



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรจารย์ประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตรจารย์ประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาว
แวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA
และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*
Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei*) Fed with Supplement *Schizochytrium* sp. and ARA Containing
Diets, and Challenged with *Vibrio harveyi*

นามผู้วิจัย นางสาวทัศนีย์ นลวชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, ปร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Supplement *Schizochytrium* sp. and ARA Containing Diets, and Challenged with *Vibrio harveyi*

โดย

นางสาวทัศนีย์ นลวชัย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2553

ทักษิณ นวลชัย 2553: การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้ง
ขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA
และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D. 113 หน้า

การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ระยะโพสลาร์วา 12 เป็นเวลานาน 70 วัน
โดยใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองและน้ำมันที่ได้จาก *Schizochytrium* sp. และ กรด arachidonic (ARA) เพื่อทดแทน
โปรตีนจากปลาป่นและน้ำมันปลาในอาหารสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม โดยศึกษาการเจริญเติบโต การรอดตาย
และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่มการทดลอง ใช้
โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารของแต่ละกลุ่มการทดลอง ซึ่งอาหารที่ใช้จะประกอบไปด้วย
โปรตีน 33 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันปลาในอาหารจะถูกแทนที่ด้วยน้ำมันจากถั่วเหลือง และ
น้ำมันซึ่งได้จาก *Schizochytrium* sp. และ ARA ซึ่งมี กรด docosahexaenoic (DHA) และ ARA ในปริมาณสูง
โดยอาหารแต่ละสูตรจะมีอัตราส่วน DHA:ARA เท่ากับ 0:0 (A), 0.5:0 (B), 0.25:0 (C), 0:0.25 (D), 0:0.12 (E),
0.5:0.12 (F) และ 0.25:0.06 (G) เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้อาหารกุ้งสำเร็จรูปสำหรับกุ้ง
ขาวแวนนาไมเพื่อเปรียบเทียบ ผลการศึกษาพบว่าน้ำหนักเฉลี่ย และอัตราการรอดตายของกุ้งในทุกกลุ่มการ
ทดลอง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *Schizochytrium*
sp. และ ARA ซึ่งมีกรด DHA และ ARA มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ด
เลือดกุ้ง กิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิต
เอนไซม์ superoxide dismutase โดยกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหาร สูตร F จะมีปริมาณ เซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งสูง
ที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับ อาหารสูตร G แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G มี
เปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase และมี
ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับ
อาหารสูตร F แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่ม
ควบคุม กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร B, C, D, E, F และ G มีค่าอัตราการเจือจางของซีรัมต่ำที่สุดที่สามารถลด
ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1 : 8 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร A ซึ่งมี
ค่าเท่ากับ 1 : 4 และจากการทดสอบความต้านทานของกุ้งต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่า อัตราการรอดตายของ
กุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้ มีค่าเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน กุ้งในกลุ่ม F และ G มีอัตราการ
รอดตายสูงที่สุดเท่ากันคือ 76.67 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับ
อาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของ
โปรตีนจากถั่วเหลืองและน้ำมันจาก *Schizochytrium* sp. และ ARA สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้ง
ทดแทนวัตถุดิบจากปลาได้

Thasanee Nonwachai 2010: Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Supplement *Schizochytrium* sp. and ARA Containing Diets, and Challenged with *Vibrio harveyi*. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 113 pages.

A 70-day growth trial was conducted with postlarvae 12 Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to study the use of soybean meal, and oil from *Schizochytrium* sp. and arachidonic acid (ARA) as fish meal and fish oil substitutes in practical diets for *L. vannamei*. The growth, survival and immune characteristics of shrimp were evaluated. Seven experimental diets (treatments) were designed with soybean meal used as the primary protein source, and each formulation contained 33% crude protein and 8% lipid. Fish oil was completely substituted with 3% soybean oil and *Schizochytrium* sp. and ARA rich in docosahexaenoic acid (DHA) and ARA were added at different concentrations. Seven treatments consisted of DHA:ARA ratio 0:0 (A), 0.5:0 (B), 0.25:0 (C), 0:0.25 (D), 0:0.12 (E), 0.5:0.12 (F) and 0.25:0.06 (G) percent respectively. Commercial shrimp feed was used as a reference. The final weight and survival rate of shrimp were not significantly different ($p>0.05$) among all treatments. However, shrimp fed on diets supplemented with DHA and ARA showed significant improvements in immune parameters, such as total hemocyte count (THC), phenoloxidase activity, superoxide dismutase activity, and bactericidal activity. Shrimp fed with feed formular F had highest THC but not significantly different ($p>0.05$) from shrimp fed with feed formular G, however significantly higher than those of treatments A, B, C, D, E and control group ($p<0.05$). Shrimp fed with feed formular G had highest percentage phagocytosis, phenoloxidase activity and superoxide dismutase activity. However, there was no significant difference ($p>0.05$) from treatment F but significantly higher ($p<0.05$) than treatments A, B, C, D, E and control group. Shrimp fed with feed formular B, C, D, E, F and G had bactericidal activity at the serum dilution of 1:8 while shrimp in the control group and treatment A had bactericidal activity at the serum dilution of 1 : 4. After shrimp were challenged with *Vibrio harveyi*, treatments F and G had highest survival rate (76.67 ± 0.58 %) significantly higher ($p<0.05$) than treatments A, B, C, D, E and control group. These findings demonstrate both a positive effect of soybean meal and oil from *Schizochytrium* sp. and ARA are alternative to fish-based ingredients in shrimp diets.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลีมีสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิตติ ชูเชิด และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรวิภา ฐริวิโรจน์กุล อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษาในด้านการทดลองและการตรวจแก้ไข
ข้อมูลต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณบริษัท Advanced BioNutrition จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุกคนที่ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการเก็บข้อมูล
ระหว่างวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งการดูแลความเรียบร้อยในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจในการทำงานจนสำเร็จ
ลุล่วงจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ทัศนีย์ นลวชัย
กุมภาพันธ์ 2553

สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------|------|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (4) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 4 |
| การตรวจเอกสาร | 5 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 49 |
| ผลการทดลอง | 62 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 81 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 84 |
| สรุป | 84 |
| ข้อเสนอแนะ | 86 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 87 |
| ภาคผนวก | 110 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 1 | ระดับโปรตีนในอาหารสำหรับกุ้งขนาดต่างๆ | 38 |
| 2 | ระดับของกรดอะมิโนในอาหารสัตว์น้ำ | 39 |
| 3 | กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ | 41 |
| 4 | ระดับของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นในอาหารของกุ้ง | 43 |
| 5 | ระดับของกรดไขมันในอาหารสำหรับกุ้งขนาดต่างๆ | 43 |
| 6 | สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง | 50 |
| 7 | น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 63 |
| 8 | อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 63 |
| 9 | ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10 ⁵ เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 65 |
| 10 | ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 67 |
| 11 | ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 68 |
| 12 | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 70 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 13 | ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 72 |
| 14 | อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> เท่ากับ 4.0×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ได้รับอาหาร สำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 74 |
| 15 | แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 77 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | วงจรชีวิตของ <i>Schizochytrium</i> spp. | 30 |
| 2 | แสดงลักษณะเซลล์ของ <i>Schizochytrium limacinum</i> | 31 |
| 3 | ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD@ superoxide dismutas | 57 |
| 4 | ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10 ⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 65 |
| 5 | ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่ง แปลกปลอม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 67 |
| 6 | ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ได้รับ อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 69 |
| 7 | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหาร สำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 70 |
| 8 | ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับ อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 72 |
| 9 | อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> เท่ากับ 4.0×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน | 74 |
| 10 | ลักษณะของเม็ดสี melanin ที่ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย <i>Vibrio harveyi</i> บริเวณที่ถูกสรชีที่เกิดที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อดำตัวปล่องที่ 2 | 75 |
| 11 | บริเวณที่ถูกสรชี คือ เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิด กระบวนการ melanization | 76 |

การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของ
กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม
Schizochytrium sp. และ ARA และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

**Growth, Survival and Non-Specific Immune Characteristics of Pacific White
Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Fed with Supplement *Schizochytrium* sp. and
ARA Containing Diets, and Challenged with *Vibrio harveyi***

คำนำ

กุ้งจัดเป็นสินค้าส่งออกที่มีศักยภาพเป็นลำดับต้นๆของประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท โดยประเทศไทยส่งออกกุ้งเป็นอันดับหนึ่งของโลกติดต่อกันตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 จนกระทั่งปัจจุบันในปี พ.ศ. 2551 ประเทศไทยผลิตกุ้งถึง 490,000 ตัน (สมาคมกุ้งไทย, 2552) โดยเป็นผลผลิตจากกุ้งขาวแวนนาไมถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากกุ้งชนิดนี้ผ่านการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน เลี้ยงง่าย โตเร็ว สามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงได้ (ชลอและพรเลิศ, 2547) เกษตรกรส่วนใหญ่ปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงจึงมีการใช้อาหารสำเร็จรูปในการเลี้ยงเป็นจำนวนมาก เนื่องจากแหล่งโปรตีนและไขมันที่สำคัญที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารกุ้งส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์น้ำได้แก่ หมึกและปลาทะเล รวมถึงพืชบางกลุ่ม เช่น กากถั่วเหลือง จากการขยายตัวของ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลกทำให้วัตถุดิบดังกล่าวมีราคาแพง ต้นทุนในการผลิตจึงสูงขึ้นไปด้วย ในขณะที่ราคาขายกุ้งในสภาวะปัจจุบันมีราคาต่ำ เนื่องจากประเทศผู้ซื้อที่สำคัญของไทย คือสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป กำลังประสบปัญหาเศรษฐกิจถดถอย (recession) ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะหาทางเลือกต้นทุนในการผลิตโดยหาแหล่งโปรตีนและไขมันจากแหล่งอื่นเพื่อทดแทนโปรตีนและไขมันจากสัตว์ทะเล ที่มีแนวโน้มลดลงหรือไม่สามารถเพิ่มขึ้นเพียงพอต่อความต้องการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

สาหร่ายขนาดเล็กที่เรียกว่าสาหร่ายขาว *Schizochytrium* sp. พบในน้ำเค็มตามป่าชายเลนและปากแม่น้ำ สาหร่ายกลุ่มนี้ มีปริมาณกรดไขมันกลุ่ม DHA ในปริมาณที่สูงมากถึงร้อยละ 30-40 ของกรดไขมันทั้งหมด ทำให้การใช้สาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มนี้สามารถใช้อีกทางเลือกหนึ่งเพื่อ

ทดแทนแหล่งของกรดไขมันจำเป็นในอาหารสัตว์น้ำได้ โดยที่ผ่านมามีการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเพิ่ม DHA ที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก สามารถใช้เพิ่มคุณค่าอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนและวัยเจริญพันธุ์ในสัตว์น้ำหลายชนิดได้ดี (Barclay and Zeller, 1996; Lewis *et al.*, 1998; Metz JG *et al.*, 2001) ประกอบกับในปัจจุบันมีอุตสาหกรรมการผลิตสาหร่ายกลุ่มนี้เพื่อใช้สกัดกรดไขมันจำเป็นทั้งในกลุ่ม Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3) และ Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) เพื่อนำไปใช้ในการผลิตอาหารของมนุษย์ โดยผลผลิตส่วนหนึ่งที่เหลือใช้จากกระบวนการนี้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดแทนแหล่งไขมันที่สำคัญในอาหาร และสัตว์ทะเลต่างๆ ซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการผลิตอาหารกุ้งต่ำจากเดิมมาก นอกจากนี้การเสริมกรดไขมันในกลุ่ม Arachidonic acid (ARA) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่สำคัญ พบมากในกุ้งวัยเจริญพันธุ์ในธรรมชาติ ในอาหารกุ้งก็อาจจะทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีมีสุขภาพที่แข็งแรง

