ความโปร่งแสง (transparency)

ความโปร่งแสง คือ ค่าที่มองเห็นแผ่นกลม (Secchi disc) ที่หย่อนลงไปในน้ำจนถึงระดับความลึกที่มองไม่เห็นวัตถุดังกล่าว (ศิริเพ็ญ, 2543) หากน้ำมีความขุ่นมากแสงส่องลงได้น้อยจะอ่านค่าความโปร่งแสงได้น้อย ในทางกลับกันแหล่งน้ำที่ขาดความสมบูรณ์ มีอาหารธรรมชาติน้อย จะมีค่าความโปร่งแสงมาก ต้องมีการแก้ปัญหาโดยการเติมปุ๋ยเพื่อทำให้แพลงก์ตอนเจริญมาก

ขึ้น ความโปร่งแสงเป็นค่าที่บ่งบอกสภาพของแหล่งน้ำ ซึ่งค่าความโปร่งแสง 40 – 60 เซนติเมตร เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับบ่อเลี้ยงกุ้ง (Boyd, 1989)

4.11 อุณหภูมิของน้ำ (water temperatre)

อุณหภูมิของน้ำ จะผันแปรสัมพันธ์กับปริมาณแสงอาทิตย์และอุณหภูมิอากาศ ขึ้นกับฤดูกาล ระดับความสูง และสภาพภูมิอากาศ ถ้าปริมาณความเข้มของแสงมากขึ้น อุณหภูมิก็จะสูงขึ้น อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการกินอาหาร และกระบวนการทำงานต่างๆ ในร่างกายของสัตว์น้ำ หากอุณหภูมิเหมาะสม สัตว์น้ำจะกินอาหารและดำรงชีวิตได้ตามปกติ แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าปกติจะทำให้การทำงานของระบบต่างๆ ของสัตว์น้ำลดลงตามไปด้วย (กรมประมง, 2546) ถ้าอุณหภูมิของน้ำต่ำกว่า 28 องศาเซลเซียส กุ้งกินอาหารลดลงและทำให้การเจริญเติบโตลดลง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) กุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็น อุณหภูมิของร่างกายจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิน้ำ และจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไม อยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

5. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง อยู่ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustaceans) ต้องดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ไวรัส และ แบคทีเรีย ดังนั้นกุ้งจึงต้องมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยนอกเหนือจากส่วนเปลือกที่สามารถใช้ป้องกันการบุกรุกเข้าสู่ร่างกายของสิ่งแปลกปลอมและเชื้อก่อโรคต่างๆ ยังต้องมีระบบภูมิคุ้มกันภายในที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำลายสิ่งที่ผ่านเข้าสู่ภายในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ไม่มีกลไกการสร้าง antibody ชนิด Immunoglobulin (Ig) เป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด ดังนั้นกลไกการป้องกันที่เกิดขึ้นในทันที และไม่อาศัยการชักนำทำให้เกิดขึ้น เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของครัสเตเชียนเป็นระบบเปิด ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกาย องค์ประกอบของเลือดกุ้งประกอบด้วย C, N, H, S และ Cu เป็นแร่ธาตุที่สำคัญ เลือดของกุ้งเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากมีแร่ธาตุ Cu เป็นองค์ประกอบ มีอวัยวะในการสร้างเม็ดเลือดเรียกว่า haematopoietic tissue หรือ hemopoietic tissue รงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซในน้ำเลือดของกุ้ง คือ ฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา

เม็ดเลือดของกุ้งจะมีปริมาณลดลงเมื่อกุ้งเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนในปริมาณที่เหมาะสม

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) โดยการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้ คือ

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) กุ้งมีเซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semi-granular cell) และแกรนูลาร์เซลล์ (large granular cell) โดยมีเซลล์จับกินสิ่งแปลกปลอมที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ (fix phagocytes) คือเซลล์ macrophage เช่น กล้ามเนื้อหัวใจ ต่อมน้ำเหลือง และอวัยวะอื่น ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดระบบนี้ประกอบด้วยการทำงานหลายปฏิกิริยา เช่น การแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิดเมลานิน (melanin formation หรือ melanization) และ opsonization ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบที่เรียกว่า prophenoloxidase activating system และเลคติน (lectin) (วัชริยา, 2547)

5.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยเซลล์

เซลล์เม็ดเลือด เป็นเซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน มีการจำแนกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งทะเลออกเป็น 3 ชนิด (Matin and Graves, 1985; Hose *et al*., 1987) โดยอาศัยการมีหรือไม่มีจำนวน การย้อมสีและโครงสร้างของแกรนูลในไซโทพลาซึม

ไฮยาลินเซลล์ (non-granular cells, hyalinocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด ไม่มีแกรนูล รูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์มีขอบเขตไซโทพลาซึมน้อย มีหน้าที่ phagocytosis สิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Soderhall and Smith, 1986)

semi-granular cell มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง hyaline cell และ granular cell มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์กว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร ยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543) ภายในไซโทพลาซึมจะมีแกรนูลขนาดเล็ก ลักษณะเซลล์ไม่แน่นอน มักแตกสลายตัวได้ง่าย นิวเคลียสเล็กตรงกลางเซลล์หรือขอบเซลล์ semi-granular cell ทำหน้าที่รับรู้

และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ในการสร้าง nodule formation และ encapsulation รวมทั้งใน phenoloxidase activating system (Soderhall and Cerenius, 1992)

granular cell หรือ granulocyte เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8-10 ไมโครเมตร กว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร ยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543) รูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสมีขนาดเล็ก รูปร่างโค้งคล้ายไต ภายในไซโทพลาซึมมีแกรนูลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับ semi-granular cell มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการทำงานของระบบ phenoloxidase activating system (Soderhall and Cerenius, 1992)

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย และจะทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เม็ดเลือดจะมีการเพิ่มจำนวนมาทดแทนส่วนที่หมดอายุและตายไปจากเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดซึ่งเรียกว่า hemopoietic tissue ในกุ้งพบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหารและโคนขาเดิน พบอยู่เป็นกลุ่มๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด ซึ่งในน้ำเลือดของกุ้งจะพบรงควัตถุ hemocyanin ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Ratcliffe *et al*., 1985)

5.1.1 กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis)

เป็นกระบวนการที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอม เมื่อสิ่งแปลกปลอมผ่านเข้ามาในร่างกาย โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือด จำพวก granular cell และ macrophages ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยเริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ จากนั้นผิวเซลล์เว้าเข้าไปเกิดเป็น phagosome และจะมีการสัมผัสกับ lysosome เกิดเป็น phagolysosome มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องคือ lysosome ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ที่สามารถลดขนาดของสิ่งแปลกปลอมให้เหลือเป็นหน่วยย่อยๆ และมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) น้ำตาลที่อยู่ในร่างกายซึ่งถูกเก็บสะสมไว้จะมีการรวมตัวกับออกซิเจน เกิดเป็น toxic peroxide (H_2O_2) และ superoxide (O_2^-) การแตกตัวของออกซิเจนสามารถที่จะผลิตออกซิเจนในรูปที่เป็นพิษ สามารถทำลายอนุภาคภายใน phagolysosome ซึ่งหลังจากการทำลายสิ่งแปลกปลอมบางส่วนที่ถูกทำลายจะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ (Klein, 1982)

5.2.1 Nodule formation และ encapsulation

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

Fontaine and Lightner (1975) ศึกษาเกี่ยวกับระบบการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บของกุ้งสกุล *Penaeus* พบว่าเมื่อกุ้งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม โดยมีการทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือเป็นแผลขึ้นปฏิกิริยาแรกที่กุ้งมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ที่เกิดขึ้นคือ มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดไปยังบริเวณที่เกิดบาดเจ็บ ซึ่งจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะเกิดกระบวนการ phagocytosis ขึ้นเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในขั้นตอนแรก จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา encapsulation ซึ่งจะพบว่าเห็นเซลล์เม็ดเลือดบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บ หลังจากนั้นจะมี cellular infiltration และ encapsulation แล้วจะเกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้นและมี collagen like fibers เกิดเป็นแผลถาวรและมีการสร้างรงควัตถุสีดำจากกระบวนการ melanization

5.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยสารน้ำ

5.2.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้น เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการติดเชื้อโรคผ่านทางบาดแผลภายหลังได้รับบาดแผล โดยเม็ดเลือดชนิด granular cell ซึ่งมีแกรนูลอยู่ภายใน สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาเมื่อแกรนูลแตกออก จากนั้นสารเคมีจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้อาจเกิดจากเม็ดเลือดมีปริมาณลดลงเนื่องจากการติดเชื้อ

5.2.2 Phenoloxidase activating system

คือระบบการป้องกันโรคของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน เป็นระบบการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับฟีนอล แล้วทำให้เกิดสารประกอบควิโนน (quinone) และสุดท้ายเกิดเป็นเมลานิน โดยมีเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (proPO) เป็นสารเริ่มต้นของระบบที่พบได้ในแกรนูลที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (Soderhall and Smith, 1986) Sung *et al.* (1996) พบว่าเอนไซม์ proPO ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกรามและกุ้งขาวแวนนาไม ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโทพลาซึมของเม็ดเลือดทั้ง semi-granular cell และ granular cell กิจกรรมของเอนไซม์ในเม็ดเลือดมีค่าสูงกว่าในน้ำเลือด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน inactive prophenoloxidase ไปเป็น active prophenoloxidase ที่ไวต่อปฏิกิริยา ที่จะเปลี่ยนสารกลุ่มฟีนอลจากกรดอะมิโนบางชนิดไปเป็นสารประกอบควิโนน โดยกระบวนการออกซิเดชัน และเปลี่ยนไปเป็นเมลานินในที่สุด โดยเมลานินจะช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีแหล่งกำเนิดมาจากส่วนของ vesical ภายในเซลล์เม็ดเลือด semi-granular cell และ granular cell (Sritunyalucksana *et al.*, 1999) ทวีศักดิ์ (2547) รายงานว่าค่าเอนไซม์ proPO ในกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน มีการเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือนพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งจากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์ proPO สูงที่สุด

Soderhall and Smith (1983) ได้ทำการศึกษาการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียนหลายชนิด โดยใช้สารละลาย percoll 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell มีค่าเอนไซม์ proPO สูงถึง 1,249.51 ± 313.36 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนใน hyaline cell มีค่าเอนไซม์ proPO ค่อนข้างต่ำ 198.95 ± 78.75 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

กิจกรรมของเอนไซม์ proPO สามารถกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้ เมื่อได้รับสารกระตุ้นเช่น β-glucan, peptidoglycan หรือ lipopolysaccharide ซึ่งสารที่ยกตัวอย่างดังกล่าวเป็นสารที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อราหรือแบคทีเรียบางชนิด ส่วนประกอบของผนังเซลล์เหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ proPO ที่เป็น proenzyme ทำให้เปลี่ยนไป proPO โดยมี serine protease เป็นตัวกระตุ้น พรเลิศ และคณะ (2541) ทำการศึกษาโดยใช้สาร β-1,3-glucan ผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำกินติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน จากผลการศึกษาพบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับสาร

β-1,3-glucan ผสมในอาหารในอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนั้น มีปริมาณของเอนไซม์ proPO เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแตกต่างกับกุ้งที่ทำการทดลองในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร β-1,3-glucan

ช่วงระยะเวลาระหว่างการลอกคราบ (intermoult) และระยะก่อนการลอกคราบ (premoult) มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ proPO ด้วย Moullac *et al*. (1998) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ proPO ในพวกครัสเตเซียลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด คุณภาพน้ำก็มีผลเกี่ยวเนื่องด้วยเช่นกัน เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นคุณภาพน้ำมีผลกระทบกับองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกัน

5.2.3 สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

ชัยชาญ (2545) ได้รายงานว่าสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นได้เมื่อได้รับสารกระตุ้น พบได้ในส่วนของซีรัมและส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดที่แตก มีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด และไม่ทนต่อความร้อน

5.2.4 แอกกลูตินิน (agglutinin)

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

6. Aquanin plus

Aquanin plus ถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัทวอลคอม ไบโอเคม(ประเทศไทย) จำกัด (Walcom Bio-chem(Thailand) Co. Ltd) ซึ่งได้มีการผลิตอาหารที่ผสมวิตามินตัวใหม่ ที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อน และมีกรรมวิธีในการผลิตโดยการใส่แคปซูลซึ่งมีการออกแบบมาเพื่อใช้ในการผสมอาหารแก่สัตว์น้ำในระดับอุตสาหกรรม ในศตวรรษที่ 21 นี้ โดยตัวผลิตภัณฑ์ Aquanin plus มีส่วนผสมหลักที่สำคัญคือ cysteamine hydrochloride และ วิตามินอี ซึ่งผลิตภัณฑ์มีหน้าที่ทำให้ต่อมไทรอยด์ ม้าม และ lymphoid tissue พัฒนาดีขึ้น สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำที่มี

กระดูกสันหลัง เช่นปลามีปริมาณของ IgG, IgA และ IgM เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราแลกเนื้อดีขึ้น และปลามีสุขภาพแข็งแรงเพิ่มขึ้น

ลักษณะของ Aquanin plus เป็นเม็ดเล็กๆ อาจมีลักษณะคล้ายผงแป้งปน มีสีเขียวอ่อนทน ความร้อนที่ 180 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำมาผสมอาหารให้กับสัตว์น้ำแล้ว จะไม่เกิดปัญหาเรื่องของสารพิษตกค้าง อัตราการใช้คือ Aquanin plus 400 กรัม ต่อ อาหารกุ้ง 1,000 กิโลกรัม สามารถเก็บตัวผลิตภัณฑ์สภาพที่ยังปิดผนึกไว้ได้นาน 12 เดือน ในที่แห้งและเย็น โดยปราศจากความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Aquanin plus มีส่วนประกอบของ แป้ง, microcrystalline cellulose, cysteamine hydrochloride, sodium alginate และวิตามินอี โดยมีปริมาณ 40.9, 29.0, 27.0, 3.0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีสารสำคัญได้แก่ cysteamine hydrochloride และ วิตามินอี

6.1 สารสำคัญของ Aquanin plus

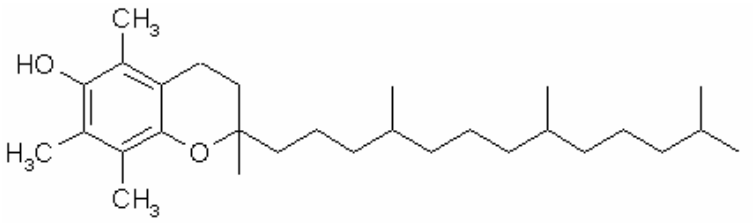
6.6.1 Cysteamine hydrochloride

เป็นสารที่พบมีอยู่ในพืช และร่างกายของสัตว์ และเป็นส่วนประกอบของ co-enzyme A หน้าที่คือ เป็น somatostatin (growth hormone inhibiting hormone) จัดเป็น peptide hormone ประกอบด้วยกรดอะมิโน 14 ชนิด ที่สังเคราะห์ขึ้นในเนื้อเยื่อร่างกายได้แก่ hypothalamus, central nervous system, peripheral nervous system, pancreatic islet cells (D cells), thyroid cell, adrenal medulla, epithelial glandular, gastrointestinal tract เป็นต้น somatostatin ออกฤทธิ์ได้หลายอย่างขึ้นกับตำแหน่งของเซลล์ที่สร้างและหลั่ง somatostatin ออกมา เช่น ใน central nervous system จะออกฤทธิ์เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) และยังมีฤทธิ์เป็น endocrine hormone, paracrine substance อีกด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของ somatostatin จะออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง inhibiting growth hormone, glucagons, insulin, secretin, gastrin และ thyroid stimulating hormone (TSH) สำหรับกลไกในระดับเซลล์ของ somatostatin นั้นยังไม่ชัดเจน แต่ออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนอื่นๆ ทั่วไป คือไปจับกับ receptor บนเซลล์ แล้วมีผลทำให้ลดการสร้าง cyclic adenosine monophosphate ภายในเซลล์ ควบคุมการไหลเข้า-ออกของแคลเซียม และกระตุ้นการไหลเข้าของโพแทสเซียม ภายในเซลล์ (นที, 2550) นอกจากนี้ cysteamine hydrochloride ยังช่วยทำให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น มีการเพิ่มขึ้นของระดับ IgG และ IgA มีการเสริมทางด้านการย่อยและการดูดซึมของอาหาร โดยภาพรวมคือช่วยทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์น้ำดีขึ้น

จากการทดลองใช้ cysteamine hydrochloride ผสมอาหารให้ปลา grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) โดยผสมในอาหารความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุมซึ่งไม่มี cysteamine hydrochloride ผสมอาหาร ชุดการทดลองที่ 2 นำ cysteamine hydrochloride ผสมลงในอาหาร ในอัตราส่วน 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัม และชุดการทดลองที่ 3 นำ cysteamine hydrochloride ผสมลงในอาหาร ในอัตราส่วน 5.0 มิลลิกรัมต่อกรัม เป็นเวลา 10 วัน พบว่า cysteamine hydrochloride ทำให้ปลามี growth hormone ในซีรัมเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ในการทดลองผสม cysteamine hydrochloride กับ LHRH-A ในอัตราส่วน CSH 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัม กับ LHRH-A อัตราส่วน 5 มิลลิกรัมต่อกรัม ผสมให้ปลากิน พบว่ามี growth hormoneในซีรัมเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Xiao and Lin, 2003)

6.2.1 วิตามินอี

วิตามินอี หรือ tocopherol ที่พบในธรรมชาติมี 8 ชนิด คือ alpha, beta, gamma, eta, delta, epsilon, zeta$_1$ และ zeta$_2$ ซึ่งมักอยู่ในรูปของ alpha-tocopherol ซึ่งพบมากที่สุด วิตามินอีมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองที่ละลายในไขมัน เป็นสารป้องกันการออกซิไดซ์ที่ดีมาก (Csallany *et al*., 1977) มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนและกรด วิตามินอีมีหน่วยเป็น IU โดย 1IU เท่ากับ 1 มิลลิกรัม alpha-tocopherol (สุนีย์รัตน์, 2541)



ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ alpha-tocopherol
ที่มา: Csallany *et al*. (1977)

วิตามินอีเป็นสารป้องกันการออกซิไดซ์ ช่วยป้องกันไม่ให้วิตามินชนิดอื่นๆ และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวถูกออกซิไดซ์ ปลาที่ได้รับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวมาก จึงต้องการวิตามินอีมากขึ้นด้วย วิตามินอีป้องกันไม่ให้กล้ามเนื้อพัฒนาตัวผิดปกติ มีความสามารถจับกับอนุมูลอิสระ ที่

เกิดขึ้นภายในร่างกาย ควบคุมการสืบพันธุ์ให้เป็นปกติ (Grant, 1961) ช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานปกติ และช่วยในการฟักไข่ของปลา (ปิยะ, 2528)

การดูดซึมของวิตามินอีจะสัมพันธ์กับการย่อยไขมัน โดยมีน้ำย่อยและน้ำดีจากตับอ่อนเป็นตัวช่วย (Ullrey, 1981) โดยวิตามินอีจะถูกย่อยสลายมากที่บริเวณผนังกระเพาะอาหาร จากนั้นเข้าไปสู่ intestinal lacteals แล้วจะเข้าสู่ระบบหมุนเวียนของระบบน้ำเหลือง (สุนีย์รัตน์, 2541) วิตามินอีจะถูกเก็บกักไว้มากที่สุดที่ตับ และพบทุกส่วนของเนื้อเยื่อไขมัน (Wiss *et al*., 1962) แต่เมื่อเทียบสัดส่วนของวิตามินอี ที่สะสมอยู่ที่ตับต่อร่างกายแล้ว พบว่าเป็นอัตราส่วนที่น้อยมาก ในร่างกายมีปริมาณของวิตามินอีเพียงเล็กน้อยที่จะคงอยู่เป็นเวลานาน เนื่องจากปริมาณของวิตามินอีที่เก็บสะสมไว้จะถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็วโดย polyunsaturated fatty acid (PUFA) ปริมาณที่จะถูกนำไปใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณ PUFA ที่ได้รับเข้ามา วิตามินจะถูกขับถ่ายออกมาพร้อมน้ำดีในรูปของ free form จากการศึกษาพบว่าวิตามินอีและ selenium สามารถลดความเป็นพิษของโลหะหนักได้ 3 ระดับ ระดับที่หนึ่งประกอบด้วยโลหะหนักเช่น แคดเมียม ปรอท ซึ่งวิตามินอีจะสามารลดความเป็นพิษได้น้อยกว่า selenium ระดับที่สองจำพวกสารหนู และ ซิลเวอร์ ระดับที่สามโลหะหนักประเภทตะกั่ว วิตามินอี สามารลดความเป็นพิษได้ดีกว่า selenium (Whanger, 1981) วิตามินอีมีบทบาทยับยั้งการแข็งตัวของเลือด มีผลยับยั้งการทำงานของ platelet เนื่องจากวิตามินอีสร้าง prostaglandin E ซึ่งมีผลยับยั้งการรวมตัวกันของ platelet (Lake *et al*., 1977)

ความสำคัญของวิตามินอีต่อร่างกาย วิตามินอีทำหน้าที่เป็น biological antioxidant มีหน้าที่ป้องกันการ oxidation ของ unsaturated lipid ในเซลล์ จะส่งผลช่วยในการป้องกันการออกซิเดชันของไขมันที่ผนังเซลล์ได้ วิตามินอีทำหน้าที่เป็น chain breaking ทำให้อนุมูลอิสระมีคุณสมบัติเป็นกลาง ป้องกันการออกซิเดชันของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ จะขัดขวางการผลิตอนุมูลอิสระตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ทำให้เม็ดเลือดแดงแข็งแรง ไม่เปราะง่าย เมื่อวิตามินอีไม่เพียงพอจะเกิด hydroperoxidation ซึ่งทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์ ทำลายกล้ามเนื้อ เกิดกระบวนการหืน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Ullrey, 1972) และจากการศึกษาความสำคัญของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกันวิตามินอี มีความสำคัญในการช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของสัตว์เลือดอุ่น (Reddy *et al*., 1987) มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ macrophage ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอม (Wiss *et al*., 1962) อาหารที่เสริมวิตามินอีจะช่วยเพิ่มการทำงานของ T-lymphocyte และ B- lymphocyte ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น (Reddy *et al*., 1987)

จากรายงานของ Alava *et al*. (1993) พบว่าผลจากการใช้วิตามินเอ อีและซี มีผลทำให้รังไข่ของกุ้ง *Penaeus japonicus* พัฒนาดีขึ้น ซึ่งวิตามินอีเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่ทำให้ไข่ของกุ้งมีสุขภาพดี อัตราการฟักตัวและการเจริญเติบโตของลูกกุ้งวัยอ่อนดีขึ้นจากปกติ He *et al*. (1992) ศึกษาความต้องการสารอาหารจำพวกวิตามินของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าวิตามินที่ละลายในไขมัน เช่นวิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค เป็นวิตามินที่จำเป็นที่ต้องเพิ่มลงไปในอาหารให้กับกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อให้กุ้งมีการเจริญเติบโตปกติ มีพัฒนาการและมีการสืบพันธุ์ที่ดีขึ้น สอดคล้องกับ He and Lawrence (1993) ซึ่งทำการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยมีการให้อาหารที่ผสมวิตามินอีแก่กุ้ง พบว่าน้ำหนักของกุ้งเพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้อาหารผสมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อมีการให้วิตามินอีผสมในอาหารเพิ่มจาก 0 ถึง 100 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางด้านการเจริญเติบโตเมื่อให้วิตามินผสมในอาหารปริมาณ 100 ถึง 600 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง จากการทดลองสรุปความต้องการวิตามินอีในอาหารกุ้งเพื่อการเจริญเติบโตพบว่าประมาณ 99 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม

Lee and Shiau (2004) ศึกษาการให้อาหารผสมวิตามินอีซึ่งอยู่ในรูปของ DL-α - tocopheryl acetate, DL - α- TOA ซึ่งเป็นวิตามินอีที่เสถียรผสมลงในอาหารกุ้ง เพื่อศึกษาปริมาณความต้องการวิตามินอีในการเจริญเติบโต ผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และ ความเข้มข้นของวิตามินอีที่สะสมในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ โดยผสมวิตามินอีลงในอาหาร ความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับคือ 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม ในแต่ละความเข้มข้นจะมี 3 ซ้ำ ผลการทดลองนาน 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่มีการให้อาหารผสมวิตามินอี 75 และ 100 มิลลิกรัม มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว และปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) มากกว่ากลุ่มอื่นที่ให้วิตามินอีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม จากการทดลองพบว่า superoxide dismutase (SOD) ในกลุ่มที่ให้วิตามินอีผสมในอาหารความเข้มข้น 50 – 200 มิลลิกรัม มีการเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ให้วิตามินอีในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า และจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของวิตามินอีในกล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อนพบว่ามีการสะสมของวิตามินอีเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นของวิตามินอีที่ผสมลงในอาหาร

Gimenez *et al*. (2004) ศึกษาการเจริญเติบโต การรอดตายและเนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อนของ Argentine red shrimp (*Pleoticus muelleri*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ให้วิตามินอีผสมลงในอาหารกุ้ง ในปริมาณ 0, 100, 600 และ 1500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักของอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม และ butylated hydroxytoluene 16 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักของอาหาร

กุ้ง 1 กิโลกรัม กลุ่มที่ 2 ให้วิตามินอีผสมในอาหารอัตราส่วน 0, 1250, 1500, 1750 และ 2000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักของอาหารกุ้ง 1 กิโลกรัมโดยให้กลุ่มควบคุมกินอาหารกุ้งคลุกน้ำมันปลาหมึกและอาหารที่ไม่ได้ใส่วิตามิน เป็นเวลา 30 วันผลการศึกษาคือกลุ่มที่ 1 ที่ให้อาหารผสม butylated hydroxytoluene มีอัตรารอด 50 เปอร์เซ็นต์ กุ้งที่ให้วิตามินอีผสมในอาหารในอัตราส่วนต่างๆ มีอัตรารอดระหว่าง 43 เปอร์เซ็นต์ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 22 เปอร์เซ็นต์ถึง 31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่ม กลุ่มที่ 2 หลังจากให้อาหารเป็นเวลา 40 วันพบว่าอัตรารอดของกุ้งที่ให้อาหารไม่ผสมวิตามินอีและกุ้งที่ให้อาหารผสมน้ำมันปลาหมึก มีอัตรารอด 62 เปอร์เซ็นต์เท่ากันซึ่งต่ำกว่ากลุ่มที่ให้อาหารผสมวิตามินอีในอัตราส่วนต่างๆ มีอัตรารอดระหว่าง 86 – 90 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักของกุ้งที่เพิ่มขึ้นคือ 34 – 65 เปอร์เซ็นต์ และผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อพบว่า ตับและตับอ่อนของกุ้งที่ให้กินอาหารที่ผสมวิตามินอี 1,750 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม มีลักษณะเป็นปกติ จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าความต้องการวิตามินอีสูงสุดของกุ้ง *Pleoticus muelleri* คือปริมาณวิตามินอี 1,750 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม

Salte *et al*. (1988) รายงานว่า เมื่อทดลองผสมอาหารสำเร็จรูปโดยเสริมวิตามินอีหรือ selenium อย่างใดอย่างหนึ่ง และ ไม่ได้เสริมทั้งวิตามินอีหรือ selenium นำมาเลี้ยงปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) จากนั้นศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมวิตามินอีมีอัตรารอดตายสูงกว่าปลาปลากลุ่มที่ได้รับอาหารผสม selenium และในกลุ่มปลาที่ไม่ได้รับอาหารผสมวิตามินอีหรือ selenium นอกจากนี้ Obach *et al*. (1993) รายงานว่า ได้ทำการทดลองผสมวิตามินอีในอาหารที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัม, 40 มิลลิกรัม และ 300 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในปลา seabass (*Dicentrachus labrax*) เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับปริมาณวิตามินอีที่มีความเข้มข้นสูงคือ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร มีอัตราการแตกของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปลากลุ่มที่ได้รับปริมาณวิตามินอีที่มีความเข้มข้นต่ำคือ 40 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จากนั้นศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio anguillarum* พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมวิตามินอีที่ความเข้มข้นสูงคือ 300 มิลลิกรัม มีการทำงานของระบบ complement สูงกว่า กลุ่มปลาที่ได้รับอาหารผสมวิตามินอีที่มีความเข้มข้นต่ำคือ 40 มิลลิกรัม Furones *et al*. (1992) ได้ทำการศึกษาผลของวิตามินอีต่อความต้านทานโรคปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) โดยใช้วิตามินอีผสมในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 17 มิลลิกรัม, 86 มิลลิกรัม และ 806 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 22 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำแบคทีเรีย *Yersinia ruckeri* มาทดสอบทางด้านความต้านทาน

โรคโดยการแช่และฉีดเข้าช่องท้อง พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับปริมาณวิตามินอีที่มีความเข้มข้นสูงจะมีอัตรารอดตายสูงกว่าปลาที่ได้รับปริมาณวิตามินอีที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า

7. โรคดวงขาวหรือโรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus , WSSV)

7.1 ลักษณะของไวรัส

จิราพรและคณะ (2538) รายงานว่า ไวรัสดวงขาวมีลักษณะเป็นแท่ง (bacilliform morphoogy) มีขนาดความยาวเฉลี่ย 250-280 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 110-112 นาโนเมตร ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย นิวคลีโอแคปสิค (neucleocapsid) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 70 นาโนเมตร มีความยาวเฉลี่ย 200-240 นาโนเมตร ล้อมรอบด้วยส่วนที่หุ้มอนุภาค (envelope) ซึ่งเป็นแบบ trilaminar envelope (จิราพร และ คณะ, 2540) เมื่อนำเนื้อเยื่อไปย้อมสีพิเศษ acridine orange เพื่อแยกชนิด DNA หรือ RNA พบว่ามีนิวเคลียสที่ผิดปกติ เมื่อย้อมติดสีเขียว ซึ่งแสดงว่าเป็น DNA virus สอดคล้องกับ (Mayo, 2002) ที่รายงานไว้ว่า WSSV อยู่ในสกุล Whispovirus วงศ์ Nimaviridae เป็นไวรัส DNA สายคู่ (dsDNA) และจากการรวบรวมข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ของไวรัสดวงขาว ในปัจจุบันมีทั้งหมด 3 isolate ซึ่งได้ข้อมูลจาก ประเทศจีน ประเทศไทย และประเทศไต้หวัน Rameshthangam and Ramasamy (2005) รายงานเกี่ยวกับโปรตีนไวรัสดวงขาว ซึ่งศึกษาจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของกุ้งกุลาดำ 50 ตัวโดย SDS-PAGE ผลการศึกษาพบโปรตีนที่คาดว่าเป็นโปรตีนของไวรัสมีหลากหลาย ขนาดรูปแบบของโปรตีนที่พบในแต่ละเนื้อเยื่อของกุ้งแต่ละตัวไม่เหมือนกัน ซึ่งเกิดจากระดับการติดเชื้อและความจำเพาะภายในของกุ้งแตกต่างกัน แต่มีเพียงโปรตีนขนาด 53 kDa ที่พบในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของกุ้งทุกตัว

7.2 ลักษณะการเกิดโรค

สุเทพ (2546) รายงานว่าโรคดวงขาวในแต่ละประเทศ มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป สำหรับประเทศไทยเรียก โรคตัวแดงดวงขาว เนื่องจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคนี้มีอาการจุดขาวหรือดวงขาวเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อส่วนใต้เปลือก (subcuticular epithelium) และกุ้งที่ป่วยบางครั้งมีลำตัวสีเข้มมากกว่าปกติ หรือมีลำตัวสีแดง จึงตั้งชื่อว่าตัวแดงดวงขาว white spot syndrome virus (WSSV) Vlak *et al*. (2002) รายงานว่าไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคในพวก กุ้ง ปู และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ที่อยู่ในทั้งน้ำเค็ม น้ำจืด และน้ำกร่อย โดยอวัยวะหลักในการติดเชื้อ คือเนื้อเยื่อที่กำเนิดมาจากชั้น ectoderm และ mesoderm เช่น เหงือก อวัยวะต่อมน้ำเหลือง และเยื่อบุผิวชั้นนอก การเพิ่มจำนวนเริ่มต้นในนิวเคลียสและเป็นที่เกิดการประกอบตัวของอนุภาคไวรัส เมื่อออกจากเซลล์โดยทำให้เซลล์แตกออก