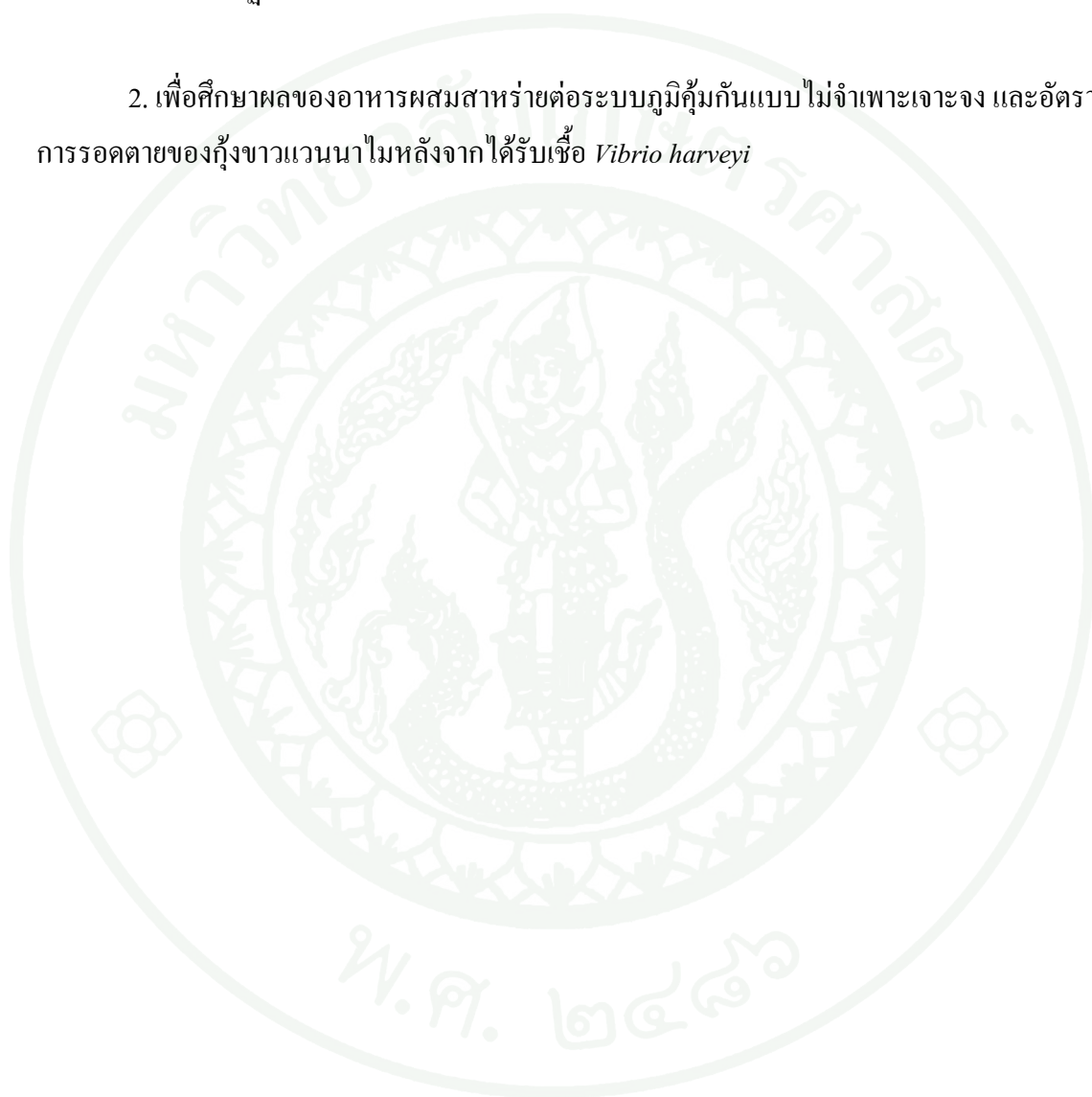
โปรตีนจากสัตว์ทะเล เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญสำหรับอาหารกุ้ง โดยทั่วไประดับโปรตีนจากสัตว์ทะเลที่เหมาะสมในอาหารกุ้งอยู่ที่ 20-25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพราะอุดมไปด้วยกรดอะมิโน, กรดไขมันจำเป็น, วิตามิน และเกลือแร่ แต่เนื่องจากในปัจจุบันเกิดปัญหาวิกฤตราคาน้ำมันรวมทั้งทรัพยากรสัตว์ทะเลก็เริ่มขาดแคลน ส่งผลให้ราคาวัตถุดิบสัตว์ทะเลที่นำมาใช้เพื่อผลิตอาหารสัตว์น้ำมีราคาสูงขึ้นมาก (Tacon and Metian, 2008) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการที่จะหาแหล่งโปรตีนและไขมันจากแหล่งอื่นที่มีราคาต่ำมาทดแทนโปรตีนและไขมันจากสัตว์ทะเล ที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยที่แสดงว่า มีการใช้วัตถุดิบซึ่งเป็นโปรตีนจากสัตว์บกเพื่อทดแทนวัตถุดิบโปรตีนจากปลา ในอาหารของปลาหลายชนิดเช่น ปลาช่อน, ปลานิล (Webster and Lim, 2002) และสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน เช่น *Macrobranchium rosenbergii* (Tidwell *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาก็เกี่ยวกับการใช้โปรตีนจากแหล่งอื่นเพื่อเป็นอาหารกุ้งขาวแวนนาไมนั้นยังให้ผลการศึกษาที่ไม่ชัดเจนนักโดย (Lim, 1996) รายงานว่า 40% ของโปรตีนจากทะเลที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้งสามารถทดแทนได้โดยใช้สารสกัดจากกากเมล็ดฝ้าย (cottonseed meal) และสารสกัดจากกากถั่วเหลือง (Lim and Dominy, 1990) แต่การทดแทนของโปรตีนเหล่านี้ในระดับสูงจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง ในขณะที่การใช้กากถั่วเหลืองร่วมกับโปรตีนจากไข่สามารถใช้ทดแทนปลาป่นในอาหารได้ดีโดยไม่มีผลกระทบต่ออัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้ง ทั้งการเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการและการเลี้ยงในบ่อดิน (Samocha *et al.*, 2004; Davis and Arnold, 2000) ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าสามารถใช้โปรตีนจากแหล่งอื่นเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์ทะเลได้ อย่างไรก็ตามในอาหารกุ้งยังต้องใช้ไขมันจากสัตว์ทะเลอยู่เพื่อให้ได้กรดไขมันที่จำเป็นเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง

สำหรับการศึกษารุ่นนี้เพื่อทดลองความเป็นไปได้ในการนำเอาโปรตีนจากถั่วเหลืองและไขมันจากสารสกัดจากสาหร่าย *Schizochytrium* sp. ในชื่อการค้าว่า “AquaGrow Gold” และ Arachidonic acid (ARA) ในชื่อการค้าว่า “AquaGrow ARA” จากบริษัท Advanced BioNutrition จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อทดแทนแหล่งโปรตีนและไขมันจากปลาป่นและไขมันปลาในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ตลอดจนศึกษาผลของอาหารนี้ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่เฉพาะเจาะจงและความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับอาหารชนิดนี้ ผลการวิจัยที่ได้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกุ้งขาวแวนนาไมต่อไปในอนาคต



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของอาหารผสมสาหร่ายต่อการเจริญเติบโต และการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาผลของอาหารผสมสาหร่ายต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi*



การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม หรือกุ้งขาวแปซิฟิก (Pacific white shrimp) ถูกค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ.1931 มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* ชื่อสามัญที่ FAO รับรองและใช้เรียกกันทั่วโลกคือ white leg shrimp หรือ Pacific white shrimp มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในทวีปอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ ได้แก่ เอกวาดอร์ เม็กซิโก บราซิล ฯลฯ ส่วนในทวีปเอเชียมีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ในหลายประเทศ ได้แก่ ใต้หวัน จีน อินโดนีเซีย เวียดนาม สำหรับประเทศไทย กรมประมงอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยงในปีพ.ศ. 2545 โดยอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวได้จากแหล่งที่กรมประมงรับรองแล้วเท่านั้น (มาลินี และสมยศ, 2548; ชลอ และคณะ, 2548) ซึ่งในขณะนั้นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้า ไม่ได้ขนาดตัวที่ต้องการ และเกิดโรคระบาดเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน ในขณะเดียวกันมีเกษตรกรบางส่วนทดลองเลี้ยงกุ้งขาวให้ผลค่อนข้างดีทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

2. ระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย

ชลอ และพรเลิศ (2547) กล่าวถึงรูปแบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย โดยแบ่งตามความเค็มของน้ำได้เป็น 2 แบบ คือ

1. การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำ

การเลี้ยงในเขตพื้นที่น้ำจืด เช่น ภาคกลาง โดยจะใช้น้ำความเค็มต่ำมากจนเกือบเป็นน้ำจืด ภิญโญ (2545) กล่าวว่า การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำจะใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีความเค็ม 100-200 พีพีที มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ระดับความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วทำการเลี้ยงในระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะกั้นคอกก่อน โดยใช้ผ้าพลาสติกพื้นที่ประมาณ 15 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือเข้าไปในคอกจนได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นจะใช้ลูกกุ้งซึ่งปรับความเค็มจากโรงเพาะฟักมาแล้ว

โดยลูกกุ้งระยะโพสลาาร์ว่า 10-12 มาปล่อยในคอก อนุบาลในคอกประมาณ 3-4 วัน ก็เปิดคอกออกมา จะอนุบาลในคอกไม่นานเนื่องจากกุ้งขาวจะกินอาหารเก่งและว่ายน้ำตลอดเวลา เพราะฉะนั้นจะไม่นิยมอนุบาลนานเกินไป เพราะอาจจะมีอาการกินกันเอง ส่วนอีกวิธีหนึ่งเกษตรกรจะไม่ทำคอกเหมือนกุ้งกุลาดำ คือ เตรียมน้ำความเค็มประมาณ 3-5 พีพีที ทิ้งบ่อแล้วให้ทางโรงเพาะฟักปรับความเค็มของลูกกุ้งอยู่ที่ความเค็มต่ำสุดประมาณใกล้เคียงกับที่ปล่อยในบ่อ แล้วนำลูกกุ้งมาปล่อยโดยตรงโดยที่ไม่มีการกั้นคอก การปล่อยลูกกุ้งโดยตรงในบ่อจะให้อัตราการรอดสูงกว่า ถ้าปล่อยลูกกุ้ง 100,000 ตัวต่อไร่ จะมีผลผลิตประมาณ 1,000 กิโลกรัม (1 ตัน) หรือมากกว่า 1 ตัน เล็กน้อยได้กุ้งขนาด 60-80 ตัวต่อกิโลกรัม ภายใต้ระยะเวลาการเลี้ยง 3 เดือน จะจับกุ้งบางส่วนออกขายก่อน โดยใช้อวนตาห่างเพื่อลากกุ้งขนาดใหญ่ออกครึ่งหนึ่ง หลังจากนั้นจะมีการเติมน้ำเค็มเพื่อเพิ่มความเค็มกุ้งที่เหลือจะมีการเจริญเติบโตดีขึ้นและเลี้ยงต่ออีกประมาณ 2 สัปดาห์ จะได้กุ้งที่มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งเป็นที่นิยมมากในการเลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำในพื้นที่น้ำจืด

2. การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ

การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ คือ การเลี้ยงโดยใช้น้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีทีขึ้นไปในพื้นที่ริมชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะการเลี้ยงทางภาคใต้ส่วนใหญ่จะมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 120,000 ตัวต่อไร่ ผลผลิตประมาณ 2 ตันต่อไร่ อัตรารอดประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์การเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกติจะได้ผลดีกว่าน้ำความเค็มต่ำเนื่องจากมีการถ่ายน้ำในปริมาณที่มากในช่วงท้าย ๆ ของการเลี้ยง

3. คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

คุณภาพน้ำเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งเนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ถ้ามีการจัดการคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ดี จะส่งผลต่อการกินอาหาร การเกิดโรคต่าง ๆ ของกุ้งได้ง่ายขึ้น และมีอัตราการรอดตายต่ำ (Boyd and Fast, 1992)

กุ้งขาวแวนนาไมสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีระดับความเค็มตั้งแต่ 0-45 พีพีที แต่ความเค็มที่เหมาะสมคือ 10-30 พีพีที (กรมประมง, 2547) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งต้องมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำให้กุ้งเจริญเติบโตและสารอินทรีย์สลายตัวเร็ว ถ้าปริมาณออกซิเจนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้กุ้งตาย (พุทธ, 2544; ชลอ และ พรเลิศ,

2547; Chen, 1985) นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการย่อยอาหาร ดังนั้นหากมีปริมาณออกซิเจนต่ำทำให้กุ้งกินอาหารลดลง (กรมประมง, 2546)