ชลอ (2540) กล่าวว่า เชื้อไวรัสดวงขาวจะทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวใต้ปลือก โดยขนาดความกว้างของดวงขาวไม่แน่นอน ซึ่งชลอ และ พรเลิศ (2547) รายงานว่าลักษณะอาการของกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาว เกิดลักษณะจุดขาวหรือดวงขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิเมตรที่บริเวณใต้เปลือก โดยเฉพาะส่วนหัวและข้างลำตัวส่วนหาง ลักษณะของโรคดวงขาวในกุ้งจะเห็นชัดเจนเมื่อดึงเปลือกส่วนหัวให้หลุดออกมา เนื่องจากกุ้งขาวมีลำตัวใสขาว ดังนั้นการสังเกตดูจุดสีขาวจะยากกว่ากุ้งกุลาดำ กุ้งที่เป็นโรคดวงขาวจะกินอาหารลดลง ไม่มีแรงดีดตัว ว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำหรือเกาะตามขอบบ่อ กุ้งป่วยบางส่วนลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบแล้วเปลือกไม่แข็งตัว สอดคล้องกับ สุปราณี (2546) รายงานว่ากุ้งที่เป็นป่วยเป็นโรคจะมีลักษณะดวงสีขาวเกิดขึ้นบริเวณเปลือก โดยดวงที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากความผิดปกติของการสะสมของแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ ดวงสีขาวที่เกิดขึ้นนั้นจะมีขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บริเวณส่วนหัวมักพบมาก จากนั้นพบว่าลำตัวของกุ้งจะมีสีแดง กุ้งไม่ดีดตัว ว่ายน้ำลอยเข้าหาฝั่ง กินอาหารลดลง บางครั้งจะพบว่ากุ้งลอกคราบไม่ออก หรือลอกคราบออกแล้วไม่แข็งตัว จากนั้นจะค่อยๆ ทยอยตายไปเรื่อยๆ ภายในระยะเวลา 3 ถึง 10 วัน ชลอ และ พรเลิศ (2547) กล่าวว่าอัตราการตายของกุ้งหลังจากเกิดโรคนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งเลี้ยงและฤดูกาล อัตราการตายของกุ้งในช่วงที่มีอากาศหนาวหรือฝนตกติดต่อกันนานอาจสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 4-5 วัน ชลอ (2540) กล่าวว่าอาจพบกุ้ง ซึ่งมีอาการคล้ายคลึงกับโรคดวงขาว เช่น อาการจุดขาวที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio* spp.) บริเวณเปลือกชั้นนอก ซึ่งจะพบจุดเล็กๆ ขนาดเท่าหัวเข็มหมุด เกิดจุดพบมีทั้งสีขาว น้ำตาล ถึงดำ ส่วนอาการตัวแดงนั้น อาจมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ไม่รุนแรงจนถึงทำให้ตายอย่างรวดเร็ว แต่กุ้งจะมีอาการป่วยอย่างเรื้อรัง หรือเกิดจากคุณภาพน้ำไม่ดี เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์ ในน้ำมีปริมาณค่อนข้างสูง ในบางกรณีกุ้งมีลักษณะดวงขาวใต้เปลือกบริเวณส่วนหัวคล้ายโรคไวรัสดวงขาว แต่กุ้งจะไม่ตาย พบในบ่อที่น้ำมีพีเอชสูงมากคือ ในตอนเช้ามืดพีเอชของน้ำจะสูงกว่า 8.3 กุ้งเหล่านี้เปลือกจะสาก พบมากในน้ำที่มีความเค็มต่ำ พีเอชสูงมาก และความเป็นด่างของน้ำสูง

7.3 การวินิจฉัยโรคดวงขาว

ชลอ และ พรเลิศ (2547) แนะนำการตรวจวินิจฉัยโรคดวงขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบลักษณะของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น โดยสามารถดูที่ตำแหน่งเนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือกหรือเนื้อเยื่อของเหงือกและที่ส่วนกระเพาะอาหาร พบว่าเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อไวรัสนิวเคลียสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy) โดยจะเริ่มต้นด้วยการเกิด Cowdry type A inclusion ที่ติดสีแดงของ eosin พบว่า ต่อมาจะเกิด inclusion ที่ติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส ซึ่งลักษณะเหล่านี้พบได้บริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก และเนื้อเยื่อในส่วนเหงือกของกุ้งที่มีการติดเชื้อเช่นเดียวกันกับการทดลองของ สุปราณี (2546) ซึ่งพบว่าการนำเหงือกและผิวใต้เปลือกของกุ้งที่ป่วยมาย้อมด้วยhaematoxylin & eosin (H&E) พบ inclusion bodyในนิวเคลียสซึ่งเมื่อย้อมด้วย H & E ติดสีแดงถึงสีน้ำเงิน ไวรัสชนิดนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ เช่น อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เหงือก ท่อทางเดินอาหาร และเซลล์เยื่อบุผนังกระเพาะอาหาร โดยจะพบนิวเคลียสบวมโตมากกว่าปกติ และจากการศึกษาของ Yoganandhan *et al*. (2003) พบว่าอวัยวะส่วนต่างๆ ของกุ้งนั้น ในส่วนของ eyestalk เป็นอวัยวะที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาพยาธิสภาพเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสดวงขาว เพราะจากการทดลองหลังการฉีดเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สามารถตรวจพบเซลล์ในส่วนนิวเคลียสแสดงการบวมโตอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับในอวัยวะอื่นๆ ที่ต้องใช้เวลานานกว่า

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคดวงขาวโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) ทำได้โดยการตรวจเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจะใช้การตรวจแบบ one-step PCR ส่วนการตรวจพ่อแม่พันธุ์และพาหะนั้นใช้การตรวจแบบ two-step PCR Yoganandhan *et al*. (2003) รายงานว่าเมื่อทำการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR พบว่าอวัยวะส่วน eyestalk ของกุ้งที่มีการติดเชื้อเป็นอวัยวะที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้ เนื่องจากเมื่อทำการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสหลังการฉีดเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมงซึ่งมีระยะเวลาสั้นเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ (Yoganandhan *et al*., 2003) นอกจากนั้น Kono *et al*. (2004) รายงานว่ามีการพัฒนาวิธี PCR ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสดวงขาวโดยวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนของ DNA เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่มีอยู่น้อย เพียง 1 พิโคโมลได้ อีกทั้งวิธีนี้ยังมีความรวดเร็ว นั่นคือ การตรวจแบบวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งมีความแตกต่างจากวิธี nested –PCR ที่จะต้องใช้ดีเอ็นเอมากถึง 10 พิโคโมล จึงจะสามารถตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสดวงขาวได้

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสโรคดวงขาวด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้การจับของ probes ที่เป็นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสดวงขาวโดยใช้ fluorescent antibody technique แยกส่วนของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อและมีการติดฉลากด้วย digoxigenin สามารถตรวจเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อได้ Anil *et al*. (2002) รายงานว่าได้มีการนำวิธี Western blot และ ELISA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสดวงขาว โดยการผลิต 18 kDa antiserum ต่อเชื้อไวรัสดวงขาว จากนั้นเมื่อมีการตรวจอวัยวะส่วนต่างๆ ของกุ้ง *Penaeus indicus* ที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณส่วนหัว ส่วนหาง และ ก้านตา (eyestalk) เป็นอวัยวะที่ตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัสในปริมาณที่สูงกว่าบริเวณเนื้อส่วนอื่น Poulos *et al*. (2001) ทำการศึกษาโดยวิธี immunodot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน กุ้ง *P. monodon* ได้ เมื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสดวงขาวโดยได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโปรตีนขนาด 28 kDa และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโปรตีนขนาด 18 kDa แต่จะสามารถตรวจสอบโปรตีนไวรัสได้ตั้งแต่ 500 pg ขึ้นไป

7.4 การป้องกันโรคดวงขาว

ชลอ และ พรเลิศ (2547) รายงานว่าในช่วงระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคม เป็นช่วงที่มีการระบาดของโรคดวงขาว หากมีความต้องการที่จะปล่อยกุ้งในช่วงเวลาดังกล่าว ต้องมีการคัดลูกกุ้งที่มีความแข็งแรง มีคุณภาพจากฟาร์มที่เชื่อถือได้ ต้องมีการตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี PCR ว่าลูกกุ้งไม่ติดเชื้อใดๆ แต่วิธีการป้องกันโรคที่ดีคือ ควรหลีกเลี่ยงการปล่อยลูกกุ้งในช่วงเวลาที่อุณหภูมิของน้ำต่ำหรือช่วงมรสุมทางภาคใต้ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้น ซึ่ง Witteveldt *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาโดยการสร้าง subunitvaccine ที่มีองค์ประกอบของ envelope protein ของอนุภาคไวรัส จากนั้นนำไปให้กุ้งกิน ซึ่งอาหารจะเคลือบด้วย recombinant protein VP19 (r-VP19) เปรียบเทียบกับ r - VP28 ซึ่ง VP28 และ VP19 เป็นโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบในส่วน envelope โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ใช้ทดสอบการ neutralizeไวรัส จากการศึกษาพบว่ากุ้งที่ให้กินอาหารเคลือบ r- VP28 มีอัตราการรอดตาย 61 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งที่กินอาหารเคลือบ r -VP19 ตายหมด ในอนาคตวิธีนี้อาจจะเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคดวงขาวโดยการให้วัคซีนผสมในอาหารให้กุ้งกิน

8. โรคแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*)

8.1 ลักษณะของแบคทีเรีย

Vibrio harveyi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งโค้งหรือตรง มีขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) ไม่สร้าง endospore หรือ microcyst สร้าง lateral flagella บนอาหารแข็งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และหยุดการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายพวกสารไคตินในเปลือกของสัตว์พวกครัสเตเซียน ทำลายเปลือกแล้วเข้าไปทำลายแพร่เชื้อในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคแบบ secondary infection คือ เมื่อร่างกายของสัตว์น้ำเกิดการอ่อนแอลง แบคทีเรียจะเข้าไปทำลายจนก่อให้เกิดการติดโรค แบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลแบบ fermentative และ oxidative ส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์ oxidase ซึ่งก็คือ cytochrome C ที่ถูกออกซิไดซ์แล้ว แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความต้องการโซเดียม อิออน (Na^+) เพื่อใช้กระตุ้นการเจริญเติบโต และ สำหรับอาหารเฉพาะของแบคทีเรียในกลุ่มนี้คือ thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS agar) โซเดียมอิออนจะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Vibrio* เกือบทุกชนิด ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้จึงเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเค็ม sea water agar (SWA) และเจริญได้ดีในสภาพพีเอชเท่ากับ 9 ปฏิกิริยาการเรืองแสงของแบคทีเรียมีการศึกษาใน *V. fischeri* , *V. harveyi* พบว่าการเรืองแสงนั้นเป็นผลมาจากเอนไซม์ luciferase โดยสารตั้งต้นเป็น long chain aldehyde (tetradecanal) ซึ่งสารดังกล่าวมาจากการสังเคราะห์ของกรดไขมัน ระหว่างปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ของ aldehyde และการรีดิวซ์ของ flavin ($FMNH_2$) โดยเอนไซม์ luciferase จะทำให้เกิดการเรืองแสงของแบคทีเรียขึ้น (Prosser *et al*., 1996)

8.2 ลักษณะการเกิดโรค

พรเลิศ และ คณะ (2537) รายงานว่า *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ได้ทั่วไปในน้ำกร่อย พบกุ้งป่วยเป็นโรคนี้ได้ตลอดการเลี้ยง ซึ่งแบคทีเรียจะเข้าทำอันตรายเมื่อกุ้งไม่แข็งแรง เป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) โดยการทำให้ป่วย และตายในที่สุด ถ้ากุ้งแข็งแรงพอก็จะสามารถกำจัดแบคทีเรียนี้ได้หรือกลายเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง อาการเรื้อรังส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อภายใน กุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบบริเวณขอบบ่อ อ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร สีผิดปกติโดยเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีฟ้า ลำตัวสกปรก มีตะกอนตามผิวตัว

ดารุณี และคณะ (2530) รายงานว่าโรคเรืองแสงนี้ส่วนใหญ่เกิดกับลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก ลูกกุ้งแชบ๊วยจะแสดงอาการของโรคเรืองแสงและตายเนื่องจาก *V. harveyi* โดยก่อนตายพบลักษณะเด่นคือ การเรืองแสง มีสารเรืองแสงอยู่ตามซากกุ้ง มองเห็นชัดในที่มืด มีอาหาร ตะกอนติดตามรยางค์ ตัวขาวขุ่น ว่ายน้ำไม่สะดวกและตายในที่สุด ผลจากการทดสอบการติดเชื้อ พบว่าลูกกุ้งระยะ nauplius มีการยอมรับเชื้อ *V. harveyi* ดีที่สุด ขณะที่กุ้งระยะ mysis และ post larvae มีการยอมรับเชื้อน้อยลงตามลำดับ ตั้งแต่ระยะ nauplius ถึงระยะเข้า mysis จะมีอัตราการตาย 70-100 เปอร์เซ็นต์ ลูกกุ้งระยะ postlarvae จะมีความทนทานดีกว่าลูกกุ้งระยะ mysis วรณัฏฐ์ (2545) รายงานว่าเมื่อนำกุ้งป่วยมาแยกเชื้อจากบริเวณตับและตับอ่อนหรือจากน้ำเลือด จะพบเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก กล้ามเนื้อขุ่น เลือดแข็งตัวช้า ชลอ (2534) สังเกตว่าตับและตับอ่อนในกุ้งที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังมีขนาดเล็กลง และ Lavilla -Pitogo *et al.* (1992) รายงานว่ากุ้งมีการติดเชื้อ *V. harveyi* แหล่งที่มีการติดเชื้อสำคัญของแบคทีเรียเรืองแสงจะอยู่ในทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาในน้ำในขณะที่แม่กุ้ง มีการวางไข่ โดยแบคทีเรียจะอยู่บริเวณผิวส่วน chorion ของไข่กุ้งหลังจากวางไข่แล้ว 8 ชั่วโมง

8.3 แนวทางในการป้องกันโรคแบคทีเรียเรืองแสง

สุพล (2542) เสนอแนวทางการฆ่าเชื้อในน้ำเพื่อให้ปลอดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยอาจใช้คลอรีนผงหรือแคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ใส่ลงไปทำลายเชื้อในน้ำด้วยอัตราความเข้มข้น 20-30 ppm โดยที่ความเข้มข้นของคลอรีนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ มีการเปิดเครื่องให้อากาศเพื่อให้คลอรีนผสมกับน้ำอย่างทั่วถึง มีการทดสอบคลอรีนที่เหลือในน้ำโดยการนำน้ำใส่ลงในหลอดแก้ว แล้วหยดสารละลายออโธโทลิดีน 2 - 4 หยดลงไป ซึ่งดูจากสีในหลอด ถ้าพบว่าสีไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีคลอรีนตกค้างอยู่ แต่ถ้าน้ำเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีเหลืองอ่อน แสดงว่ายังคงมีคลอรีนเหลืออยู่ในน้ำ ซึ่งอาจแก้ไขโดยการเติมโซเดียมไธโอซัลเฟตลงไปก่อนที่จะนำน้ำไปใช้ประโยชน์ต่อไป อีกทั้งต้องมีการตากบ่อ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงควรทำความสะอาดบ่อและให้โดนแสงแดดอย่างน้อย 5 วัน หลังจากที่มีการอนุบาลลูกกุ้งมา 2-3 ชุด การอนุบาลลูกกุ้งติดต่อกันโดยไม่มีการตากบ่อ อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหมักหมมของแบคทีเรียเรืองแสงในโรงเพาะฟักได้ และจากการศึกษาของ Karunasagar *et al*. (1996) พบว่า *V. harveyi* สามารถสร้าง biofilm บนผิววัตถุที่ใช้ทดลองได้ และมีความสามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบโดยพบว่า *V. harveyi* มีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะและสามารถอยู่บนผิวคอนกรีตได้มากที่สุด

การควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้สารเคมี นนทวิทย์ (2533) ศึกษาการใช้ povidone iodine (PI) ซึ่งเป็นสารประกอบระหว่าง polyvinylpyrolidone กับ iodine พบว่าในน้ำทะเลที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อมี *V. harveyi* ปริมาณ 10^8 cells/ml สามารถถูกทำลายให้หมดไปโดยใช้ povidone iodine 1 ppm ภายใน 30 นาทีและเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ปริมาณความเข้มข้น 4.5×10^6 cells/ml สามารถถูกทำลายให้หมดไปได้ โดยใช้ความเข้มข้นของ povidone iodine เท่ากับ 2 ppm ซึ่ง povidone iodine จะมีการทำงานไม่เจาะจงกับแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง เป็นผลให้ไม่ประสบปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย สามารถผสมในน้ำทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อเตรียมน้ำก่อนจะนำไปเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่ง สุกิจและคณะ (2531) ศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันและรักษาโรคเรืองแสงในกุ้งระยะโพสลาร์วาหรือที่เรียกว่า กุ้งพี คือใช้ลูกกุ้งระยะพี 2 ถึง พี 7 โดยใช้ออกซีเตตร้าซัยคลิน 2.68 – 5 ppm ควบคู่กับฟอร์มาลิน 10 – 15 ppm โดยแช่ติดต่อกัน 3 วัน จะสามารถหยุดการเรืองแสงได้ และธนาทิพย์ (2537) ศึกษาประสิทธิภาพของยาออกโซลินิก แอซิด ในการรักษาโรควิบริโอซิสในกุ้งกุลาดำ เมื่อมีการฉีดเชื้อ *V. alginolyticus* ให้แก่กุ้งจำนวนกลุ่มละ 25 ตัวพบว่า กุ้งในกลุ่มที่ให้กินอาหารปกติและมีการฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปมีอัตรารอดเฉลี่ย 34.67 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ให้กินอาหารผสมยาออกโซลินิค แอซิดและมีการฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปมีอัตรารอดเฉลี่ย 73.33 เปอร์เซ็นต์

การใช้วิธีทางชีวภาพในการควบคุมปริมาณเชื้อ *Vibrio* จากรายงานของ สุพล (2542) ศึกษาการใช้ *Chlorella* sp., *Chaetoceros* และ *Vibrio* sp. โคโลนีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS เพื่อควบคุม *V. harveyi* ในระบบการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำพบว่า การใช้ *V. alginolyticus* จำนวน 10^3 CFU/ml ซึ่งเป็น *Vibrio* โคโลนีสีเหลืองร่วมกับการใช้น้ำตาลซูโครส 5 ppm มีแนวโน้มในการป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดโรคเรืองแสงในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนได้ จากรายงานของ Kogure *et al*. (1980) พบว่าไดอะตอม (*Sketetonema costatum*) สามารถควบคุมการเจริญของ *Vibrio* และ *Pseudomonas* sp. ได้ และ Lavilla-Pitogo *et al*. (1992) ทำการศึกษาแหล่งของ *V. harveyi* ในโรงเพาะฟักของลูกกุ้งกุลาดำพบว่า *V. harveyi* มาจากเศษขับถ่าย (fecal matter) และจากน้ำในถังที่มีการเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมีย และจากการทดลองทำ plate count ของแบคทีเรียกับไดอะตอม (*C. calcitrans* , *S. costatum*) จะไม่พบ *V. harveyi*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของ Aquanin plus ต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับต่างกัน ในห้องปฏิบัติการ

1. การวางแผนการทดลอง

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

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 11.6 ± 0.5 กรัม จำนวนประมาณ 1,500 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวมาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 3 ถัง ในน้ำความเค็ม 20 - 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น. 13.00 น. และ 19.00 น. มีการติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 4 วัน เมื่อครบ 14 วัน นำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร จำนวน 9 ถัง โดยจะใส่กุ้งจำนวนถังละ 25 ตัว ความเค็มของน้ำในถัง ประมาณ 20-25 พีพีที ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากถังทุก 3 วัน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 4 วัน ควบคุมอุณหภูมิของน้ำไม่ให้ต่ำกว่า 28 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater ใส่ในถังทดลอง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่อุณหภูมิของอากาศต่ำเป็นระยะๆ อาจจะมีผลต่อการกินอาหารของกุ้ง

3. อาหารและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติโดยให้ในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว

ชุดการทดลองที่ 2 คือ ผสม Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 คือ ผสม Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร

การเตรียมอาหารทดลอง ผสม Aquanin plus ในอัตราส่วนที่กำหนด โดยมีการนำไปบดเพื่อให้มีขนาดเล็กลง ผสมกับอาหารสำเร็จรูปปกติ และเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก ผึ่งให้แห้ง การเตรียมอาหารจะมีการเตรียมใหม่ทุกวัน ให้อาหาร 3 เวลาในเวลาประมาณ 08.00 น. 13.00 น. และ 19.00 น. ในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน ปรับอาหารตามน้ำหนักกุ้ง โดยใช้วิธีของ ชลอ และ พรเลิศ (2547) ตลอดระยะเวลาเลี้ยงนาน 60 วัน

4. การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

ระหว่างทำการทดลองมีการเก็บน้ำจากถังทดลองมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความเป็นด่าง ความกระด้าง แอมโมเนีย และไนไตรท์

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สุ่มน้ำหนักกุ้งและบันทึกอัตราการรอดตายของกุ้งในทุกกลุ่มการทดลอง ในวันที่ 20, 40 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองคือวันที่ 60 วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

2. การศึกษาผลของ Aquanin plus ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับต่างๆ กัน โดยทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* และ White spot syndrome virus (WSSV)

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยมี 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กลุ่มของอาหารควบคุม (control) เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ

ชุดการทดลองที่ 2 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 คือ กลุ่มของอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน การทดลองส่วนที่ 1 ใช้สำหรับการศึกษาทางด้านตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับต่างๆกัน ในระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50 วัน และการทดลองในส่วนที่ 2 จะใช้กุ้งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยง รวมระยะเวลาเลี้ยงได้ 60 วันมาทดสอบทำให้ติดเชื้อ *V. harveyi* และ white spot syndrome virus (WSSV) โดยจะทำการศึกษาถึงอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ที่มีการให้อาหารผสม Aquanin plus ในอัตราส่วนที่ต่างกัน

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง การให้อาหาร และการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

การเตรียมกุ้งขาวแวนนาไม การให้อาหาร และการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทุกประการ แต่จะเลี้ยงกุ้งเป็นเวลานาน 50 วัน

3. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว โดยเจาะเลือดจาก ขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) โดยเก็บตัวอย่างกุ้งทุก ๆ 0 , 10 , 20 , 30 , 40 , 50 วัน โดย

ระหว่างที่ทำการทดลองมีการให้อาหารผสม Aquanin plus จากนั้นนำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม (total hemocytes count) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม (bactericidal activity) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activating system) โดยระบบภูมิคุ้มกันที่ทำการศึกษามีดังนี้

3.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (total hemocytes count)

ทำการดูดเลือดกุ้งจากขาเดินคู่ที่ 3 โดยที่ในหลอดฉีดยาจะบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

3.2 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543)

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

2. นำเชื้อที่เป็น colony เดี่ยวมาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอ สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้นๆ) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08 - 0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้

3. เจาะเลือดจากกุ้ง โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกุ้ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

4. นำมาแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดกุ้ง โดยหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มาใช้

5. นำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในระดับ 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยเตรียมหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร 5 หลอด ในหลอดที่ 1 นำซีรัมที่ได้จากข้อ 2 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 1 (เจือจาง 1:2) ในหลอดที่ 2-5 ใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

6. นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2 มาเติมในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำการเจือจางซีรัมแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว โดยเติมแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7. นำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ลดลง โดยต้องทำการเจือจางสารละลายซีรัมและแบคทีเรียก่อน และนำมานับแบคทีเรียโดยวิธี spread plate และจดบันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

3.3 กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้ ตามวิธีของ Itami *et al*. (1994)

1. เก็บเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดฉีดยา ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1.0 มิลลิลิตร (อัตราส่วน เลือดกุ้ง : anticoagulant = 1:2)

2. นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียสนำส่วนใสด้านบนทิ้งไปโดยใช้ dropper ดูดออก ค่อย ๆ ดูด อย่าให้ตะกอนเม็ดเลือดฟุ้งขึ้นมาเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette และค่อยๆ ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้สารละลายเข้ากัน

3. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 5 องศาเซลเซียสเพื่อล้างตะกอน โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

4. ละลายตะกอนใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และค่อยๆ ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้สารละลายเข้ากัน

5. นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตร และสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร ดูใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

6. นำสารละลายเซลล์จำนวน 200 ไมโครลิตร เลี้ยงบน cover slip โดย spread ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 20 นาที

7. ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

8. หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ลงไป ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

9. ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

10. หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

11. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

12. ทิ้งไว้ให้แห้ง 20-60 นาที

13. ผสม Giemsa stain 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

14. ล้างด้วยน้ำกลั่น

15. ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

16. ปิดสไลด์ด้วย permout

นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยทำการสุ่มนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ coverslip ซึ่งในกุ้ง 1 ตัว จะทำการทดลองซ้ำ 3 coverslip แล้วนับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป โดยหาค่าได้จาก

$$\text{ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิด phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

3.4 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activating system)

การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียม Hemocyte Lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการและคณะ (2543)

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 pH 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

2. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm. เป็นเวลา 2 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิ ให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนใสทิ้ง ตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

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

5. นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

6. แยกส่วนใสซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยดัดแปลงจากวิธีการที่รายงานของ Soderhall and Hall (1984)

1. นำ HLS ที่เตรียมได้ 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ ทริปซินใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที

2. จากนั้นเติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L–DOPA 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม ซึ่งใช้ทริปซิน ผสมกับ L - DOPA และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

3. ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกำหนดค่าดังนี้

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

4. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

โดยการนำกุ้งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยง นาน 60 วันมาทำการศึกษา โดยแต่ละกลุ่มจะมีการให้อาหารผสม Aquanin plus ในอัตราส่วนที่ต่างกัน กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารควบคุม (control) ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ กลุ่มการทดลองที่ 2 มีการผสม Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร และกลุ่มการทดลองที่ 3 ผสม Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็น 0.1

เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร จากนั้นเริ่มทำการทดลองโดยนำกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม มาเลี้ยงในตู้กระจก ซึ่งตู้กระจกแต่ละตู้ใช้พลาสติกคลุมเพื่อลดปริมาณแสงและปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 3 วันก่อนทำการทดลอง โดยใช้ตู้กระจกรวมทั้งหมด 9 ตู้ จำแนกได้เป็น กลุ่มการทดลองละ 3 ตู้ แต่ละตู้มีกุ้ง 10 ตัว

จากนั้นทำการทดลองโดยทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง วิธีการเตรียมเชื้อโดยนำเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ประมาณ 0.029 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.4×10^8 CFU/มิลลิลิตร จากนั้นฉีดเชื้อให้กับกุ้งทุกตัว โดยฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับกลุ่มควบคุมซึ่งใส่กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติจำนวน 3 ตู้ ตู้ละ 10 ตัว ฉีดด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เข้าทางกล้ามเนื้อในปริมาณที่เท่ากับกลุ่มที่ฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย คือ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ หลังจากนั้นมีการให้อาหารสำเร็จรูปที่ไม่ผสม Aquanin plus แก่กุ้งในทุกกลุ่มการทดลองหลังจากการฉีดเชื้อมีการจดบันทึกการตายของกุ้งทุกกลุ่มการทดลองเป็นเวลา 7 วัน และเพาะเชื้อจากตับและตับอ่อนของกุ้งที่ป่วยและใกล้ตาย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar และนำไปจำแนกชนิด เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งที่ป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

5. การศึกษาความต้านทานต่อ white spot syndrome virus (WSSV)

นำกุ้งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยงนาน 60 วันมาทำการศึกษา โดยแต่ละกลุ่มจะมีการให้อาหารผสม Aquanin plus ในอัตราส่วนที่ต่างกัน กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารควบคุม เป็นอาหารสำเร็จรูปปกติ กลุ่มการทดลองที่ 2 มีการผสม Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร และกลุ่มการทดลองที่ 3 ผสม Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งคิดเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร จากนั้นเริ่มทำการทดลองโดยนำกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม มาเลี้ยงในตู้กระจก ซึ่งตู้กระจกแต่ละตู้ใช้พลาสติกคลุมเพื่อลดปริมาณแสงและปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกทดลองเป็นเวลา 3 วันก่อนทำการทดลอง โดยใช้ตู้กระจกรวมทั้งหมด 9 ตู้ จำแนกได้เป็น กลุ่มการทดลองละ 3 ตู้ แต่ละตู้มีกุ้ง 10 ตัว

จากนั้นทำให้กุ้งทั้งหมดติดเชื้อโดยนำกุ้งที่ป่วยเป็นโรค WSSV หั่นเป็นชิ้นเล็กๆและนำไปคลุกเคล้าทุกส่วนให้ปนกัน นำชิ้นส่วนของกุ้งที่ป่วยนี้ไปให้กุ้งในทุกกลุ่มทดลองกินเป็นอาหาร โดยให้ในปริมาณ 4 เท่าของปริมาณอาหารสำเร็จรูปเพียง 1 ครั้งเท่านั้น เช่นกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย 20 กรัม จะกินอาหารประมาณ 2.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ดังนั้นในแต่ละตู้ทดลองจะให้อาหาร 17.6 กรัม เพื่อให้เป็นอาหารแก่กุ้งขาวแวนนาไมใน 3 กลุ่มการทดลอง มีการจดบันทึกลักษณะอาการของกุ้ง จำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละช่วงเวลา ทุกกลุ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจะนำกุ้งที่ป่วยบางส่วนไปทำการตรวจยืนยันผลการติดเชื้อ WSSV โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ 1 นำตัวอย่างกุ้งทดลองไปตรวจยืนยันผลด้วยวิธี PCR โดยเก็บตัวอย่างกุ้งทดลอง บริเวณขาเดิน เหงือก และแพนหาง ไว้ใน 95% ethyl alcohol เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR และในส่วนที่ 2 นำตัวอย่างกุ้งทดลองไปตรวจยืนยันผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ โดยเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองมาคงสภาพด้วยน้ำยา Davidson's fixative ซึ่งจะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อน และกล้ามเนื้อด้วยเข็มฉีดยา และแช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative นานประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หลังจากให้อาหารผสม Aquanin plus ในอัตราส่วนต่างๆ จำนวน 3 กลุ่มการทดลองเป็นเวลา 50 วัน แล้วทำการทดลองการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และ WSSV โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 – กุมภาพันธ์ 2551

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การศึกษาผลของ Aquanin plus ที่ผสมอาหารที่ระดับต่างกันต่อการเจริญเติบโตและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ในห้องปฏิบัติการ

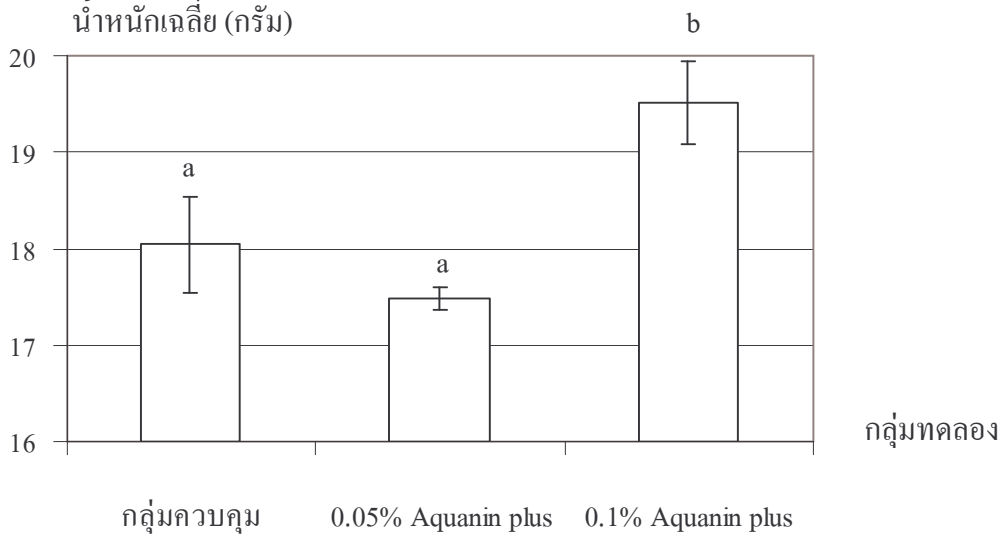
หลังจากให้อาหารผสม Aquanin plus เป็นเวลา 60 วัน แก่กุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 3 กลุ่ม การทดลองคือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารควบคุม คืออาหารสำเร็จรูปปกติ กลุ่มที่ 2 กลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัมซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ผสมลงในอาหาร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการรอดตาย ผลการทดลองน้ำหนักกุ้งตลอดระยะเวลาในการทดลองแสดงไว้ใน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