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

ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลทุกชนิด Boyd (1982) กล่าวว่า ค่าความเป็นด่างของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ในช่วง 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั่วไปการรักษาระดับความเป็นด่างในน้ำนั้นจะใช้วัสดุปูนในกลุ่มคาร์บอเนต ส่วนการเพิ่มความเป็นด่างอาจใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตหรือโซเดียมคาร์บอเนตขึ้นอยู่กับระดับพีเอชของน้ำ ประกอบกันด้วย (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

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

ชลอ และคณะ (2552) รายงานว่า อุณหภูมิจะส่งผลต่อการกินอาหารของกุ้งที่อุณหภูมิน้ำต่ำ (24 ± 1 และ 26 ± 1 องศาเซลเซียส) กุ้งกินอาหารในแต่ละมื้อในปริมาณน้อยกว่ากุ้งที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 1 , 32 ± 1 และ 34 ± 1 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำยังส่งผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำด้วย โดยเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะลดลง นอกจากนี้ อุณหภูมิที่สูงขึ้นยังมีผลทำให้สารพิษประเภทต่าง ๆ เช่น ยากำจัดศัตรูพืชและโลหะหนัก มีความ

เป็นพิษรุนแรงมากขึ้น ทั้งนี้ยังช่วยเร่งให้มีการดูดซึมและการแพร่กระจายของสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้เร็ว และจะทำให้แอมโมเนียในรูปที่เป็นพิษ (un-ionized ammonia) แยกตัวเพิ่มมากขึ้น (Boyd, 1982)

แอมโมเนียในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำเกิดจากการให้อาหารที่มีโปรตีนสูง โดยเฉพาะอาหารที่เหลือจากการกินอาหารของสัตว์น้ำจะทำให้ปริมาณแอมโมเนียในน้ำสูงขึ้น นอกจากนี้แอมโมเนียยังเกิดจากสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำและการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุ โดยแบคทีเรียปริมาณการแตกตัวของแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและพีเอชของน้ำ โดยพีเอชของน้ำจะมีอิทธิพลมากกว่าอุณหภูมิของน้ำ ถ้าในน้ำมีค่าพีเอชสูงความเป็นพิษของแอมโมเนียจะมากกว่าในน้ำที่มีพีเอชต่ำ ความทนทานของสัตว์น้ำต่อแอมโมเนียขึ้นอยู่กับชนิด สรีระของสัตว์น้ำและปัจจัยของสิ่งแวดล้อม (Boyd, 1989) โดยปริมาณแอมโมเนียที่สูงมากจะทำลายเหงือกทำให้การหายใจแลกเปลี่ยนออกซิเจนไม่เป็นปกติ ปริมาณแอมโมเนียรวมที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมควรต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brock and Main, 1994)

ไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนอีกรูปแบบหนึ่งซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำอย่างมาก เช่นเดียวกับแอมโมเนีย (ยนต์, 2539) ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมควรต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brock and Main, 1994) ความเป็นพิษของไนโตรเจนขึ้นอยู่กับระดับความเค็ม ในน้ำจืดไนโตรเจนจะมีระดับความเป็นพิษที่สูงกว่าในน้ำเค็มซึ่งจะเป็นพิษกับสัตว์น้ำที่เม็ดเลือดมีฮีโมโกลบิน (hemoglobin) โดยสามารถแย่งออกซิเจนจับกับเม็ดเลือดทำให้เกิดการขาดออกซิเจน แต่กุ้งมีฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ไนโตรเจนจะเข้าจับได้น้อยกว่าจึงมีความเป็นพิษต่อกุ้งน้อย แต่มีผลทำให้เลือดของกุ้งไม่สามารถเข้าจับกับออกซิเจนเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ กุ้งขาดออกซิเจนทำให้ระดับโปรตีนและค่า พีเอชของเลือดกึ่งลดลงเกิดการสะสมยูเรียในเลือดกึ่ง ระบบสมดุลเกลือแร่เกิดการเปลี่ยนแปลง คือดูดซึมน้ำมากเกินไป (พุทธ, 2544; ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

4. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม arthropod มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ที่มีมาแต่กำเนิด (Bachère *et al.*, 2000) โดยจะไม่มี การตอบสนองและการสร้างสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) (กิจการ และคณะ, 2543 จ) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด (open circulatory system) (Söderhäll *et al.*, 1996) ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไหลไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue พบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดิน พบอยู่เป็นชุด ๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และบริเวณใกล้กับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุคอปเปอร์ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน ในน้ำเลือดกุ้งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ hemocyanin (Ratcliffe *et al.*, 1985) โดยมีประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด (Djangmah, 1970) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดของตัว กุ้ง และวงจรการลอกคราบของตัวกุ้ง (Chen and Cheng, 1993) กุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค โดยเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ เกิดจากกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

4.1 กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism)

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

4.2 กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

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

กิจการ และคณะ (2543 จ) รายงานว่า เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด โดยใช้การมีหรือไม่มีกรานูล (granules) ในเซลล์เป็นหลัก คือ

1) hyaline cell หรือ hyaline hemocyte (hyalinocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules ในปริมาณน้อยมากหรือไม่พบเลยและไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมโครเมตร ยาว 6.8-13.9 ไมโครเมตร (ในกรณีที่เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) (กิจการ และคณะ, 2543 ก)หน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and Smith, 1986)

2) semi-granular cell หรือ semi-granular hemocyte (semi-granulocyte) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ เซลล์พบ SER และ RER ได้มาก มี cytoplasmic granules ขนาดเล็ก และจำนวนน้อย เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร และยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร ลักษณะของ cytoplasmic granules ภายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน

จากผิวภายนอก (กิจการ และคณะ, 2543 ก) ทำหน้าที่โดยตรงในการห่อหุ้มและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้ง prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell นี้ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกลืนกินได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

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

ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรธนาโวไล, 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำจะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของกึ่ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

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

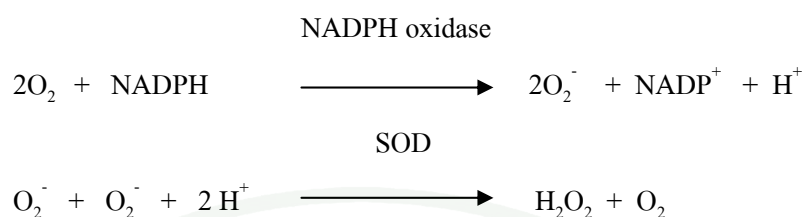
granular cell แต่ไม่พบในเม็ดเลือดชนิด large granular cell เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย ปริมาณเม็ดเลือดภายในตัวกึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และจะมีปริมาณลดลงเมื่อกึ่งเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนเม็ดเลือดที่ตายไปในปริมาณที่เหมาะสม

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีกระบวนการหลัก ๆ 3 แบบ ได้แก่

1) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

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

การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด และมีการยื่นไซโทพลาซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจน (O_2) เข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) ต่อจากนั้น superoxide anion จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



superoxide anion อาจถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide ได้อีกทางหนึ่ง โดยการเกิดเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ และได้ออกซิเจน 1 โมเลกุล (singlet oxygen; $^1\text{O}_2$) เป็นผลผลิตร่วมกับ hydrogen peroxide นอกจากนี้ superoxide anion ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radical (OH) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



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

2) กระบวนการ nodule formation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) โดยจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็น nodule จะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย มักพบการสร้าง nodule ที่เหงือก และ hepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสี melanin ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ semi-granular cell และ large granular cell (Johansson and Söderhäll, 1989)

3) กระบวนการ encapsulation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น เชื้อรา หนองตัวกลม ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ เป็นต้น (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) จนเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถกำจัดได้ทัน นอกจากนี้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอม วิธีนี้จะอาศัยของค้ประกอบในกระบวนการ prophenoloxidase activating system พร้อมกับการเกิดเม็ดสี melanin (Ratcliff *et al.*, 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเป็นชนิดเดียวกันกับการเกิด nodule formation จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ง) โดยใช้ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นสิ่งแปลกปลอมเพื่อติดตามและตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโรคของกิ้งกูดาคำ ด้วยวิธีนับเม็ดเลือดรวมและเนื้อเยื่อวิทยา หลังจากฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกิ้ง 1 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง และผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อพบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับ หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 3-9 พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงและสุดท้ายมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความแตกต่างของโครงสร้างเม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเซลล์ไม่พบ granule ภายในไซโทพลาซึมมี vacuole ขนาดใหญ่ในไซโทพลาซึม และพบเศษเซลล์ (debris) และลักษณะของ myelin figure แสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอมและเกิด autophagic vacuole (กิจการ และคณะ, 2543 จ)

4.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

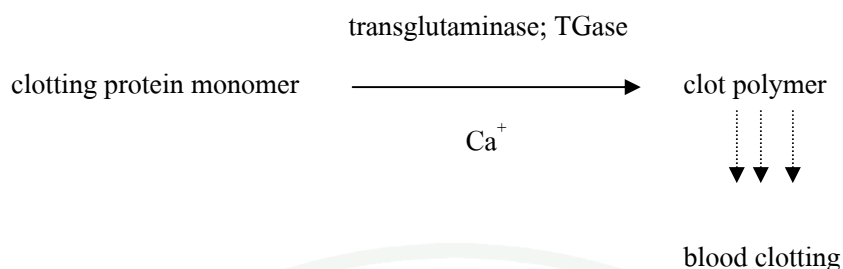
มีการทำงานต่อหรือพร้อมกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำและเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) มีน้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันตาม

ความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเชื้อก่อโรค เช่น ถ้า PRPs จับกับโมเลกุลของเบต้ากลูแคน ซึ่งสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ และ hyphae ของเชื้อรา จะมีชื่อเรียกว่า β -glucan binding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ในส่วนของเปปติโดกลัยแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก จะมีชื่อเรียกว่า peptidoglycan binding protein และไลโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จะมีชื่อเรียกว่า lipopolysaccharide binding protein (ชัยชาญ, 2545)

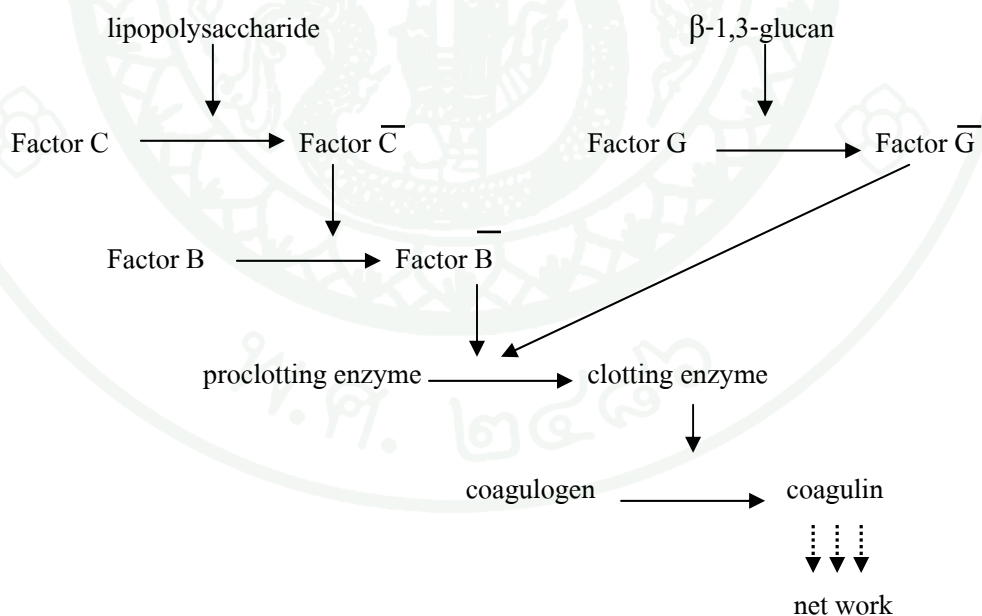
โดยโมเลกุลของสารเบต้ากลูแคน, ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเปปติโดกลัยแคน เรียกรวม ๆ ว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) เมื่อ PAMPs แต่ละชนิดเข้ามาในกระแสเลือด กิ่ง โมเลกุลของ PRPs จะเคลื่อนที่เข้าไปจับกับ PAMPs ส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (protein complex) ได้แก่ β -1,3-glucan-binding protein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

1) กระบวนการแข็งตัวของเลือด

เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ transglutaminase จะไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่งไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือด (วัชรียา, 2547) โดย transglutaminase จะทำงานร่วมกับ calcium ion (Ca^{2+}) กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการจับตัวเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้เม็ดเลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting) ดังแสดงในสมการต่อไปนี้



ในกระแสเลือดของปู (horseshoe crab) ชนิด *Tachypleus tridentatus* มีสารโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ ได้แก่ serineproteinase zymogen factors C, B, G และ proclotting enzyme ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย factors C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ และ factors G จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ β -1,3-glucan (Nakamura *et al.*, 1989; Seki *et al.*, 1994) โดย proclotting enzyme กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ได้เป็นสาร coagulin ส่งผลให้เกิดการจับตัวเป็นร่างแห เกิดการแข็งตัวของเลือดและเลือดไม่สามารถไหลออกจากร่างกายได้ (Iwanaga, 1993) ดังสมการต่อไปนี้



Yeh *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดกิ้งกูดำ โดยแยก clottable protein จากน้ำเลือดโดยใช้เทคนิค sequential DEAE anion-exchange chromatography ซึ่งโปรตีนนี้จะเกิดการแข็งตัวเมื่อมีแคลเซียมไอออน และเอนไซม์ TGase ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่ง

สามารถทนความร้อนได้ถึง 66 องศาเซลเซียส จากการศึกษาในครั้งนี่ยังพบว่า clottable protein มีขนาด 380 kDa โดยการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ MALDI-TOF mass spectrometry และยังพบว่ามีโครงสร้างของ amino acid และขนาดของโปรตีนคล้ายกับที่พบในกุ้งชนิดอื่น ๆ ทั้ง prawns, lobster และ crayfish ด้วย

Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดในกุ้ง crayfish พบว่า ในเม็ดเลือดทั้งชนิด semi-granular cell และ large granular cell รวมถึงเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อมีกิจกรรมที่เกิดการแข็งตัวของเลือดอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TGase แต่กิจกรรมดังกล่าวกลับไม่พบใน hepatopancreas และน้ำเลือด เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ nucleotide พบว่าลำดับเบสของเอนไซม์ TGase ของกุ้ง crayfish มีความคล้ายคลึงกันมากกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

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

2) การหลังสาร lectin

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

3) การหลั่งสารโปรตีนพวก peroxinectin

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

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

4) การหลั่งสารโปรตีน (protein released)

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

α - 2 macroglobulin (α -2M) หน้าที่ในการยับยั้งหรือทำให้พิษจากเชื้อก่อโรคเป็นกลาง (neutralization) รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase (เอนไซม์ที่สามารถย่อย

โปรตีน) ของเชื้อก่อโรค และทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้าง proteinase ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system อีกด้วย (Aspan *et al.*, 1990; Dieguez-uribeondo and Cerenius, 1998)

lysosome C type หน้าที่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลายระบบ osmoregulation ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

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

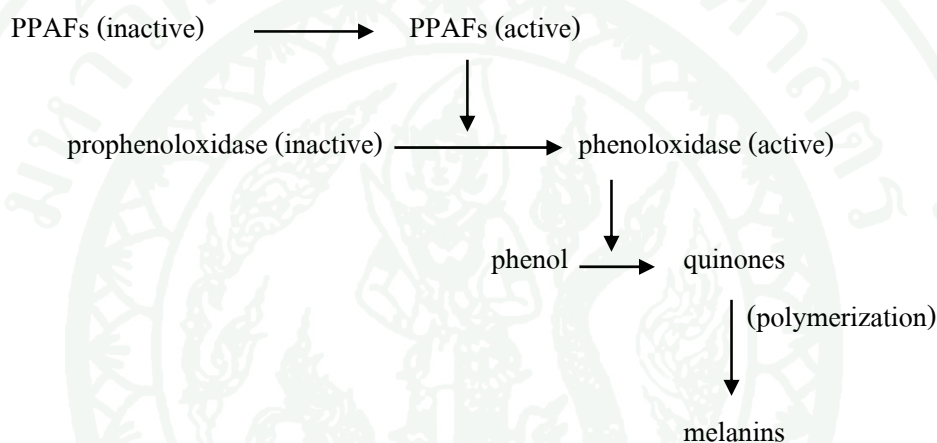
crustin หน้าที่เข้าไปเคลือบบนผนังเซลล์ทำให้เกิดการจับกันเป็น nodule เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย (Cuthbertson *et al.*, 2002)

สารโปรตีนพวก protein released สามารถพบได้ทั้งส่วนของน้ำ ซีรัมและในสารละลายเม็ดเลือดที่แตก (hemocyte lysate supernatant)

5) กระบวนการ prophenoloxidase activating system

เป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง เมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารพวก proenzyme และ substrates ต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยเอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่ยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive) จะต้องถูกกระตุ้นด้วยสารที่เรียกว่า serine proteinase homologues (SPHs) ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ร่วมกับเอนไซม์ prophenoloxidase activating factor/enzyme (PPAFs) (Söderhäll and Cerenius, 1998) และมีการทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน กระตุ้นให้เอนไซม์ prophenoloxidase สามารถทำงานได้ (active) (Hose *et al.*, 1987) โดยเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า เอนไซม์ phenoloxidase (PO) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยน tyrosinase ให้เป็น dihydroxylation และออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ซึ่งได้แก่ dihydroxyphenylalanin (DOPA) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone)

หลังจากนั้นควิโนนจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ dopachrome และเกิดกระบวนการ polymerization เกิดเป็นสาร melanin กระบวนการเกิดสาร melanin มีชื่อเรียกอีกว่า melanin formation หรือ melanization (ดั่งสมการ) โดยหน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992; Bachère *et al.*, 2004) และป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Söderhäll and Smith, 1986; Sung *et al.*, 1996) และทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances)



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

ทวิศักดิ์ (2547) รายงานว่าปริมาณของเอนไซม์ prophenoloxidase ในกุ้งกุลาดำ อายุ 1-4 เดือน มีการเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยกุ้งกุลาดำอายุ 1-4 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนว่ากุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase สูงที่สุด

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

การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายกุ้ง มีการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยจะตอบสนองทั้งภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดและภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ส่งผลให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับเชื้อก่อโรค โดยจำนวนเซลล์เม็ดเลือดจะลดลงทันทีในช่วง 1 ชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2 ชั่วโมงที่สองและที่สาม ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอยู่ในระดับต่ำคงที่หลังจากชั่วโมงที่สี่ จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (กิจการ และคณะ, 2543 จ) นอกจากนี้พบว่าอวัยวะ ได้แก่ เหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี และผลผลิตสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการ prophenoloxidase activating system

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

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

5. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งขาว

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

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

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งคือต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue) รวมทั้งอวัยวะต่าง ๆ ที่มีเซลล์จับกินอยู่กับที่กระจายอยู่ (Johnson, 1987)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ง) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายโดยจำนวนเม็ดเลือดจะลดลงทันทีในช่วงแรกหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งในชุดควบคุมนับได้ $3.36 \pm 1.85 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่ชุดที่ได้รับการฉีดเซลล์ยีสต์มีจำนวนเม็ดเลือด $2.12 \pm 1.96 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร และจำนวนเม็ดเลือดในชุดทดลองจะลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงโมเมนต์ที่ 2 และที่ 3 คือมีค่า $1.95 \pm 1.21 \times 10^4$ และ $1.28 \pm 0.44 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ และหลังจากช่วงโมเมนต์ที่ 4 เป็นต้นไป ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง และจะอยู่ในระดับต่ำกว่าที่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดในชุดควบคุมจะปกติอยู่ในระดับ $3.28 \pm 1.26 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งที่ได้รับเซลล์ยีสต์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดยีสต์ และจะเข้าสู่ระดับปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นพบว่าเหงือก หัวใจ

และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมจะมีเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเมื่อนิวคลีอัสเข้าไปในตัวกุ้ง จะพบเซลล์ของยีสต์ในเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวภายใน 1 ชั่วโมง ในระยะแรกของการจับกินจะมีเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ และเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยว ๆ เข้ามาจับกิน หลังจากผ่านไป 3-9 ชั่วโมง มีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้น จนเห็นเป็นกลุ่มใหญ่ขึ้นที่เรียกว่า nodule formation ซึ่งจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจะมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดน้อยลงและเมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมง หลังจากนิวคลีอัสเข้าสู่ตัวกุ้งหรือมากกว่านั้น จะพบว่ามีเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมในส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้นจนกลายเป็นแคปซูลขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะค่อย ๆ ถูกกำจัดออกไป เมื่อสิ่งแปลกปลอมถูกกำจัดออกจากร่างกายเม็ดเลือดที่ถูกสร้างขึ้นมาก็กลับเข้าไปในระบบหมุนเวียน ปริมาณเม็ดเลือดจึงค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้นจนเข้าสู่สภาวะปกติ พบลักษณะของ nodule formation หรือ encapsulation กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง hepatopancreas หัวใจ เหงือก ซึ่งกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีเซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียน และเซลล์จับกินกับที่ เข้ามาเกี่ยวข้องเป็นหลัก ในระยะสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้าง melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการของ prophenoloxidase

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

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

ที่เข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยตรง หรือสร้างสารรบกวนกิจกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกึ่งลดลงและก่อให้เกิดโรคได้

6. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

6.1 คุณภาพน้ำ

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดส่งผลให้การตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง กุ้งเกิดสภาวะการติดเชื้ออย่างรุนแรง โดยคุณภาพน้ำที่สำคัญที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ได้แก่

1.1 ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอชของน้ำ ถ้ามีความเปลี่ยนแปลงมากในรอบวัน หรือมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเล็ดลอดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (กิจกรรมและคณะ, 2543 จ) จากการศึกษาของ Allan and Maquire (1992) ได้ทดลองพบว่าน้ำที่มีค่าพีเอช 3.7 ส่งผลให้กุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 96 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงกุ้งที่พีเอช 5.9 เป็นระยะเวลา 23 วัน ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง 5 เปอร์เซ็นต์

1.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ในสภาวะที่ออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพฤติกรรมดำรงชีวิต โดยกุ้งจะเคลื่อนที่ช้าลงเพื่อลดกิจกรรมการใช้ออกซิเจนในร่างกาย และจะว่ายน้ำสู่วิวน้ำเพื่อรับออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลงส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเล็ด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Seidman and Lawrence (1986) พบว่าที่ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไม (Martinez-Palacios *et al.*, 1996) มีอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัวลดลง

1.3 ผลของอุณหภูมิต่อระดับภูมิคุ้มกัน พบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของ เอนไซม์ phenoloxidase และค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเล็ดลดลงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (30

องศาเซลเซียส) จากการศึกษาของ Yu (1993) เมื่ออุณหภูมิต่ำลงและมีการเลี้ยงกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมจะลดลง ซึ่งทำให้กุ้งมีอัตราการหายใจและน้ำหนักตัวลดลง โดยกุ้งที่เลี้ยงในตู้ทดลองที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบวันมาก ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและมีผลต่อ โปรตีนในซีรัมได้ในที่สุด

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

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

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

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

กิจการ และคณะ (2543 ข) ได้ทำการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่าในสภาพที่พีเอชของน้ำต่ำกว่าค่าปกติ (6.0) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase แต่มีผลให้ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมที่พีเอชปกติ (7.8) จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่ออกซิเจนละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความ

ว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจน ละลายน้ำปกติ (5.0-5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่ อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าความสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดต่ำกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยงใน สภาวะอุณหภูมิสูง