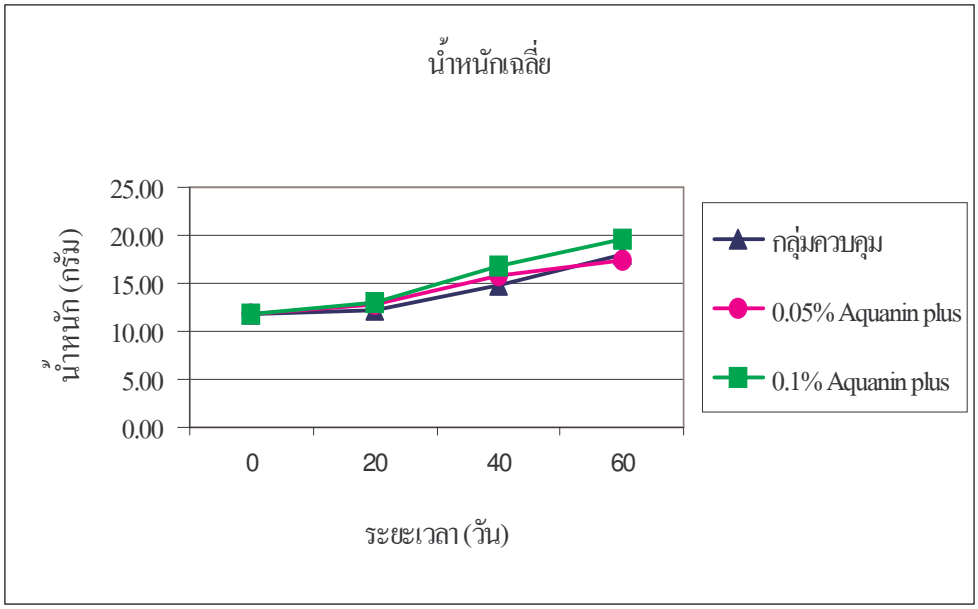
เวลาเลี้ยง(วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		
	กลุ่มควบคุม	0.05% Aquanin plus	0.1% Aquanin plus
0	11.76 ± 0.42^{a}	11.78 ± 0.46^{a}	11.86 ± 0.48^{a}
20	12.28 ± 0.62^{a}	12.73 ± 0.78^{ab}	12.97 ± 0.78^{b}
40	15.40 ± 1.19^{a}	15.84 ± 0.99^{a}	16.76 ± 1.33^{b}
60	18.04 ± 1.93^{a}	17.48 ± 1.89^{a}	19.52 ± 2.26^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

หลังจากเลี้ยง 20 วันพบว่า กุ้งกลุ่มที่ให้ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผสมในอาหาร การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 12.73 ± 0.78 กรัม และ 12.97 ± 0.78 กรัม ตามลำดับ แต่กุ้งกลุ่มที่ให้Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีน้ำหนัก 12.28 ± 0.62 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเลี้ยงครบ 40 วันพบว่า กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุด โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 16.76 ± 1.33 กรัม ซึ่งมากกว่ากลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 15.84 ± 0.99 กรัม และ 15.40 ± 1.19 กรัม ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากการเลี้ยง 60 วัน กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงสุด โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 19.52 ± 2.26 กรัม ซึ่งมากกว่ากลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม พบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 17.48 ± 1.89 กรัม และ 18.04 ± 1.93 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2-4) ทั้งนี้เนื่องจากในระยะเวลา 40-60 วันของการทดลอง กลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมมีจำนวนกุ้งน้อยกว่า ทำให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม 0.05 เปอร์เซ็นต์ที่มีจำนวนกุ้งเหลือรอดมากกว่า ทำให้เมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักของกุ้งใน 2 กลุ่มดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 2 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน



ภาพที่ 3 น้ำหนักของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะ 0, 20, 40 และ 60 วัน

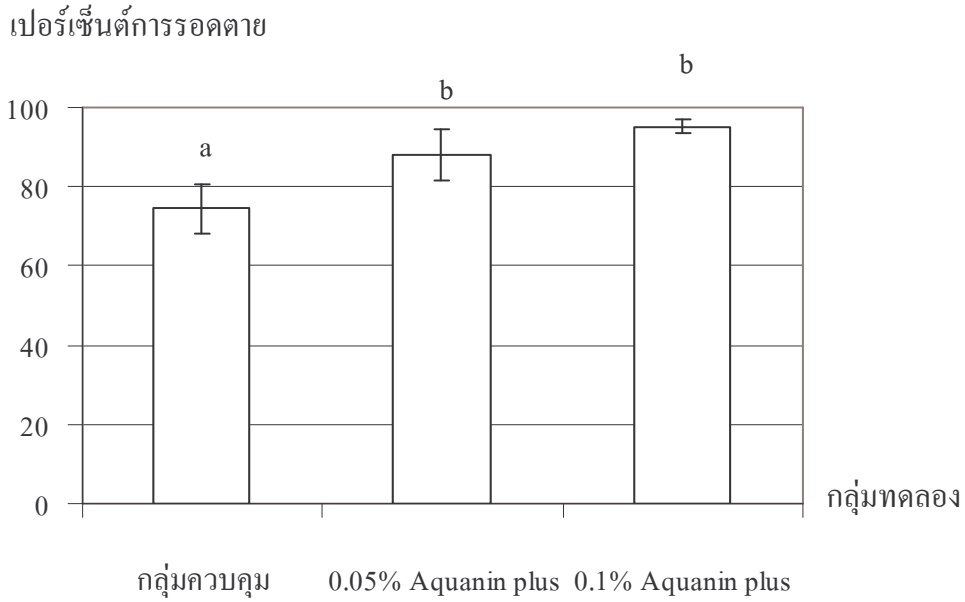
ภาพที่ 4 กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ (A) และ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ (B) เทียบกับกลุ่มควบคุม (C)

หลังจากเลี้ยง 20 วันพบว่า อัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 98.68 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์และ 99.20 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่มีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 93.60 ± 1.35 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเลี้ยง 40 วันพบว่า อัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่า 97.18 ± 1.66 เปอร์เซ็นต์, 97.60 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์ และ 83.20 $\pm$ 0.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากเลี้ยง 60 วัน พบว่า กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงสุด เนื่องจากการได้รับอาหารเสริม Aquanin plus ทำให้เมื่อกุ้งลอกคราบ เปลือกสามารถกลับมาแข็งได้ในระยะเวลาอันสั้น ทำให้กุ้งแข็งแรงและสามารถหลบหลีกการถูกกินจากกุ้งที่แข็งแรงกว่าในถังเดียวกันได้ ซึ่งอัตราการรอดตายของกุ้งที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 88.00 ± 6.32 เปอร์เซ็นต์และ 95.23 ± 1.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่มีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 74.40 ± 6.07 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5-6)

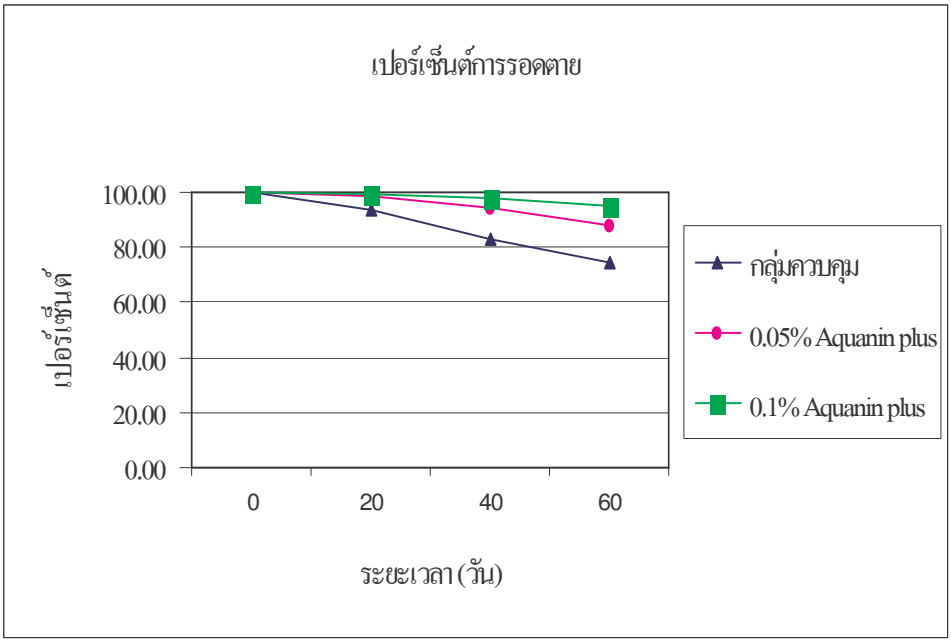
ตารางที่ 2 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

เวลาเลี้ยง(วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)		
	กลุ่มควบคุม	0.05% Aquanin plus	0.1% Aquanin plus
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
20	93.60 ± 1.35^{a}	98.68 ± 0.37^{b}	99.20 ± 0.31^{b}
40	83.20 ± 0.11^{a}	97.18 ± 1.66^{b}	97.60 ± 0.15^{b}
60	74.40 ± 6.07^{a}	88.00 ± 6.32^{b}	95.23 ± 1.79^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ระยะ 0, 20, 40 และ 60 วัน

ผลการศึกษาการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำระหว่างการทดลองระยะเวลา 60 วัน คุณสมบัติของน้ำที่ทำการวิเคราะห์ทุกสัปดาห์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม การนำไฟฟ้า ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ พบว่าคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกกลุ่มการทดลอง อยู่ในระดับที่เหมาะสมในการเลี้ยงสัตว์น้ำ (ตารางที่ 3 และตารางผนวกที่ 1)

คุณสมบัติของน้ำของกลุ่มทดลองเพื่อศึกษาถึงอัตราการเจริญเติบโตของทั้ง 3 กลุ่ม จำแนกเป็นกลุ่ม A คือกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัมซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร กลุ่ม B เป็นกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ผสมลงในอาหาร และกลุ่ม C เป็นกลุ่มควบคุม คือไม่ได้ให้ Aquanin plus ผสมลงในอาหาร พบว่าอุณหภูมิในช่วงเช้าและช่วงบ่ายของกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่มอยู่ระหว่าง 27.4-32 องศาเซลเซียส ซึ่งส่วนใหญ่เกือบตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง อุณหภูมิเหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งคือ 28-30 องศาเซลเซียส (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) เนื่องจากมีการใช้ heater เพื่อป้องกันอุณหภูมิของน้ำที่อาจจะลดลงตามอุณหภูมิของอากาศที่บางช่วงเวลาอยู่ในระดับที่ต่ำมาก แต่ในตอนบ่ายในช่วงเวลาที่อากาศร้อน อุณหภูมิของน้ำในถังทดลองสูงถึง 32 องศาเซลเซียส แต่ยังอยู่ในระดับที่ไม่สูงมากนัก ค่าพีเอชในช่วงเช้าและบ่ายอยู่ระหว่าง 7.8-8.0 ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรอยู่ระหว่าง 7.0-8.5 (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำทั้งในช่วงเช้าและช่วงบ่ายอยู่ระหว่าง 6.94-8.89 ซึ่งระดับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งต้องมีมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากมีการใช้เครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดเวลา ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำอยู่ในระดับที่สูงและเหมาะต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ความเค็มมีค่าอยู่ระหว่าง 22.9-27.4 พีพีที เนื่องจากมีการควบคุมไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก โดยน้ำที่ใช้เปลี่ยนถ่ายมีความเค็มประมาณ 25 พีพีที ค่าการนำไฟฟ้าอยู่ระหว่าง34.43-44.84 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตร ซึ่งจะมีแนวโน้มเช่นเดียวกับความเค็มตลอดเวลา ค่าความเป็นด่างรวมอยู่ระหว่าง 90-138.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ค่าความกระด้างรวมอยู่ระหว่าง 4040.0-5928.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งความกระด้างจะเพิ่มขึ้นตามความเค็ม ในการทดลองครั้งนี้ความเค็มอยู่ในระดับที่สูง ค่าปริมาณแอมโมเนียรวม 0.33-0.87 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณแอมโมเนียรวมที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องมีปริมาณที่น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) เนื่องจากมีการระบายตะกอนและอาหารกุ้งที่เหลือออกบ้างเป็นระยะๆ รวมทั้งมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทำให้ไม่มี

การสะสมของแอมโมเนียเกินระดับที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และค่าไนไตรท์อยู่ระหว่าง 0.01-0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณไนไตรท์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ยงยุทธ และ คณิต, 2537)

ตารางที่ 3 แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับ Aquanin plus ในระดับต่างกัน

คุณสมบัติของน้ำ	กลุ่มการทดลอง					
	A		B		C	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)						
เช้า	27.9-32.0	28.7	27.4-28.9	28.3	28.0-31.4	28.7
บ่าย	27.9-32.0	28.8	27.4-28.9	28.3	28.1-31.5	28.8
พีเอช เช้า	7.8-8.0	7.9	7.6-8.0	7.9	7.6-8.0	7.9
บ่าย	7.8-8.0	7.9	7.6-8.0	7.9	7.6-8.0	7.9
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
เช้า	6.9-8.5	7.6	7.2-8.9	7.8	6.9-8.7	7.8
บ่าย	7.0-8.5	7.6	7.2-8.9	7.8	6.9-8.7	7.8
ความเค็ม (พีพีที)	22.9-27.4	24.7	23.0-25.8	24.4	23.6-25.8	24.7
การนำไฟฟ้า (มิลลิซิเมนต์ต่อเซนติเมตร)	34.4-44.3	40.6	34.4-43.8	40.3	36.6-44.8	41.5
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	94.0-114.7	107.9	92.7-112.7	103.6	90.0-138.7	105.6
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4040.0-5928.0	5139.1	4456.0-5765.3	5085.0	4489.3-5790.7	5118.6
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.3-0.8	0.5	0.4-0.8	0.6	0.3-0.7	0.5
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.01-0.02	0.02	0.01-0.03	0.02	0.01-0.02	0.02

2. การศึกษาผลของ Aquanin plus ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับต่างๆ กัน โดยทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* และ white spot syndrome virus (WSSV)

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับต่างๆ กัน ในระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50 วัน โดยวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ในระหว่างทำการทดลองมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater พีเอช 7.8 – 8.0 และความเค็มของน้ำประมาณ 25 พีพีที

2.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (total hemocytes count)

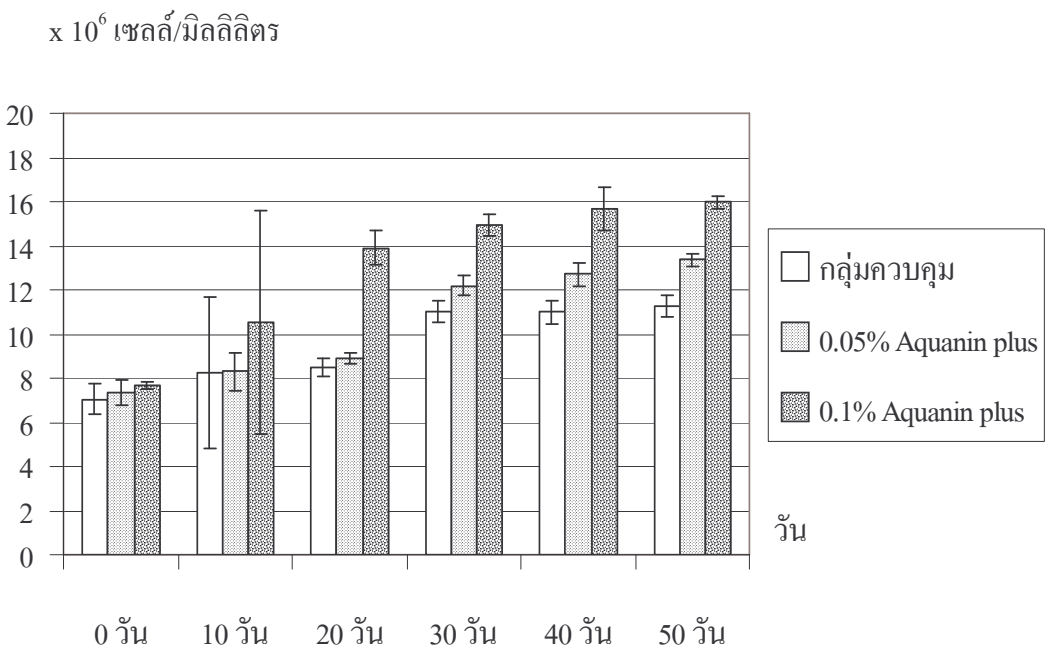
หลังจากให้อาหารผสม Aquanin plus เป็นเวลา 10 วัน แก่กุ้งขาวแวนนาไมพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งเท่ากับ $13.5 \pm 5.06 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $8.30 \pm 0.86 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ $8.28 \pm 3.43 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