6.2 ชีวิตวิทยาบางประการของกุ้ง

กุ้งมีช่วงระยะเวลาของการลอกคราบ และระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Moullac *et al.*, 1998) กุ้งขาที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการลอกคราบของกุ้ง เนื่องจากน้ำจากตัวกุ้งจะมีการแพร่ออก และน้ำจากภายนอกจะมีการแพร่เข้าสู่ร่างกาย โดยกุ้งเมื่อเข้าสู่ระยะลอกคราบตัวกุ้งจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายเพื่อให้ร่างกายขยายตัวและลอกออกจากคราบเดิม เมื่อดอกคราบเสร็จตัวกุ้งจะมีการดึงแร่ธาตุกลับเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะแร่ธาตุแคลเซียม เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างเปลือกแข็ง ส่งผลให้กุ้งที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ แร่ธาตุในน้ำมีไม่เพียงพอในการสร้างเปลือกพร้อมกับมีน้ำแพร่เข้าสู่ตัวกุ้งตลอดเวลา ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอและตายขณะเปลือกยังไม่ขึ้น และเมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำที่ความเค็มสูง น้ำในร่างกายกุ้งมีการแพร่ออกตลอดเวลาแม้จะอยู่ในระยะก่อนลอกคราบซึ่งกุ้งต้องมีการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้กุ้งลอกคราบไม่ได้และตายในที่สุด จากการศึกษาของ Santos and Nary (1987) ในปู (*Chasmagnathus granulata*) พบว่าความเค็มของน้ำส่งผลให้น้ำตาลในเลือดลดต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปลี่ยนจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ไปเป็นน้ำจืด

7. แบคทีเรียสกุล *Vibrio*

เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งเป็นสาเหตุการตายของกุ้ง และปลาจำนวนมากซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) รูปร่างเป็นแท่งโค้ง (curved rods) หรือตรงขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้าง endospore หรือ microcyst เมื่ออยู่ในอาหารเหลว (liquid media) จะมีการเคลื่อนที่โดยใช้ monotrichous หรือ multitrichous flagella เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) สร้าง lateral flagella จำนวนมาก ทุกสายพันธุ์เป็น chemoorganotroph ต้องการ sodium ion เป็นตัวกระตุ้นสำหรับการเจริญเติบโตโดย

ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 5 – 700 mM. ส่วนใหญ่จะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย D-glucose และ NH_4Cl มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ต้องการสารอินทรีย์เพื่อการเจริญเติบโต และส่วนใหญ่ไม่สร้างก๊าซทุกชนิดสามารถใช้ D-glucose, D-fructose, maltose และ glycerol ส่วนใหญ่จะให้ปฏิกิริยา oxidase เป็นบวกทุกชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบได้ในช่วงความเค็มค่อนข้างกว้าง พบได้ทั่วไปในทะเล และบริเวณชายฝั่งรวมทั้งฉิวลำตัวและในลำไส้ของสัตว์ทะเล บางชนิดจะพบในแหล่งน้ำจืด หลายชนิดจะเป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล เปอร์เซ็นต์โมลของเบส G+C ของ DNA เท่ากับ 38 – 51 หลาย ๆ สายพันธุ์ของ *Vibrio* สามารถเคลื่อนที่ได้บนอาหารแข็ง การเคลื่อนที่จะเกิดจากความยาวของเซลล์ และมี lateral flagella เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นผลจากสภาพทางกายภาพ เคมี รวมทั้งความเข้มข้นของอาหาร องค์ประกอบของอาหาร และอุณหภูมิแบคทีเรียสกุลนี้สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด (Buchanan *et al.*, 1974) และสามารถเจริญได้ดีใน selective media คือ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS agar) เจริญได้ในสภาพที่มีพีเอชเท่ากับ 9 และก่อให้เกิดโรคแบบ secondary infection คือเมื่อร่างกายของสัตว์น้ำเกิดอาการเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้กึ่งอ่อนแอทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายได้จึงเรียกว่าเป็น opportunistic pathogen (Prosser *et al.*, 1996)

7.1 *Vibrio harveyi*

เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นแท่งตรง สร้าง lateral flagella บนอาหารแข็งเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ผลบวกใน D-mannose, cellobiose, D-gluconate, D-glucuronate, heptanoate, α -ketoglutarate, L-serine, L-glutamate และ L-tyrosine ให้ผลลบใน arginine dihydrolase, acetoin หรือ diacetyl และสามารถใช้ β -hydroxybutyrate, D-sorbitol, ethanol, L-leucine, γ -aminobutyrate และ putrescine เปอร์เซ็นต์โมลของเบส G+C DNA เท่ากับ 46–48 แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมาก (Ruangpan *et al.*, 1995) แต่ก่อนพบว่าเป็นสาเหตุการตายของกุ้งวัยอ่อนเท่านั้น แต่ต่อมาพบว่าเป็นสาเหตุการตายของกุ้งในบ่อเลี้ยงด้วย (Baticados *et al.*, 1990; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (Chen *et al.*, 1992) ความรุนแรงของการติดเชื้อเรืองแสงนั้น มีความสัมพันธ์กับชนิด และการเจริญเติบโตของกุ้ง ดารุณี และคณะ (2530) รายงานว่าการตายของลูกกุ้งแซบวัยมักเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นสารเรืองแสงในน้ำทะเลที่ใช้เพาะฟัก และมีสารเรืองแสงอยู่ตามซากกุ้ง และลูกกุ้งมีชีวิตในเวลากลางคืน และเมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงจากลูกกุ้งที่ป่วยเป็นโรคพบว่า

เป็นเชื้อ *V. harveyi* จากการตรวจสอบจะพบเชื้อมากในบ่อที่มีการตายของลูกกุ้ง 70-100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าลูกกุ้งระยะ nauplius มีการยอมรับเชื้อ *V. harveyi* ดีที่สุด ขณะที่กุ้งระยะ mysis และ โปสตาไรวา มีการยอมรับเชื่อน้อยลงตามลำดับ

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

7.2 พฤติกรรมภายนอกของตัวกุ้ง

กุ้งที่ติดเชื้อเริ่มแสดงอาการเชื่องซึม (จรีพร และคณะ, 2546) ว่ายน้ำเกยขอบบ่อ เรืองแสงในที่มืด และเริ่มมีการตายมากขึ้นตามระยะเวลาการติดเชื้อ ลักษณะเด่นภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ คือ ตัวกุ้งมีสีเข้ม มีลำตัวสีแดง (จรีพร และคณะ, 2546) ตัวหลวม ตัวขาวขุ่น ว่ายน้ำไม่สะดวก เหงือกมีสีแดงหรือน้ำตาล นอกจากนั้นเปลือกมีจุดสีดำบนเปลือกและรยางค์กร่อนบางบริเวณ มีอัตราการตายสูง โดยเฉพาะระยะ postlarva และ juvenile มีรอยแผลสีดำที่เปลือกหรือเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น (Lightner, 1988; Alday de Graindorge and Flegel, 1999) มีการเรืองแสงอยู่ตามซอกกุ้ง มองเห็นชัดในที่มืด กุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบบริเวณขอบบ่อ

7.3 การเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของตัวกุ้ง

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

กิจการ และคณะ (2543 ข) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคลดลงทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และความว่องไวของเม็ดเลือดในการ

กลืนกินสิ่งแปลกปลอม โดยการเกิดโรคในกุ้งมีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลงซึ่งส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งลดลง

7.4 ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ในช่วงแรกของการติดเชื้อ เกิด tubular lumen ของ hepatopancreas ฝ่อ (atrophy) (จิริพร และคณะ, 2546) และต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ขึ้น เซลล์ hepatopancreas ตายเล็กน้อย ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ อาหารที่สะสมไว้ใน hepatopancreas น้อยลง พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวใน hepatopancreas และถ้าได้ hepatopancreas ถูกทำลาย พบเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับเซลล์ที่ตายชัดเจน กุ้งที่ติดเชื้อนาน 7 วัน พบเซลล์ hepatopancreas ต่อมน้ำเหลือง เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ตายเป็นบริเวณกว้างมีเม็ดเลือดเข้ามาล้อมจับมากขึ้น กุ้งทยอยตาย กุ้งที่ติดเชื้อนาน 14 วัน เซลล์ hepatopancreas จะตายและเกิดเป็นลักษณะ hepatopancreatic tubular necrosis กุ้งไม่กินอาหาร อ่อนแอและตายในที่สุด สำหรับ systemic vibriosis จะพบการรวมตัวกันของเม็ดเลือดในลักษณะของ nodule formation กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อ (Jiravanichpaisan *et al.*, 1994)

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

ชัยชาญ (2545) ได้ทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่กล้ามเนื้อ กุ้ง พบว่าในชั่วโมงที่ 3 และ 6 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ได้ฉีดเชื้อ โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป จำนวนเซลล์เม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีจำนวนไม่แตกต่างจากกุ้งปกติ

Martin *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาในกุ้ง *Sicyonia ingentis* พบว่าปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการฉีดเชื้อ *V. harveyi* 24 ชั่วโมง

8. *Schizochytrium* sp.

การจัดลำดับทางอนุกรมวิธานของกลุ่ม Thraustochytrids มีดังนี้ Honda (2001)

Superkingdom Eucaryota

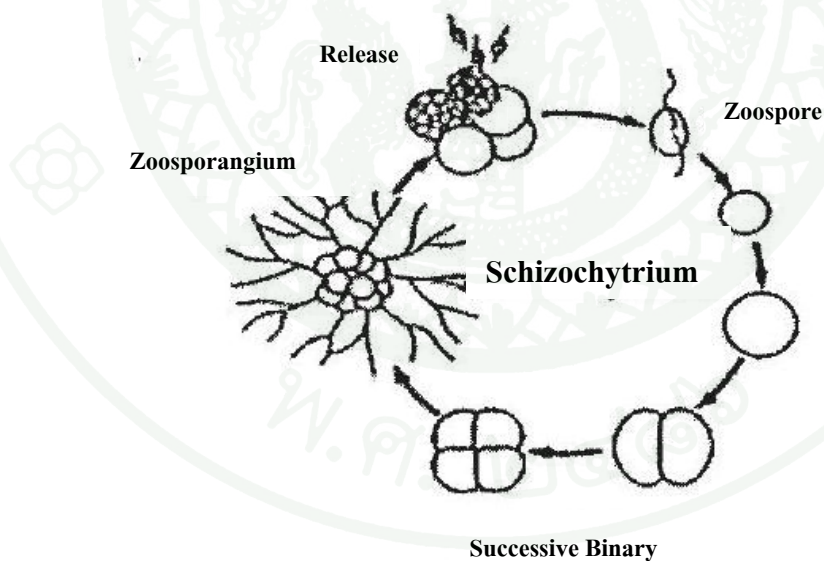
Kingdom Stramenopila

Phylum Labyrinthulomycota

Order Labyrinthulida

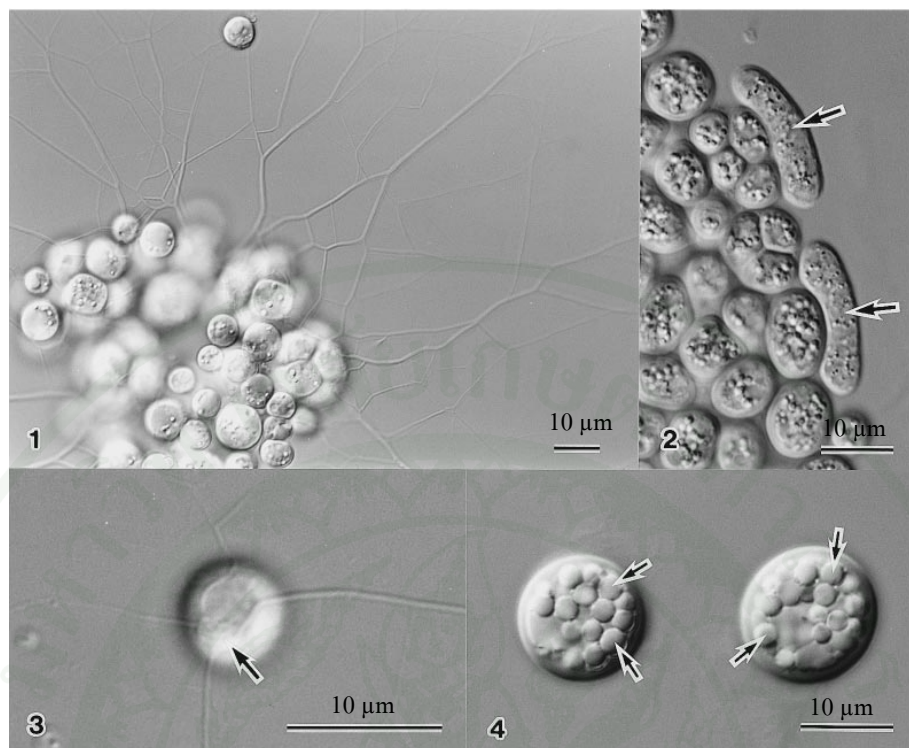
Family Thraustochytriidae

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



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของ *Schizochytrium* spp.