เมื่อให้อาหารผสม Aquanin plus เป็นเวลา 20 วัน แก่กุ้งขาวแวนนาไมพบว่ากุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งเท่ากับ $1.39 \pm 0.076 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่ากลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเท่ากับ $8.50 \pm 0.41 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ $8.90 \pm 0.23 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหลังจากระยะเวลา 30 – 50 วันของการให้อาหารพบว่ากลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

THC (x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับสาร Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 วัน	7.05 ± 0.67^{a}	7.33 ± 0.59^{a}	7.65 ± 0.16^{a}
10 วัน	8.28 ± 3.43^{a}	8.30 ± 0.86^{a}	13.50 ± 5.06^{a}
20 วัน	8.50 ± 0.41^{a}	8.90 ± 0.23^{a}	13.90 ± 0.76^{b}
30 วัน	11.00 ± 0.48^{a}	12.20 ± 0.44^{b}	14.95 ± 0.52^{c}
40 วัน	11.00 ± 0.53^{a}	12.70 ± 0.53^{b}	15.65 ± 0.99^{c}
50 วัน	11.25 ± 0.51^{a}	13.38 ± 0.29^{b}	15.98 ± 0.29^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



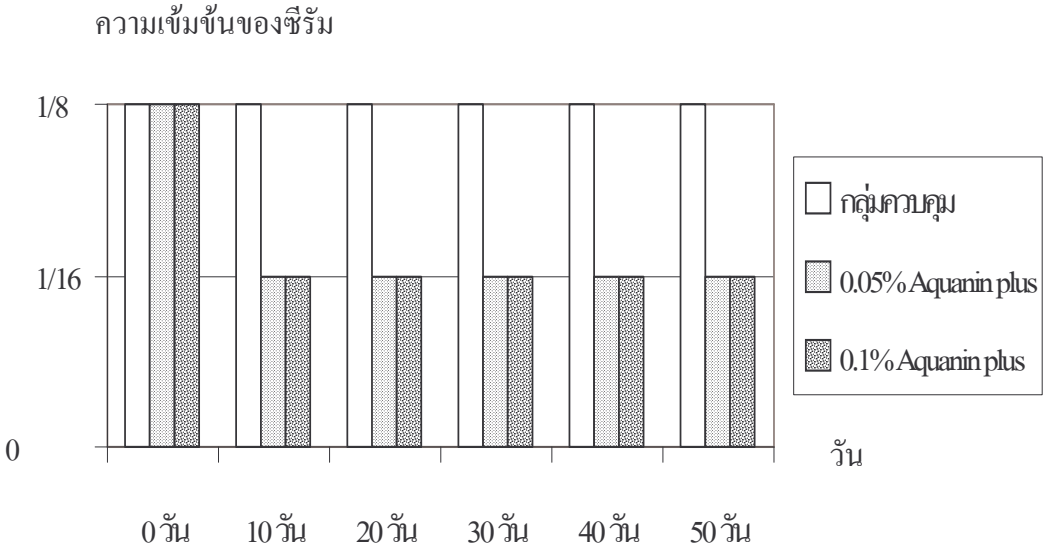
ภาพที่ 7 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

2.2 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง (bactericidal activity)

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงโดยให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากันคือ 1 : 16 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1 : 8 หลังจากทำการทดลองให้ Aquanin plus ผสมในอาหารเป็นระยะครบ 10 วัน จนถึงระยะเวลาที่สิ้นสุดการทดลองรวมระยะเวลา 50 วัน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังได้รับอาหารผสม Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับสาร Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 วัน	1 : 8	1 : 8	1 : 8
10 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
20 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
30 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
40 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16
50 วัน	1 : 8	1 : 16	1 : 16



ภาพที่ 8 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

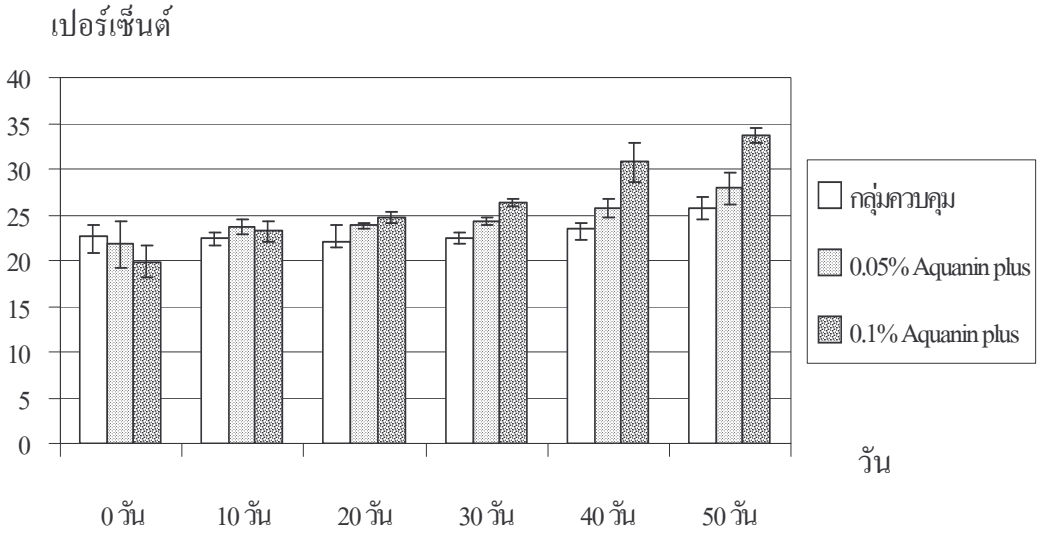
2.3 กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity)

หลังจากการให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus แก่กุ้งขาวแวนนาไม 20 วัน พบว่า กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Aquanin plus มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งมากกว่ากลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งมีค่าเท่ากับ 24.72 ± 0.62, 23.79 ± 0.36 และ 22.72 ± 0.74 ตามลำดับ และหลังจากให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus เป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่ากลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Aquanin plus มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งมากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือมีค่าเท่ากับ 33.61 ± 0.85 ซึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 27.86 ± 1.64 และ 25.75 ± 1.34 ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 6 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

ร้อยละของเม็ดเลือดกุ้งที่เกิด phagocytosis	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับสาร Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 วัน	22.62 ± 0.69^{a}	21.74 ± 2.50^{a}	19.88 ± 1.67^{a}
10 วัน	22.42 ± 1.75^{a}	23.68 ± 0.89^{a}	23.17 ± 1.18^{a}
20 วัน	22.11 ± 0.74^{a}	23.79 ± 0.36^{ab}	24.72 ± 0.62^{b}
30 วัน	22.39 ± 0.57^{a}	24.24 ± 0.41^{b}	26.31 ± 0.45^{c}
40 วัน	23.51 ± 1.20^{a}	25.73 ± 0.95^{ab}	30.73 ± 2.19^{b}
50 วัน	25.75 ± 1.34^{a}	27.86 ± 1.64^{a}	33.61 ± 0.85^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 9 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

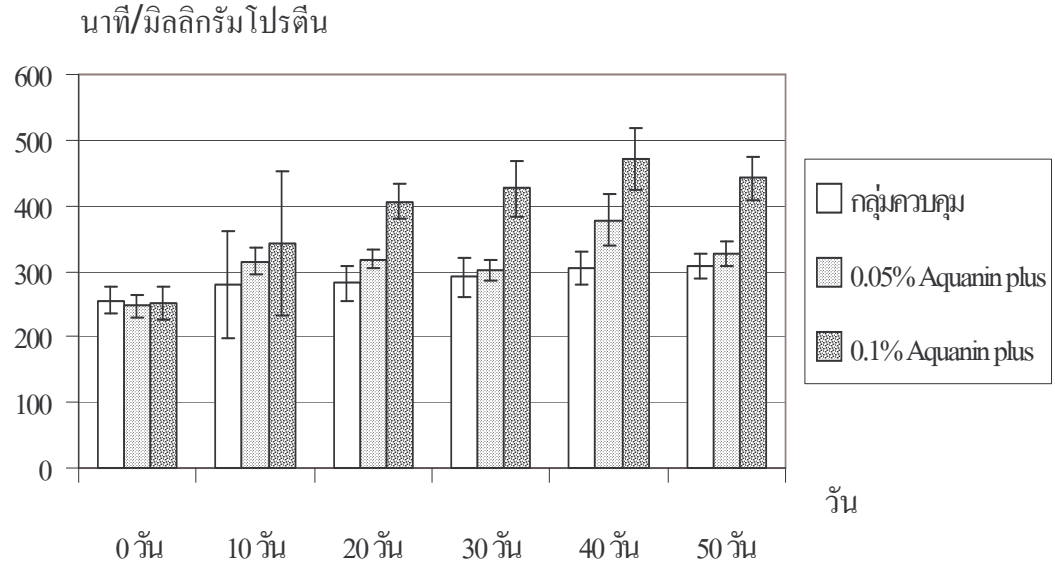
2.4 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activating system)

หลังจากทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม 10 วันโดยให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Aquanin plus เมื่อนำเลือดจากกุ้งมาตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส พบว่ามีค่าเท่ากับ 342.82 ± 109.17 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งมีค่ามากกว่ากลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 315.11 ± 19.90 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน และ 279.27 ± 81.25 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเมื่อให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ครบ 50 วัน พบว่า กลุ่มที่ให้ Aquanin plus ผสมลงในอาหาร 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 441.98 ± 32.63 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 326.65 ± 19.98 หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน และ 307.08 ± 18.92 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 10)

ตารางที่ 7 ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

Phenoloxidase activity หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับสาร Aquanin plus	
		0.05%	0.1%
0 วัน	255.84 ± 20.53 [a]	246.8 ± 17.20 [a]	251.74 ± 26.18 [a]
10 วัน	279.27 ± 81.25 [a]	315.11 ± 19.90 [a]	342.82 ± 109.17 [b]
20 วัน	282.03 ± 26.91 [a]	318.73 ± 14.61 [a]	406.67 ± 26.53 [b]
30 วัน	290.95 ± 28.83 [a]	301.42 ± 14.41 [ab]	426.37 ± 43.18 [b]
40 วัน	303.85 ± 25.37 [a]	377.93 ± 39.86 [ab]	471.47 ± 46.82 [b]
50 วัน	307.08 ± 18.92 [a]	326.65 ± 19.98 [a]	441.98 ± 32.63 [b]

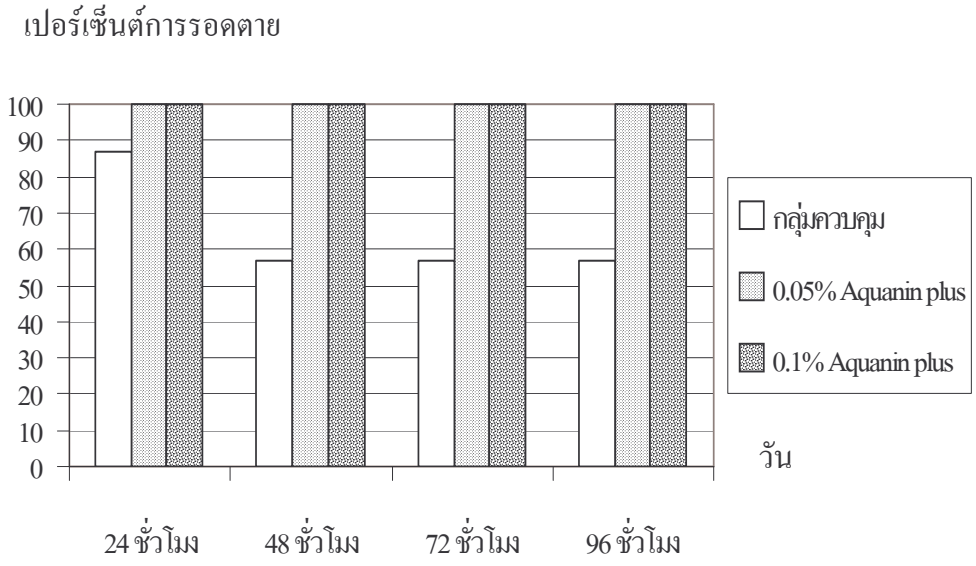
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 10 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 วัน

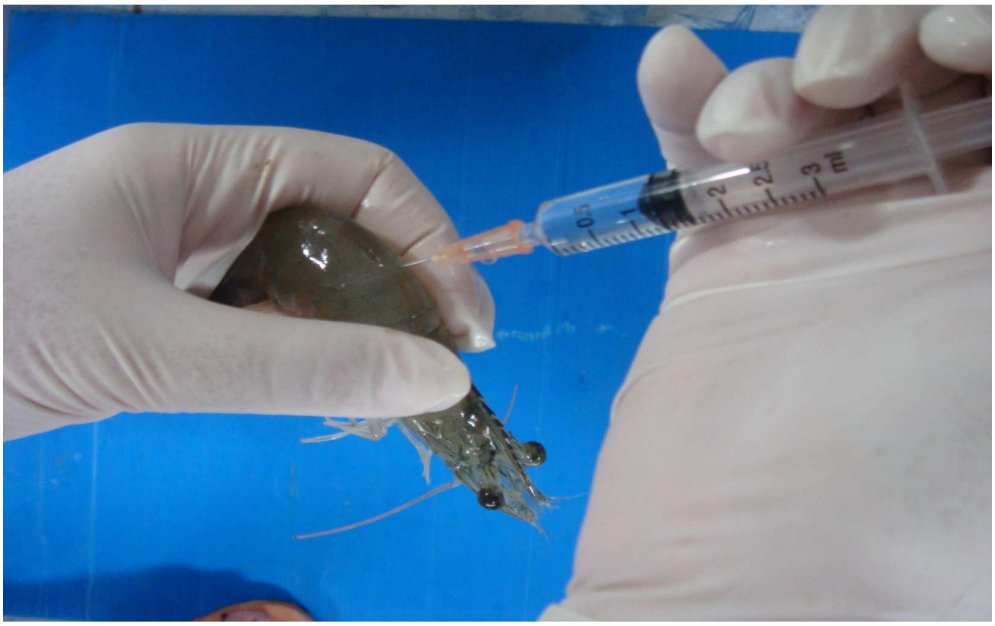
2.5 การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

หลังจากการให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus แก่กุ้งขาวแวนนาไมในความเข้มข้นที่ต่างกัน คือ กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 60 วัน จากนั้นทำให้กุ้งทั้งหมดติดเชื้อโดยฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมงซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.4×10^8 CFU/มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปผสม 0.05 เปอร์เซ็นต์ Aquanin plus และกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ กุ้งมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการรอดตาย 56.67 เปอร์เซ็นต์ภายใน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

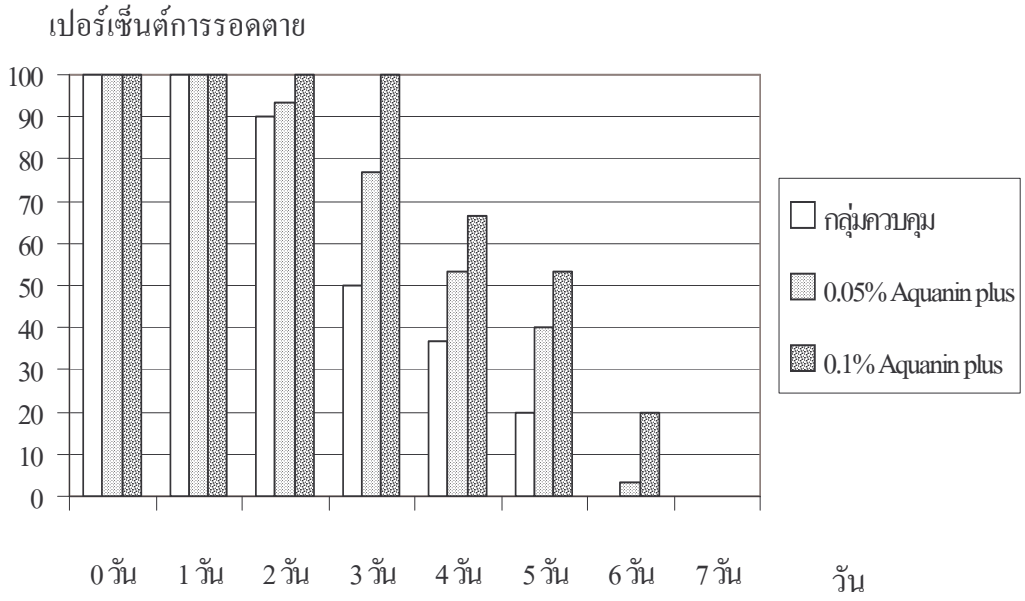
จากการทดลอง พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ทำให้เกิดการติดโรคโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ปริมาณ 7.4×10^8 CFU/ มิลลิลิตร (ค่า LD_{50} ที่ 96 ชั่วโมง) เข้าไปบริเวณกล้ามเนื้อของลำตัว (ภาพที่ 12) หากสังเกตภายนอกของกุ้งที่ป่วยจะมีสีผิดปกติไปจากเดิมโดยมีสีที่เข้มขึ้น ลำตัวของกุ้งสกปรก มีตะกอนบริเวณขาว่ายน้ำและตามผิวตัว กุ้งที่ป่วยและตายสามารถมองเห็นการเรืองแสงของกุ้งในตอนกลางคืน ซึ่งพบในกุ้งกลุ่มควบคุม ถ้ากุ้งแข็งแรง มีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี ก็จะสามารถกำจัดแบคทีเรียนี้ได้ โดยกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และที่ได้รับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หลังฉีดเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มควบคุม เมื่อฉีดเชื้อ *V. harveyi* หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่ากุ้งมีอัตรารอด 86.67 เปอร์เซ็นต์และที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีอัตรารอด 56.67 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 12 การฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว

2.6 การศึกษาความต้านทานต่อ white spot syndrome virus (WSSV)

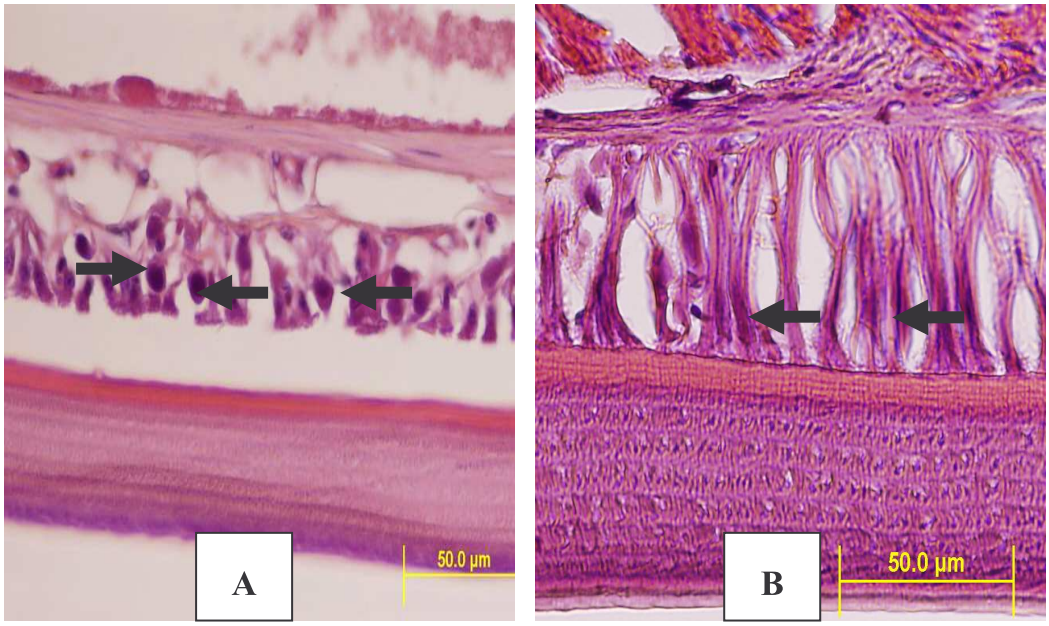
หลังจากการให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus แก่กุ้งขาวแวนนาไมในระดับที่ต่างกัน คือ กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 60 วัน จากนั้นทำให้กุ้งทั้งหมดติดเชื้อ WSSV โดยการให้อาหารเป็นเนื้อกุ้งที่ป่วยเป็นโรค WSSV ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 4 วัน แต่กุ้งทั้งหมดตายในเวลา 6 วัน ส่วนกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 5 วัน แต่กุ้งจะตายหมด 100 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 7 วัน ซึ่งมีระยะเวลารอดชีวิตยาวนานกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีกุ้งตายครึ่งหนึ่ง หรือมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 3 วัน แต่เมื่อระยะเวลา 7 วัน กุ้งขาวแวนนาไมในทุกกลุ่มการทดลองตายทั้งหมด (ภาพที่ 13)



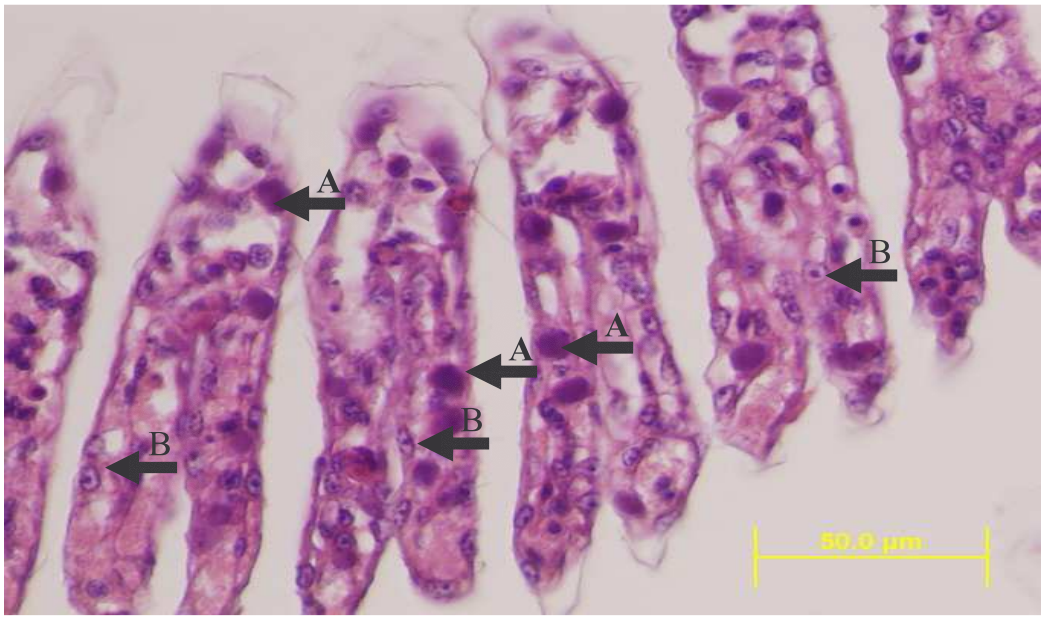
ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสาร Aquanin plus ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน หลังจากทำให้ติดเชื้อ WSSV

จากการทดลองพบว่า ลักษณะภายนอกของกุ้งขาวแวนนาไมที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV มีสีชมพูหรือส้ม ลักษณะคล้ายกุ้งเครียด และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ จะมีลักษณะของสีที่เข้มขึ้น แตกต่างจากสีของกุ้งปกติ (ภาพที่ 14) จากการทดลองในครั้งนี้ไม่พบอาการจุดขาวบริเวณใต้เปลือกของกุ้งป่วย ดังเช่นที่มีรายงานจาก ชลอ และ พรเลิศ (2547) แต่จากการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อ WSSV พบว่า เซลล์ที่อยู่ในชั้นเนื้อเยื่อบริเวณผิวใต้เปลือกของกุ้งและเหงือก มีนิวเคลียสบวมโตขึ้น (nuclear hypertrophy) และ เกิดอินคลูชั่นขึ้นในนิวเคลียส (Cowdry A - type intranuclear inclusions) (ภาพที่ 15 และ 16) ซึ่งในระยะต่อมาจะทำให้เกิดการตายของเซลล์เนื้อเยื่อในอวัยวะต่างๆ (multifocal necrosis) ซึ่งจะเห็นได้จากการพบช่องว่างภายในเซลล์ (transparent zone) รอบๆ ส่วนที่เป็นอินคลูชั่น (inclusion) ในนิวเคลียส

ภาพที่ 14 กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV (A) เปรียบเทียบกับกุ้งปกติ (B)



ภาพที่ 15 เนื้อเยื่อบริเวณผิวใต้เปลือกของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อ WSSV บริเวณที่ลูกศรชี้เกิด inclusions ในเซลล์ ทำให้นิวเคลียสบวมโต (A) เทียบกับกุ้งปกติ (B)
(H&E, bar = 50 µm)



ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ติดเชื้อ WSSV บริเวณที่ลูกศรชี้เกิด inclusions ในเซลล์ ทำให้นิวเคลียสบวมโต (A) เทียบกับเซลล์เหงือกปกติ (B) (H&E, bar = 50 µm)

สำหรับคุณสมบัติของน้ำระหว่างทำการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แสดงไว้ใน (ตารางที่ 8 และตารางผนวกที่ 2)

คุณสมบัติของน้ำในกลุ่มทดลอง ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของทั้ง 3 กลุ่ม จำแนกเป็นกลุ่ม A คือกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัมซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมลงในอาหาร กลุ่ม B เป็นกลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ผสมลงในอาหาร และ กลุ่ม C เป็นกลุ่มควบคุม คือไม่ได้ให้ Aquanin plus ผสมลงในอาหาร พบว่าอุณหภูมิในช่วงเช้าและช่วงบ่ายของกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่มอยู่ระหว่าง 27.3-28.9 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งคือ 28-30 องศาเซลเซียส (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ค่าพีเอชในช่วงเช้าและบ่ายอยู่ระหว่าง 7.7-8.1 ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรอยู่ระหว่าง 7.0-8.5 (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำทั้งในช่วงเช้าและช่วงบ่ายอยู่ระหว่าง 5.53-9.02 ซึ่งระดับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งต้องมี

มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเค็มอยู่ระหว่าง 23.2-27.9 พีพีที ค่าการนำไฟฟ้าอยู่ระหว่าง32.51-45.98 มิลลิซิเมนส์ต่อเซนติเมตร ความเป็นด่างรวมอยู่ระหว่าง 94.7-143.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความกระด้างรวมอยู่ระหว่าง 4084.0-4784.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าแอมโมเนียรวม 0.40-0.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณแอมโมเนียรวมที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องมีปริมาณที่น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) และค่าไนไตรท์อยู่ระหว่าง 0.01-0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณไนไตรท์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ยงยุทธ และ คณิต, 2537)

ตารางที่ 8 แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเพื่อศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน รวมระยะเวลา 50 วัน

คุณสมบัติของน้ำ	กลุ่มการทดลอง					
	A		B		C	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)						
เช้า	27.3-31.6	28.7	27.4-31.1	28.8	27.9-31.7	28.7
บ่าย	27.4-31.6	28.8	27.5-31.3	28.9	27.9-31.8	28.8
พีเอช เช้า	7.7-8.0	7.9	7.8-8.1	7.9	7.7-8.0	7.9
บ่าย	7.7-8.0	7.9	7.8-8.1	7.9	7.7-8.0	7.9
ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)						
เช้า	6.2-9.0	7.7	5.5-8.9	7.8	7.1-8.7	7.9
บ่าย	6.3-9.0	7.7	5.5-8.9	7.8	7.1-8.7	7.9
ความเค็ม (พีพีที)	23.2-27.6	24.7	23.5-27.0	24.9	23.9-27.9	25.2
การนำไฟฟ้า (มิลลิซิเมนต์ต่อเซนติเมตร)	36.9-45.9	42.3	32.5-45.7	41.9	38.3-45.8	42.5
ความเป็นด่างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	94.7-143.3	113.0	97.3-141.3	113.5	98.7-134.7	111.0
ความกระด้างรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4308.0-5740.0	5171.6	4084.0-5784.0	5112.3	4836.0-5757.0	5353.4
แอมโมเนียรวม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.4-0.8	0.5	0.4-0.9	0.6	0.4-0.9	0.5
ไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.01-0.03	0.01	0.01-0.02	0.01	0.01-0.02	0.02

วิจารณ์

จากการศึกษาการใช้ Aquanin plus เพื่อเป็นสารเพิ่มการเจริญเติบโตและระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ากุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงที่สุด กลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม พบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากในระยะเวลา 40-60 วันของการทดลอง กลุ่มของกุ้งที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมกับ Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทำให้เมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักของกุ้งใน 2 กลุ่มดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกัน แต่กุ้งในกลุ่มที่มีการให้อาหารผสม Aquanin plus ในระดับที่สูงกว่ามีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุด เนื่องมาจาก Aquanin plus มีองค์ประกอบของ Beta-cyclodextrin cysteamine hydrochlorine ปริมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง cysteamine เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในการใช้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและไก่ (Hall *et al*., 1986) และจากการศึกษาพบว่า cysteamine hydrochlorine เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งสิ่งที่ไปยับยั้ง growth hormone ทำให้ growth hormone ทำงานได้มากกว่าปกติ ซึ่งเป็นผลให้สัตว์ทดลองเจริญเติบโตดีมากกว่าสัตว์ปกติ ซึ่งมีการทดลองใช้ cysteamine hydrochlorine ผสมในอาหารเลี้ยงปลา grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต (Xiao and Lin, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า cysteamine hydrochloride เป็นสารประกอบทางเคมีอย่างง่าย ราคาไม่สูง สะดวกในการผสมอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระดับฟาร์ม (Xiao and Lin, 2003)

การเปรียบเทียบอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์และ 0.05 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 20 วัน มีอัตราการรอดตายมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากการได้รับอาหารเสริม Aquanin plus ทำให้เมื่อกุ้งลอกคราบแล้ว เปลือกสามารถกลับมาแข็งได้ในระยะเวลาอันสั้น ทำให้กุ้งแข็งแรงและสามารถหลบหลีกการถูกกินจากกุ้งที่แข็งแรงกว่าในถังเดียวกันได้ ซึ่ง Gimenez *et al*. (2004) ศึกษาถึงการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้ง Argentine red shrimp (*Pleoticus muelleri*) โดยมีการเสริมให้วิตามินอีผสมลงในอาหารกุ้งในอัตราส่วนต่างๆ กัน หลังจากระยะเวลา 40 วันหลังจากทำการทดลอง ผลการศึกษา พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งที่ให้อาหารไม่ผสมวิตามินอีมีอัตรารอด 62 เปอร์เซ็นต์เท่ากันซึ่งต่ำกว่ากลุ่มที่ให้อาหารผสมวิตามินอีในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งพบว่ามีอัตรารอดระหว่าง 86 – 90 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักของกุ้งในกลุ่มที่เสริมวิตามินอีเพิ่มขึ้น 34 – 65

เปอร์เซ็นต์ และจากผลการศึกษาสรุปได้ว่าความต้องการวิตามินอีสูงสุดของกุ้ง *Pleoticus muelleri* คือปริมาณวิตามินอี 1,750 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม

จากการศึกษาถึงระดับที่เหมาะสมในการใช้ Aquanin plus เพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน โดยมีการประเมินจากองค์ประกอบต่างๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และ ความต้านทานต่อเชื้อ WSSV พบว่าการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันมีความสัมพันธ์กับระดับของการให้ Aquanin plus ผสมลงในอาหารที่เพิ่มขึ้นกล่าวคือ กุ้งขาวแวนนาไมที่มีการได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติผสมกับ Aquanin plus ในอัตราส่วน 1 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูปปกติ 1 กิโลกรัม ซึ่งเท่ากับ Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้การเพิ่มของระดับภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างไปจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ Aquanin plus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

และจากผลการศึกษาประสิทธิภาพของ Aquanin plus ในครั้งนี้พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 20 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นและเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งจะมีเพิ่มขึ้นภายในระยะเวลา 20 วันเช่นกัน นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกุ้งได้รับอาหารที่ผสม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 10 วัน ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเฉพาะปริมาณของเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งเท่านั้น ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถของ cysteamine ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ มีเพียงรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโต แต่ cysteamine เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งสิ่งที่ไปยับยั้ง growth hormone ทำให้ growth hormone ทำงานได้มากกว่าปกติ (Hall *et al*., 1986; Xiao and Lin, 2003)

นอกจากนี้ Aquanin plus ยังที่มีส่วนประกอบของวิตามินอี 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีส่วนช่วยเสริมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในระดับเซลล์ (cellular immune response) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านทางสารน้ำ (humural immune response) (Reddy *et al*., 1987) และวิตามินอีมีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ macrophage (Wiss *et al*., 1962) ซึ่งจากการศึกษาความสำคัญของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าจากศึกษาประสิทธิภาพของ Aquanin plus ต่อกุ้งที่ได้รับ

อาหารผสม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 20 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้น การเพิ่มมากขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดรวมนี้ จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันก็จะสูงขึ้น ร่างกายของสัตว์น้ำก็จะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้ดีด้วย เนื่องจากเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

จากการศึกษาของ Lee and Shiau (2004) โดยผสมวิตามินอีซึ่งอยู่ในรูปที่เสถียรลงในอาหารกุ้ง เพื่อศึกษาปริมาณความต้องการวิตามินอีในการเจริญเติบโต ผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และ ความเข้มข้นของวิตามินอีที่สะสมในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่มีการให้อาหารผสมวิตามินอี 75 และ 100 มิลลิกรัม มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว และปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่ากลุ่มอื่นที่ให้วิตามินอีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม และ He *et al*. (1992) รายงานถึงความต้องการวิตามินของกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อให้กุ้งมีการเจริญเติบโตปกติ มีพัฒนาการและมีการสืบพันธุ์ที่ดีขึ้นพบว่าวิตามินที่ละลายในไขมันเช่นวิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค เป็นวิตามินที่จำเป็นที่ต้องเพิ่มลงในอาหารให้กับกุ้งขาวแวนนาไม สอดคล้องกับ He and Lawrence (1993) ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นเวลา 8 สัปดาห์โดยมีการให้อาหารที่ผสมวิตามินอีแก่กุ้ง ผลจากการทดลองพบว่าน้ำหนักของกุ้งในกลุ่มที่ผสมวิตามินอีในอาหาร เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้อาหารผสมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสาร Aquanin plus มีประสิทธิภาพในการช่วยเสริมการเจริญเติบโต การรอดตาย การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และ ความต้านทานต่อเชื้อ WSSV จึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มผลิตในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมต่อไปในอนาคต

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การทดลองเพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของ Aquanin plus ที่ใช้ในการผสมอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยผลการทดลองสรุปว่า การเสริม Aquanin plus 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารให้กับกุ้งขาวแวนนาไม มีส่วนช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หลังจากกุ้งได้รับอาหารเป็นเวลา 10 - 20 วัน

2. Aquanin plus ที่ผสมลงในอาหารปริมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้กุ้งรอดตายจากแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ สำหรับความต้านทานต่อ WSSV พบว่าเมื่อใช้อาหารสำเร็จรูปผสม Aquanin plus 0.05 เปอร์เซ็นต์และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กุ้งมีระยะเวลารอดชีวิตยาวนานกว่ากลุ่มควบคุม

3. อาหารที่มีการเสริมด้วย Aquanin plus ด้วยระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จะส่งผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน ความเข้มข้นของ Aquanin plus ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับของภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เพิ่มขึ้นด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงผลของ Aquanin plus ต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงในระดับฟาร์ม โดยผสมกับอาหารสำเร็จรูปมาจากโรงงาน เพื่อความสะดวกในการใช้สำหรับเกษตรกร

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ Aquanin plus ผสมลงในอาหารสำเร็จรูปแก่สัตว์น้ำเพื่อความเหมาะสมของต้นทุนการผลิต และเพื่อให้เกิดความคุ้มค่าของราคาต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudlf Hoffmann. 2543. ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์.** ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588

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

จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุณยรัตผลิน, เรวัตร คงประดิษฐ์ และ อุษณีย์ เอกปฏิฐานพงษ์. 2538. **ไวรัสรูปแท่งของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ**. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2538, สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง จังหวัดสงขลา.

_____, สิทธิ บุณยรัตผลิน และ T. Itami. 2540. **การตรวจวินิจฉัยโรคตัวแดงดวงขาวของกุ้งที่เลี้ยงในแถบเอเชียด้วยกล้องจุลทรรศน์และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส**. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 8/2540, สถาบันวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง.

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

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. ฐานเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ.

_____. 2540. ลักษณะโรคจุดขาวชนิดต่างๆ ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. หน้า 109-111. *ใน* **รายงานสัมมนาทางวิชาการ เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง**, กรุงเทพมหานคร.

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

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

ดารุณี แซ่อุ่ย, อนันต์ ตันสุตะพานิช และ ลิลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*), น. 1-6. *ใน* โรคกุ้งทะเลและการใช้เคมีภัณฑ์**. เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่องการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ครั้งที่ 1, ตุลาคม 2530**. ชมรมวิทยาศาสตร์การประมงและคณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

ธนาทิพย์ แหลมคม. 2537. **การศึกษาประสิทธิภาพของออกโซลินิค แอซิดในการป้องกันโรควิบริโอซิสในกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนิษฐา ทรรพนันทน์. 2543. **ปฏิบัติการชีววิทยาประมง (Laboratory in Fishery Biology).** คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 77 น.

นที สรพิพัฒน์. 2550. **เครือข่ายความร่วมมือบริการเภสัชสนเทศ**. แหล่งที่มา : http://drug.pharmacy.psu.ac.th/Question.asp?ID=7655&gid=3, 20พฤศจิกายน 2550

นนทวิทย์ อารีชน. 2533. **การใช้ Povidone Iodine ในการกำจัดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio harveyi***. วารสารการประมง 43(3): 199 – 223.

นัฏพร ชัยศักดิ์ชาตรี. 2541. **การเปรียบเทียบผลของวิตามินซีรูปแบบต่างๆ ในอาหารกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิคม ละอองศิริวงศ์. 2546. การวิเคราะห์น้ำ , น.63-148. *ใน* นิคม ละอองศิริวงศ์ และยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร, บรรณาธิการ. **วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (Method of Water Analysis for Coastal Aquaculture).** สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง.

ประจวบ หลำอุบล. 2525. **บทปฏิบัติการวิชากุ้ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิยะ จุฬาวิทยานุกูล. 2528. **การศึกษาผลของวิตามินอีต่อการฟอร์มไข่ของปลากะรัง**. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กรุงเทพฯ.

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

พรเลิศ จันทร์รัชกูล, เจ เอฟ เทอร์นบอล และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2537. **คู่มือการเลี้ยงและป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ**. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, เกษตรกลางบางเขน, กรุงเทพฯ.

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

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

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

ยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร และ คณิต ไชยาคำ. 2537. ผลกระทบของน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งต่อคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติ. **เอกสารวิชาการ** ฉบับที่ 7/2537. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กรุงเทพฯ.

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

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

วาสนา มณีรัตน์. 2539. **ผลของวิตามินซีต่อความต้านทานโรค และ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลาดุกลูกผสม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2543. **การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุกิจ รัตนวินิจสกุล, สรรเสริญ ช่อเจี้ยง, ทวี โรจนสารัมภกิจ และ ไพฑูรย์ ชอบสะอาด. 2531. **การทดลองหาแนวทางป้องกันและรักษาโรคที่เกิดกับลูกกุ้งทะเลระยะ P2 – P15 ในบ่ออนุบาล**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2531 สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดนครศรีธรรมราช กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุเทพ สุวรรณหงษ์. 2546. **ประสิทธิภาพของฟอร์มาลินในการควบคุมโรคไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธี เกื้อเกตุ. 2543. **การสะสมและกระจายของไอออนจากน้ำทะเลในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เขตน้ำจืด: กรณีศึกษาที่บ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนีย์รัตน์ ชื่นสระน้อย. 2541. **ผลของวิตามินอีต่อความต้านทานโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลาดุกลูกผสม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุปราณี ชินบุตร. 2546. **การผลิตกุ้ง.** กรมประมง. กรุงเทพฯ.

สุพล พันธุมะโอภาส. 2542. **การศึกษาการใช้ *Chlorella* sp., *Chaetoceros calcitrans* และ *Vibrio* sp. โคโลนีสีเหลืองเพื่อควบคุม *Vibrio harveyi* ในระบบการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

Alava, V.R., A. Kanawa, S. Teshima and S. Koshio. 1993. Effect of dietary vitaminA, E and C on ovarian development of *Penaeus japonicus*. **Nippon Suisan Gakkaishi** 59: 1235 – 1241.

APHA, AWWA and AWCA. 1989. **Standard Methods for the Examination Water and Wastewater**. 17th ed. American Public Health Association, Washington. D.C.

Anil, T.M., K.M. Shankar and C.V. Mohan. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Dis. Aquat. Org**. 51: 67-75.

Arrignon, J.C.V., J.V. Huner, P.J. Laurent, J.M. Griessinger, D. Lacroix, P. Gondouin and M. Autrand. 1994. **Warm-Water Crustaceans**. The McMillan Press Ltd, London and Basingstoke.

Boyd, C.E. 1982. **Water Quality Management for Fish Pond Culture**. Elsevier Sci. Publ.Co., Amsterdam, Netherlands.

Boyd, C.E. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming Series 2**. Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University, Auburn, Alabama.

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

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

Csallany, A.A., K.L. Ayaz and L.C. Su. 1997. Effect of dietary vitamin E and aging on tissue lipofuscin pigment concentration in mice. **J. Nutr**. 107: 1792-1799.

Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World**. Osprey Books.

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

Furones, M.D., D.J. Alderman, D. Bucke, T.C. Fletcher, D. Knox and A. White. 1992. Dietary vitamin E and the response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. **J. Fish Biol**. 41: 1031-1041.

Grant, C.A. 1961. Morphological and etiological studies of dietetic microangiopathy in pigs ("mulberry heart"). **Acta Vet. Scand**. 2: 1- 9.

Gimenez, A.V.F, J.L. Fenucci and A.M. Petriella. 2004. The effect of vitaminE on growth, Survival and hepatopancreas structure of the Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Crustacea). **Aquaculture** 35: 1172 – 1178.

Hall, T.R., S. Harvey and C.G. Scanes. 1986. Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. **Comp**. **Biochem. Physiol**. 84: 231 – 253.

He, H. and A.L Lawrence. 1993. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** Issue 3 – 4 : 245 – 255.

_____, A.L. Lawrence and R. Liu. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat – soluble vitamin, A, D, E and K for penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 103: 177 – 185.

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

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, Phillippines.

Karunasagar, I., S.K. Otta and I. Karunasagar. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. **Aquaculture** 140: 241 - 245.

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

Kogure, K., U. Simidu and N. Taga. 1980. Effect of phyto-and zooplankton on the growth of marine bacteria in filtered seawater. **Bull. Jpn. Soc. Fish.** 46(3) : 323 - 326.

Kono, T., R. Savan, M. Sakai and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification**. J. Virol. Meth.** 115: 59 - 65.

Lake, A. M., M.J. Stuart and F.A. Oski. 1977. Vitamin E deficiency and enhanced platelet function : Reversal following E supplementation. **J. Pediatr**. 90: 722 - 728.

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

Lee, M.H. and S.Y. Shiau. 2004. Vitamin E requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon* and effects on non – specific immune response. **Fish & Shellfish Immunol.** 16: 475 – 485

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

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

Mayo, M.A. 2002. A summery of taxonomic change recently approved by ICTV. **Arch. Virol**. 147: 1655 - 1656.

Moullac, G.L., C. Soyez, D. Sauliner, D. Ansqner, J. Avarre and P. Levy. 1998. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish & Shellfish Immunol.** 8: 621 - 629.

Obach, A.C. Quental and F.B. Laurencin. 1993. Effect of alpha-tocopherol and dietary oxidize fish oil on the immune response of seabass *Dicentrachus labrax*. **Dis. Aquat**. **Org**. 15: 175 - 185.

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

Pérez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeid and Sergestoid Shrimp and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Families and General**. Memories du Museum Nation D'Historie Naturelle, Paris, France.

Poulos, B.T., C.R. Pantoja, D. Bradley-Dunlop, J. Aguilar and D.V. Lightner. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org**. 47: 13-23.

Prosser, J.I., K. Killbam, L.A. Glover and E.A.S. Rattray. 1996. Luminescence-based system for detection of bacteria in the environment. **Crit. Rev. Biotechnol**. 16(2): 157 - 183.

Rameshthangam, P. and P. Ramasamy. 2005. Protein expression in white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon* Fabricius**. Virus Res**. 110: 133 - 141.

Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S. W. Fitzgerald and C.P.Rhodes. 1985. Invertebrate immuneity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology**. 97: 183 - 350.

Reddy, P.D., J.L. Morrill, H.C. Minocha and J.S. Stevenson. 1987. Vitamin E is immunostimulatory in calves. **J. Dairy Sci**. 70: 993-999

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

Salte, R., T. Asgard and K. Liestol. 1988. Vitamin E and selenium prophylaxis against "hitra diseases" in farmed Atlantic salmon survival study. **Aquaculture** 75: 45 - 55.

Sawyer, N. G. and P. L. McCarty. 1967. **Chemistry or Sanitary Engineers.** McGraw-Hill Book Company, New York.

Smith, V. and K. Soderhall. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacean. **Symposium of the Zoological Society of London**. 56: 59 – 79.

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

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

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

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

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

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

Ullrey, D.E. 1972. Biological availability of fat soluble vitamin : vitamin A and carotene nutrients. **J. Anim. Sci**. 35: 648 – 657.

Ullrey, D.E. 1981. Vitamin E for swine. **J. Anim. Sci**. 53: 1039 – 1056.

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

Vlak, J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, G.H. Kou, D.V. Lightner, C.F. Lo, P.C. Loh and P.J. Walker. 2002. Nimaviridae: A new virus family infecting aquatic invertebrates. **Dis. Aquat. Org.** 57: 261-264.

Whanger, P.O. 1981. Selenium in Biology and Medicine , pp. 230 - 255. *Cited by* McDowell, L.R., ed. **Vitamin E Animal Nutrient : comparative aspects human nutrition**. Academic press, New York.

Wiss, O., R.H. Bunnell and U. Gloor. 1962. Absorption and distribution of vitamin E in the tissues. **Vit. Horm**. 20: 441 – 449.

Witteveldt, J., C.C. Cifuentes, J.M. Vlak, C.W. Marielle and M.C. van Hulten. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. **J. Virol.** 78: 2057 - 2061.

Xiao, D. and H.R. Lin. 2003. Effect of cysteamine –a somatostatin-inhibiting agent- on serum growth hormone level and growth in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Comp. Biochem. Physiol. A**. 134: 93 – 99.

Yoganandhan, K., S. Sathish, V. Murugan, R.B. Narayanan and A.S. Sahul Hameed. 2003. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. **Aquaculture** 215: 21 - 29.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

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

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน	50 มิลลิลิตร
Salt mixture	10 มิลลิลิตร
NaCl	10 มิลลิลิตร
$CaCl_2 . 2H_2O$	10 มิลลิลิตร
L-glutamine	1 มิลลิลิตร
Hepes	0.238 กรัม
L-cystein	5 กรัม

De-ionized water ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายสาร (ทุกตัวที่ใช้เตรียมสารเคมี)

วิธีการเตรียมสารเคมีแต่ละตัว คือ

1.1 M-199 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ใช้ได้ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) โดยวิธีเตรียมคือใช้ M-199 1 ซองกับ $NaHCO_3$ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.2 Salt mixture ปริมาตร10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

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

จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2 . 2 H_2O$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

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

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

L-glutamine 0.015 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.6 Hepes จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cystein จำนวน 5 กรัม

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

2. Shrimp saline

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

ผสมสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตรในขวดที่ผ่านการ autoclave และอบให้แห้ง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker’s yeast

0.9% NaCl

shrimp saline

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