ที่มา: Honda (2001)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Schizochytrium limacinum* โดย (1) ลักษณะของ vegetative cell ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มและมี ectoplasmic cell (2) ลักษณะของเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (ลูกศร) (3) ลักษณะของ ectoplasmic cell (ลูกศร) และ (4) vegetative cell อายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งมี vacuoles รูปร่างกลมอยู่ภายในเซลล์ (ลูกศร)

ที่มา: Honda (1998)

ลักษณะเซลล์ปกติของ *Schizochytrium* sp. มีลักษณะเป็นทรงกลมเดี่ยวๆ (monocentric) และมีส่วนของ ectoplasmic net ที่ยื่นยาวออกมายึดเกาะพื้นผิว โดยทำหน้าที่ส่งเอนไซม์ไลติก (lytic) ไปยังจุดที่ยึดเกาะ แล้วย่อยสลายดูดซึมสารอาหารเพื่อไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของทลีสต์ (Bowles, 1997) ส่วนที่เป็น ectoplasmic net จะไม่มีผนังเซลล์และอแกเนล ส่วนไซโทพลาซึมของเซลล์ของทลีสต์จะแยกจากรูเมนของ ectoplasmic net โดยไปรวมกับ sagenogen (Moss, 1986) ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของ Thraustochytrids แม้ว่าจะยังไม่สามารถยืนยันหน้าที่ของซาจิโนเจนได้ชัดเจน แต่คาดว่าน่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยในระบบการทำงานของเอกโตพลาสมิกเน็ต และช่วยป้องกันไม่ให้อแกเนลภายในทลีสต์ไหลไปยังเอกโตพลาสมิก (Bowles, 1997)

การสืบพันธุ์ของ *Schizochytrium* sp. เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยทัลลัส (vegetative thallus) จะพัฒนาไปเป็นสปอร์แรงเจียม (sporangium) ลักษณะสปอร์แรงเจียมมีการแบ่งครึ่งเซลล์แบบทวิคูณ (successive binary division) จำนวน 4-5 ครั้ง แต่ละเซลล์จะผลิตซุโอสปอร์ (zoospore) (ภาพที่ 1) ในชนิด *S. limacium* พบว่าบางเซลล์มีลักษณะแบบอะมีบอยด์เซลล์ (amoeboid cell) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างยาวขึ้น (elongate) และหดตัวเป็นทรงกลมก่อนแบ่งตัวสร้างซุโอสปอร์ (Honda *et al.*, 1998) (ภาพที่ 1 และ 2)

พบ *Schizochytrium* spp. แพร่กระจายทั่วไปในสภาพแวดล้อมทางทะเล เช่น ดินตะกอน บริเวณชายฝั่ง ปากแม่น้ำ และซากเน่าเปื่อยของใบไม้บริเวณป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสารอินทรีย์อุดมสมบูรณ์ (Nakahara *et al.*, 1996) *Schizochytrium* spp. มีบทบาทต่อระบบนิเวศน์ป่าชายเลน เนื่องจาก *Schizochytrium* spp. จัดเป็นพวกเฮเทอโรโทรฟ (heterothrop) ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็น saprophyte โดยอาศัยซากพืช ซากสัตว์ และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์สาร ซึ่งเป็นการเพิ่มและหมุนเวียนแร่ธาตุต่างๆในระบบนิเวศน์ (Naganuma *et al.*, 1998) จุลินทรีย์กลุ่ม Thraustochytrids มีปริมาณ DHA สูงถึงร้อยละ 30-40 ของกรดไขมันทั้งหมดจึงทำให้มีความสำคัญในแง่ของแหล่งกรดไขมันในธรรมชาติ ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหารทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ในระบบนิเวศน์

นอกจากนี้ *Schizochytrium* spp. ยังมีบทบาทต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม โอเมก้า-3 ซึ่งปัจจุบันในทางการค้านิยมใช้กรดไขมันจาก 3 แหล่งใหญ่คือน้ำมันปลา สำหรับขนาดเล็ก และ Thraustochytrids ซึ่งพบว่า Thraustochytrids มีสัดส่วน DHA สูงกว่า EPA ขณะที่น้ำมันที่ได้จากปลานั้นมีสัดส่วน DHA ต่ำกว่า EPA โดยทั่วไปสัตว์น้ำมีความต้องการปริมาณ DHA สูง (เวียง, 2543) จึงได้มีการนำ Thraustochytrids มาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับอาร์ทีเมียหรือโรติเฟอร์ เพื่อให้มีปริมาณ n-3 PUFAs สูง ก่อนที่จะนำไปใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ดังนั้นการเสริมปริมาณ DHA ให้กับสัตว์น้ำถือเป็นการถ่ายทอด DHA ไปตามห่วงโซ่อาหารเพื่อเพิ่มหรือเสริมปริมาณ DHA ให้กับมนุษย์ทางอ้อม (Barclay and Zeller, 1996) โดยมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง *Schizochytrium* spp. เพื่อขยายและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณ DHA สูง รวมทั้งการนำ *Schizochytrium* spp. มาเสริมอาหารในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

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

Kamlungdee (2003) ศึกษาการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids: PUFA) จากจุลินทรีย์น้ำเค็ม *Schizochytrium* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ (strains N-1, N-2, N-5, N-6 และ N-9) ที่แยกได้จากใบ *Kandelia candel* ในป่าชายเลนบริเวณเกาะฮ่องกง โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งในห้องทดลองเป็นเวลา 52 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์น้ำเค็ม *Schizochytrium* sp. ทั้ง 5 สายพันธุ์สะสมกรดไขมัน EPA ในปริมาณต่ำกว่ากรดไขมัน DHA ในเซลล์ ปริมาณกรดไขมัน DHA ในเซลล์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (strains N-1, N-2, N-5, N-6 และ N-9) มีค่าเป็น 174.9, 203.6, 186.1, 171.3 และ 157.9 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ N-2 มีสัดส่วนของกรดไขมัน DHA สูงสุด

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

ลลิตา (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิด DHA ของ *Schizochytrium* 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี ผลปรากฏว่า *S. limacinum* BUCACD 032 มีปริมาณกรดไขมัน DHA มากที่สุดเท่ากับ 145.50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิต DHA 2,647.51 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ *S. limacinum* BUCARA 021 ปริมาณ DHA เท่ากับ 115.16 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิต DHA 2,070.59 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ *Schizochytrium* sp. 1 BUCAAA 093 มีปริมาณ DHA เท่ากับ 13.85 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ผลผลิต DHA 68.21 มิลลิกรัมต่อลิตร)

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

Barclay and Zeller (1996) ศึกษาการเสริม *Schizochytrium* sp. ซึ่งมี DHA สูงให้กับโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย พบว่าโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียที่ได้รับ *Schizochytrium* sp. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมี DHA สะสมจากที่ไม่สามารถวัดได้เพิ่มขึ้นถึง 0.8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มี EPA จาก 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มี DPA จากที่ไม่สามารถวัดได้เพิ่มขึ้นถึง 0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมี ARA 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งปกติโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียไม่มี ARA สะสมในเซลล์ จากการศึกษาสรุปได้ว่าโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียสามารถเปลี่ยน DHA (22:6n-3) เป็น EPA (20:5n-3) และเปลี่ยน DPA (22:5n-6) เป็น ARA (20:4n-6) ได้โดยกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (beta-oxidation)

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

Miller et al. (2007) ศึกษาการใช้กรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. ทดแทนน้ำมันปลาในอาหารอนุบาลลูกปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) โดยมี 4 ชุดการทดลองคือ อาหารผสมกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. 100 เปอร์เซ็นต์ อาหารผสมน้ำมันปลาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่ผสมน้ำมันปลาล์มและกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. ในอัตราส่วน 4:1 และ อาหารผสมน้ำมันปลา พบว่าการเจริญเติบโตและความสามารถในการย่อยไขมันของลูกปลาทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน แต่ลูกปลาที่ได้รับกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. มีเปอร์เซ็นต์ของ DHA สะสมในกล้ามเนื้อสูงกว่าชุดการทดลองอื่น สรุปว่ากรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. สามารถใช้ทดแทน

น้ำมันปลาในอาหารอนุบาลลูกปลา Atlantic salmon และสามารถเพิ่มปริมาณ DHA ในตัวปลาได้ ดังนั้นกรดไขมันจาก *Schizochytrium* sp. จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัว จำเป็นโดยเฉพาะ DHA สำหรับอาหารสัตว์น้ำ

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

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

ทรงทรัพย์ และคณะ (2551) ศึกษาการใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม และผลที่มีต่อความทนทานต่อความเครียดและความต้านทานโรค โดยการทดแทนและเสริมคีโตเซอรอส (*Chaetoceros* sp.) ต่างกัน 3 ระดับ คืออัตราส่วนระหว่างคีโตเซอรอส และ *S. limacinum* เท่ากับ 50 : 50 เปอร์เซ็นต์, 75 : 25 เปอร์เซ็นต์ และคีโตเซอรอส เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้คีโตเซอรอส 100 เปอร์เซ็นต์ ในการอนุบาลลูกกุ้งตั้งแต่ระยะซุเอีย (zoaea) 1 ถึงระยะซุเอีย 3 และอนุบาลด้วยอาร์ทีเมียตั้งแต่ระยะไมซิส (mysis) 1 ถึงระยะโพสลาว่า 15 พบว่าลูกกุ้งระยะไมซิส 1 มีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 89.81 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออนุบาลด้วยคีโตเซอรอส 100 เปอร์เซ็นต์ เสริม *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลูกกุ้งระยะโพสลาว่า 1 มีอัตราการรอดสูงสุดเท่ากับ 67.31 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออนุบาลด้วยคีโตเซอรอส 50 เปอร์เซ็นต์ และ *S. limacinum* 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเจริญเติบโตพบว่าไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างชุด

ทดลองและชุดควบคุมทั้งทางด้านความยาวและน้ำหนัก การทดสอบความทนทานต่อความเครียด โดยการแช่ฟอร์มาลินเข้มข้น 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับคีโตเซอร์อส 100 เปอร์เซ็นต์ เสริม *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุดคือ 63.22 ± 15.16 เปอร์เซ็นต์ การลดความเค็มจาก 30 ppt เหลือ 5 ppt พบว่ากุ้งที่ได้รับคีโตเซอร์อส 75 เปอร์เซ็นต์ และ *S. limacinum* 25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายสะสมต่ำที่สุดคือ 24.33 ± 5.86 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายสะสมตลอดช่วงการทดลอง ($p > 0.05$) ของลูกกุ้งเมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

9. อาหารกุ้ง

อาหารสัตว์น้ำ ตามความหมายทางโภชนาการ (คณะแพทยศาสตร์, 2518; เวียง, 2542; Maynard and Loosli, 1969; Halver, 1972) คือ สิ่งที่สัตว์น้ำกินแล้วเกิดประโยชน์ต่อร่างกายโดยช่วยสร้างและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ให้พลังงานและช่วยควบคุมให้การปฏิบัติงานของกระบวน การต่างๆ ในร่างกายดำเนินไปตามหน้าที่ แล้วส่งผลให้สัตว์น้ำสามารถดำรงชีวิต มีการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ได้อย่างปกติ อาหารของสัตว์น้ำแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (เวียง, 2543) คือ อาหารธรรมชาติ (natural food) และอาหารที่จัดเตรียมขึ้น (prepared food)

1. อาหารธรรมชาติ หมายถึง อาหารที่มีอยู่แล้วและเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ
2. อาหารที่จัดเตรียมขึ้น หมายถึง อาหารที่ผู้เลี้ยงจัดทำหรือจัดหาให้สัตว์น้ำกิน โดยมีเป้าหมายหลักเพื่อเพิ่มผลผลิตของสัตว์น้ำให้สูงขึ้นพร้อมกับย่นระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง อาหารที่จัดเตรียมขึ้นยังแยกเป็นอาหารสมบูรณ์ (complete feed) และอาหารสมทบ (supplemental feed)
 - 2.1 อาหารสมบูรณ์ คือ อาหารที่มีสารอาหารที่สัตว์น้ำต้องการครบถ้วนและเพียงพอกับระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่น การเลี้ยงในกระชังหรือในที่กักขังที่ไม่มีอาหารธรรมชาติ หรือมีในปริมาณจำกัด
 - 2.2 อาหารสมทบ คือ อาหารที่ให้สัตว์น้ำกินเพิ่มเติมจากอาหารธรรมชาติ จึงไม่ต้องมีสารอาหารครบถ้วนเหมือนอาหารสมบูรณ์

สำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในปัจจุบันเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาโดยเลี้ยงระบบปิดหรือมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำน้อย มีเครื่องให้อากาศ และใช้อาหารสำเร็จรูปทั้งหมดโดยมีบริษัทเป็นผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูปจำหน่ายให้เกษตรกร วัตถุดิบหลักที่เป็นส่วนประกอบในอาหารกุ้ง ได้แก่ ปลาป่น กากถั่วเหลือง แป้งสาลี วิตามิน เกลือแร่ และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์ อาหารกุ้งที่จำหน่ายตามท้องตลาดจะแบ่งตามเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในอาหารซึ่งอาหารกุ้งกุลาดำจะมีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนสูงกว่าอาหารกุ้งขาว ส่วนอาหารสมทบมีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนต่ำที่สุดและใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำเป็นแหล่งโปรตีน จึงทำให้อาหารกุ้งกุลาดำมีราคาสูงกว่าอาหารกุ้งขาวและอาหารสมทบ ซึ่งในการเลี้ยงกุ้งค่าอาหารเป็นต้นทุนหลักสูงถึง 50-60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนรวมทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพของอาหารเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งหากสัตว์น้ำได้รับอาหารที่มีคุณภาพต่ำอาจก่อให้เกิดภาวะทุพโภชนาการ และเกิดโรคต่างๆ ขึ้นได้ง่าย (เวียง, 2543)

10. ความต้องการสารอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม

สารอาหารสำคัญที่สัตว์น้ำต้องการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุ ซึ่งสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารแต่ละชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน

10.1 โปรตีน (Proteins)

โปรตีนเป็นส่วนประกอบในร่างกายของสัตว์ประมาณ 65-75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการโปรตีนของสัตว์น้ำจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปัจจัยหลายอย่าง เช่น ขนาดของสัตว์น้ำ อุณหภูมิ ปริมาณพลังงานที่ร่างกายได้รับจากอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และไขมัน (เวียง, 2543) กุ้งต้องการโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโต ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ และให้พลังงาน (ชนิกา, 2546) กุ้งแต่ละช่วงอายุมีความต้องการโปรตีนในปริมาณที่แตกต่างกัน กุ้งวัยอ่อนและกุ้งขนาดเล็กมีความต้องการโปรตีนมากกว่ากุ้งวัยรุ่นและกุ้งโตเต็มวัย ซึ่งอาหารกุ้งสำเร็จรูปจะมีระดับโปรตีนในอาหารสัมพันธ์กับขนาดกุ้ง (ตารางที่ 1) อาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งควรมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 35-50 เปอร์เซ็นต์ (Peter, 1999)

แหล่งโปรตีนที่ใช้ในอาหารกุ้งส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์ เช่น หมึก ปลา และเปลือกหรือหัวกุ้ง นอกจากนี้ยังมีแหล่งโปรตีนจากพืชจำพวก ถั่วเหลือง (มะลิ, 2531) ปลาป่นเป็นแหล่ง

โปรตีนที่มีคุณภาพสูงซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอาหารกึ่งเพราะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในระดับที่เหมาะสม โดยเฉพาะไลซีน (lysine) เมไทโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (threonine) และทริปโตเฟน (tryptophan) (Davis, 2000; Flicker, 2002)

โปรตีนเป็นแหล่งของกรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งกึ่งมีความต้องการกรดอะมิโนจำเป็นจากอาหารเพียง 10 ชนิดจากกรดอะมิโนมีทั้งหมด 20 ชนิด (ตารางที่ 2) เนื่องจากกรดอะมิโนที่เหลือกึ่งสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองจากกรดอะมิโนจำเป็น ส่วนประกอบของกรดอะมิโนในอาหารกึ่งขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของกรดอะมิโนในกล้ามเนื้อของกึ่ง (Peter, 1999) ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารจะต้องมีมากพอ กึ่งจึงจะสามารถสังเคราะห์โปรตีนในร่างกายได้ตามต้องการและเจริญเติบโตเป็นปกติ (เวียง, 2543)

ตารางที่ 1 ระดับโปรตีนในอาหารสำหรับกึ่งขนาดต่างๆ

| ขนาดกึ่ง (กรัม) | ระดับโปรตีนในอาหาร (เปอร์เซ็นต์) |
|-----------------|----------------------------------|
| 0.002-0.25 | 50 |
| 0.25-1.0 | 45 |
| 1.0-3.0 | 40 |
| >3.0 | 35 |

ที่มา: Peter (1999)

ตารางที่ 2 ระดับของกรดอะมิโนในอาหารสัตว์น้ำ

| กรดอะมิโน | เปอร์เซ็นต์ในอาหาร | | | |
|---------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| | โปรตีน | โปรตีน | โปรตีน | โปรตีน |
| | 36 เปอร์เซ็นต์ | 38 เปอร์เซ็นต์ | 40 เปอร์เซ็นต์ | 45 เปอร์เซ็นต์ |
| Arginine | 2.09 | 2.20 | 2.32 | 2.61 |
| Histidine | 0.76 | 0.80 | 0.84 | 0.95 |
| Isoleucine | 1.26 | 1.33 | 1.40 | 1.58 |
| Luecine | 1.94 | 2.05 | 2.16 | 2.43 |
| Lycine | 1.91 | 2.01 | 2.12 | 2.39 |
| Methionine | 0.86 | 0.91 | 0.96 | 1.08 |
| Phenylalanine | 1.44 | 1.52 | 1.60 | 1.80 |
| Theronine | 1.30 | 1.37 | 1.44 | 1.62 |
| Tryptophan | 0.29 | 0.30 | 0.32 | 0.36 |
| Valine | 1.44 | 1.52 | 1.60 | 1.80 |

ที่มา: Akiyama *et al.*, 1991

10.2 ไขมัน (Lipids)

ไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิสระ ฟอสโฟลิปิด ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมัน แวกซ์ และ สเตอรอล ไขมันเป็นแหล่งที่ให้พลังงานสูงสุดต่อหน่วยน้ำหนัก เป็นตัวนำวิตามินที่ละลายในไขมันไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย เป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมน และเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัว

กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนยาว 18-22 อะตอม และมีพันธะคู่ตั้งแต่ 1-6 คู่ กรดไขมันกลุ่มนี้มีจุดหลอมเหลวต่ำ ซึ่งจุดหลอมเหลวของไขมันแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะคู่ ตำแหน่งของพันธะคู่ และจำนวนของคาร์บอนอะตอม ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอมจำนวนมากจะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าไขมันที่

ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอมจำนวนน้อย ไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว หรือมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลจะมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวหรือไม่ มีพันธะคู่และจุดหลอมเหลวจะยิ่งต่ำลงตามจำนวนพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้น (เวียง, 2543) โดยทั่วไปกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในสภาพที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องและบางชนิดเป็นของเหลวที่จุดเยือกแข็ง เช่น กรดไขมันไลโนเลนิก (18: 3n-3) มีจุดหลอมเหลวที่ -10 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3)

10.2.1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบ่งตามจำนวนพันธะคู่มี 2 ชนิด คือ

1. Monounsaturated Fatty Acid คือกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่เพียงคู่เดียว เช่น palmitoleic acid (16: 1n-7) , oleic acid (18: 1n-9) เป็นต้น กรดไขมันเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว

2. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) คือกรดไขมันที่มีจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไป เช่น linoleic acid (18:2n-6), γ -linolenic acid (18:3n-6) และ eicosapentaenoic acid (20:5n-3) กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 อะตอมขึ้นไป และจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 3 คู่ขึ้นไปจะเรียกว่า highly unsaturated fatty acid (HUFA) โดยทั่วไปจะใช้เรียกกรดไขมันในกลุ่ม โอเมก้า-3 (ω 3 หรือ n-3) ซึ่งประกอบด้วย eicosapentaenoic acid (EPA ; 20:5n-3) และ docosahexaenoic acid (DHA ; 22:6n-3)

ตารางที่ 3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดต่างๆ

| ชื่อ | สูตรโมเลกุล | สัญลักษณ์ | จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส) |
|---|--------------------|-----------|-------------------------------|
| กรดปามีโตเลอิก (palmitoleic) | $C_{15}H_{29}COOH$ | 16:1n-7 | 0.5 |
| กรดโอเลอิก (oleic) | $C_{17}H_{33}COOH$ | 18:1n-9 | 13.4 |
| กรดไลโนเลอิก (linoleic) | $C_{17}H_{31}COOH$ | 18:2n-6 | -5.0 |
| กรดไลโนเลนิก (linolenic) | $C_{17}H_{29}COOH$ | 18:3n-3 | -11.0 |
| กรดอะราชิโดนิก (arachidonic; ARA) | $C_{20}H_{31}COOH$ | 20:4n-6 | -49.5 |
| กรดไอโคซะเพนตะอีโนอิก (ecosapentaenoic; EPA) | $C_{19}H_{31}COOH$ | 20:5n-3 | -54.0 |
| กรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic; DHA) | $C_{21}H_{33}COOH$ | 22:6n-3 | -44.0 |

ที่มา: อักนิตย์ (2541)

10.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบ่งตามตำแหน่งของพันธะคู่แรกในสายคาร์บอนมี 3 กลุ่ม คือ

ก. กลุ่มโอเมก้า – 3 ($\omega 3$; n-3) เป็นกรดไขมันในกลุ่ม linolenate (linolenate series) มีตำแหน่งของพันธะคู่แรกในสายคาร์บอนอยู่ที่คาร์บอนตัวที่ 3 ได้แก่ α -linolenic acid (18:3n-3) หรือ ALA, eicosatrienoic acid (20:3n-3), eicosatetraenoic acid (20:4n-3) หรือ ETA, eicosapentaenoic acid (20:5n-3) หรือ EPA, docosapentaenoic acid (22:5n-3) หรือ DPA และ docosahexaenoic acid (22:6n-3) หรือ DHA กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มนี้พบมากในสาหร่าย น้ำมันที่ได้จากสัตว์ทะเล (บุญล้อม, 2542)

ข. กลุ่มโอเมก้า – 6 ($\omega 6$; n-6) เป็นกรดไขมันในกลุ่ม linoleate (linoleate series) มีตำแหน่งของพันธะคู่แรกในสายคาร์บอนอยู่ที่คาร์บอนตัวที่ 6 ได้แก่ linoleic

acid (18:2n-6) หรือ LA, γ -linolenic acid (18:3n-6) หรือ GLA, dihomo- γ -linolenic acid (20:3n-6) หรือ DGLA, arachidonic acid (20:4n-6) หรือ ARA, adrenic acid (22:4n-6) และ docosapentaenoic acid (22:5n-6) กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มนี้พบมากในน้ำมันพืช ปลาน้ำจืด และน้ำกร่อยบางชนิด

ค. กลุ่มโอเมก้า-9 (ω 9; n-9) เป็นกรดไขมันในกลุ่ม oleate (oleate series) มีตำแหน่งของพันธะคู่แรกในสายคาร์บอนอยู่ที่คาร์บอนตัวที่ 9 ได้แก่ eicosatrienoic acid (20:3n-9) กรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มนี้พบมากในสัตว์บก เช่น น้ำมันหมู น้ำมันวัว เป็นต้น

10.2.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly Unsaturated Fatty Acid; HUFA)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) เป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 20 อะตอมขึ้นไปมีจำนวนพันธะคู่ตั้งแต่ 3 คู่ขึ้นไป และเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 Nettleton (1985) รายงานว่าในน้ำมันปลาที่มีกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ประมาณ 7 ชนิด แต่มีเพียง 2 ชนิดที่มีความสำคัญคือ eicosapentaenoic acid (20: 5n-3; EPA) และ docosahexaenoic acid (22: 6n-3; DHA) EPA เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 20 อะตอม และมีพันธะคู่ 5 พันธะที่ตำแหน่ง 5, 8, 11, 14 และ 17 เมื่อนับจากปลายด้านคาร์บอกซิล (carboxyl end) ส่วน DHA เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 22 อะตอม และมีพันธะคู่ 6 พันธะที่ตำแหน่ง 4, 7, 10, 13, 16 และ 19 เมื่อนับจากปลายด้านคาร์บอกซิล

กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่ม HUFA มี 5 ชนิด ได้แก่

Eicosatrienoic acid (20:3n-3)

Eicosatetraenoic acid (20:4n-3)

Eicosapentaenoic acid (20:5n-3)

Docosapentaenoic acid (22:5n-3)

Docosahexaenoic acid (22:6n-3)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นต่อร่างกายก็มี 4 ชนิด ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid; 18:2n6) กรดไลโนเลนิก (linolenic; 18:3n3) กรดไอโคซะเพนตะอีโนอิก (eicosapentaenoic acid; EPA; 20:5n-3) และกรดโดโคซะเฮกซะอีโนอิก (docosahexaenoic acid;

DHA; 22:6n-3) (ตารางที่ 4) กุ้งต้องการกรดไขมันจำเป็นจากอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการรอดตาย กุ้งที่ไม่ได้รับกรดไขมันจำเป็นหรือได้รับในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะแสดงอาการขาดกรดไขมันจำเป็นและมีการเจริญเติบโตช้า (Cuzon *et al.*, 2004) เนื่องจากกุ้งไม่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมและจำนวนพันธะคู่ใน โมเลกุลของกรดไขมันให้เป็น EPA และ DHA (Lim *et al.*, 1997) กุ้งจึงจำเป็นต้องได้รับกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากอาหารเท่านั้น ซึ่งกุ้งมีความต้องการกรดไขมันในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดหรืออายุ (ตารางที่ 5) โดยแหล่งของกรดไขมันที่ใช้ในการผลิตอาหารกุ้งส่วนใหญ่ได้แก่ น้ำมันปลาและน้ำมันจากสัตว์ทะเลอื่นๆ

ตารางที่ 4 ระดับของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นในอาหารของกุ้ง

| กรดไขมัน | เปอร์เซ็นต์ในอาหาร |
|--------------------------------|--------------------|
| Linoleic Acid (18:2n6) | 0.4 |
| Linolenic Acid (18:3n3) | 0.3 |
| Eicosapentaenoic Acid (20:5n3) | 0.4 |
| Docosahexaenoic Acid (22:6n3) | 0.4 |

ที่มา: Peter (1999)

ตารางที่ 5 ระดับของกรดไขมันในอาหารสำหรับกุ้งขนาดต่างๆ

| ขนาดกุ้ง (กรัม) | ระดับกรดไขมัน (เปอร์เซ็นต์) |
|-----------------|-----------------------------|
| 0.002-0.25 | 15 |
| 0.25-1.0 | 9 |
| 1.0-3.0 | 7.5 |
| >3.0 | 6.5 |

ที่มา: Peter (1999)

10.2.4 แหล่งที่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ω -3HUFA (EPA, DHA)

แหล่งที่สำคัญของ EPA และ DHA คืออาหารทะเลและน้ำมันจากสัตว์ทะเลโดยเฉพาะปลาทะเล เนื่องจากปลามีกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในการสร้างและรักษากรดไขมันเหล่านี้ไว้จึงทำให้ไขมันปลาแตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่น คือ มีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้เยื่อหุ้มสมองของปลาคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ในน้ำแข็ง จากการศึกษาปริมาณ EPA และ DHA ในปลาชนิดต่างๆ พบว่ามีปริมาณ EPA และ DHA อยู่ระหว่าง 4-37 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด (Kinsella, 1986) ปริมาณ EPA และ DHA จะแตกต่างกันตามชนิดของปลา แหล่งที่อยู่อาศัย ฤดูกาล ช่วงเวลาการวางไข่และปริมาณแอนไซม์ในการสร้าง EPA และ DHA จากกรดไขมันชนิดอื่น คือ desaturase และ elongase (Stansby *et al.*, 1990) นอกจากนี้ปริมาณกรดไขมันภายในตัวปลาก็มีความแปรปรวนค่อนข้างสูงและถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายจึงทำให้กลิ่น รส และคุณภาพของกรดไขมันลดลง

เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากปลาทะเลมีคุณภาพแตกต่างกันดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์หันมาสนใจแหล่งไขมันที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำพวกแพลงก์ตอนและสาหร่าย สิริวรรณ (2541) ได้ศึกษาปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในสาหร่ายเซลล์เดียวพบว่า *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp. และ *Tetraselmis* sp. มีปริมาณ EPA เท่ากับ 8.43 ± 0.29 , 0.41 ± 0.21 และ 3.34 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดย *Chaetoceros* sp. และ *Isochrysis* sp. มีปริมาณ DHA เท่ากับ 0.70 ± 0.03 และ 7.13 ± 0.23 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณรวม EPA และ DHA พบสูงสุดใน *Chaetoceros* sp. เท่ากับ 9.13 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ *Isochrysis* sp. มีปริมาณ 8.54 ± 0.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ไดอะตอมบางชนิด เช่น *Phaeodactylum tricornutum* ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิต EPA ได้ 3 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร และไดโนแฟลกเจลเลตหลายชนิดสามารถผลิต EPA และ DHA ได้ ส่วนแบคทีเรีย *Shewanella putrefaciens* ที่แยกได้จากสาหร่ายทะเลสามารถผลิต EPA ได้ แต่ไม่พบ DHA (วรพจน์, 2541) ขณะที่ยีสต์หลายสกุลเช่น *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Lipomyces* และ *Rhodotorula* เป็นแหล่งผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดไลโนเลนิกและกรดไลโนเลนิก (Bowles *et al.*, 1999) ต่อมาจุลินทรีย์ทะเลในกลุ่ม Thraustochytrids ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 โดยเฉพาะ EPA และ DHA ในปริมาณสูง ซึ่งมีปริมาณ DHA สูงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด เช่น *Thraustochytrium aureum* สายพันธุ์ ATCC 34304 และ *T. aureum* สายพันธุ์ ATCC 28211

สามารถผลิต DHA สูงถึง 47.4 และ 52.3 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (Bajpai *et al.*, 1991a, 1991b; Bowles *et al.*, 1999) และ *Schizochytrium mangrovei* สายพันธุ์ KF5 และ KF6 มีปริมาณ DHA เท่ากับ 41.1 และ 40.5 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (Fan *et al.*, 2001) จะเห็นได้ว่า Thraustochytrids สามารถผลิต DHA ได้ในปริมาณสูง ไม่ก่อให้เกิดปัญหา เช่นเดียวกับน้ำมันปลาและราคาถูกกว่าน้ำมันปลา จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการสกัดโอเมก้า-3 จากจุลินทรีย์ทะเลกลุ่ม Thraustochytrids

10.3 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates)

สัตว์น้ำได้รับพลังงานจากโปรตีนและไขมันมากกว่าจากคาร์โบไฮเดรต แต่คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานที่มีราคาถูกที่สุด เป็นต้นกำเนิดของสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น กรดนิวคลีอิก และกรดอะมิโน รวมทั้งช่วยสำรองโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตและช่วยเพิ่มความต้านทานน้ำหนักร่างกายของสัตว์น้ำด้วยเหตุนี้สัตว์น้ำจึงควรมีคาร์โบไฮเดรตที่มีประโยชน์อยู่ด้วย (เวียง, 2543) ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตในอาหารนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ ปลากินพืชสามารถย่อยแป้งได้ดีกว่าปลากินสัตว์ และปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ กุ้งมีเอนไซม์อะไมเลส (amylases) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี โดยเฉพาะแป้งจากข้าวสาลี (Counsins *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตามความต้องการคาร์โบไฮเดรตในสัตว์น้ำยังขาดรายละเอียดที่ชัดเจนและยังไม่มีเกณฑ์ความต้องการคาร์โบไฮเดรตที่สมบูรณ์ในกุ้ง

10.4 วิตามิน (Vitamins)

วิตามินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่กุ้งต้องการในปริมาณน้อยที่สภาวะการเจริญเติบโตและการพัฒนาการปกติ วิตามินแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ วิตามินที่ละลายในน้ำและวิตามินที่ละลายในไขมัน วิตามิน B-Complex เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำและต้องการในปริมาณที่น้อยซึ่งมีหน้าที่หลักคือ เป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมหลายกระบวนการ วิตามินที่ละลายในน้ำที่ต้องการในปริมาณมากและมีหน้าที่มากกว่าเป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) คือ วิตามินซี อินอซิทอล (inositol) และโคลีน (choline) ส่วนวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค ซึ่งในอาหารกุ้งจะกลายเป็นวิตามินรวม ความต้องการวิตามินในกุ้งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ขนาด อายุ อัตราการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม การขาดวิตามินจะแสดงออกมาในลักษณะของอาการต่างๆ เช่น ตาบอด ว่ายน้ำผิดปกติ

เจริญเติบโตช้า กุ้งที่ขาดวิตามินซีจะก่อให้เกิดโรค black death ซึ่งกุ้งจะเป็นแผลสีดำบริเวณใต้เปลือกตามลำตัวและเหงือก (Magarelli *et al.*, 1979)

10.5 แร่ธาตุ (Minerals)

แร่ธาตุเป็นสารอนินทรีย์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมหลายกระบวนการ แร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณมากเรียกว่า major minerals ซึ่งประกอบด้วย แคลเซียม(calcium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) แมกนีเซียม (magnesium) โซเดียม (sodium) โพแทสเซียม (potassium) คลอไรด์ (chloride) และซัลเฟอร์ (sulfur) แคลเซียมจำเป็นต่อการสร้างโครงสร้างภายนอก การหดตัวของกล้ามเนื้อและกระบวนการปรับสมดุลของน้ำในร่างกายกุ้ง ซึ่งกุ้งสามารถดูดซึมแคลเซียมได้โดยตรงจากน้ำ กุ้งที่เลี้ยงด้วยความเค็มปกติจึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มแคลเซียมลงในอาหาร แต่กุ้งที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำควรใส่แคลเซียม 2.5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดในเซลล์สมองและประสาท เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ ฟอสฟอรัสในน้ำในรูปแบบที่สัตว์น้ำสามารถใช้ประโยชน์ได้มีปริมาณจำกัดโดยทั่วไปมีปริมาณต่ำกว่า 0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) สัตว์น้ำจึงต้องการฟอสฟอรัสจากอาหารเป็นหลัก (เวียง, 2543) แร่ธาตุบางชนิดที่จำเป็นแต่ต้องการในปริมาณน้อยเรียกว่า trace minerals ซึ่งประกอบด้วย เหล็ก (iron) ไอโอดีน (iodine) แมงกานีส (manganese) ทองแดง (copper) โคบอลต์ (cobalt) สังกะสี (zinc) ซีลีเนียม (selenium) โมลิบดีนัม (molybdenum) ฟลูออรีน (fluorine) อลูมิเนียม (aluminum) นิกเกิล (nickel) วานาเดียม (vanadium) ซิลิคอน (silicon) ดีบุก (tin) และ โครเมียม (chromium)

11. บทบาทของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อสัตว์น้ำ

สุชีวัฒน์ และคณะ (2539) ศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาร์วา 1 ที่ได้รับอาหารเสริมกรดไขมันที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี osmotic stress ที่ความเค็ม 3 ระดับ คือ 10 และ 25 พีพีที เปรียบเทียบกับความเค็มปกติ 30 พีพีที และทดสอบ chemical stress ด้วยฟอร์มาลิน 100 พีพีเอ็ม โดยให้อาร์ทีเมียเสริมอาหารที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ อาหารเหลวสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยกรดไขมันดีเอชเอและกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (nutria-pack) และน้ำรำ เปรียบเทียบกับอาร์ทีเมียที่ไม่มีการเสริมอาหารเป็นชุดควบคุม จากการศึกษพบว่า ความยาวของลูกกุ้งชุดควบคุมมีค่าน้อยกว่า แต่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่าลูกกุ้งที่กินอาร์ทีเมียเสริมอาหารทั้งสองชนิด

ลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม nutri – pack มีอัตราการรอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริมรำมีอัตราการรอด 93.54 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมมีอัตราการรอด 88.46 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบความแข็งแรง (stress test) ของลูกกุ้งด้วยฟอร์มาลิน 100 พีพีเอ็ม และความเค็ม 2 ระดับ คือ 10 และ 25 พีพีที ในเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม nutri – pack มีจำนวนลูกกุ้งที่อ่อนแอและตายน้อยกว่าลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริมรำและลูกกุ้งในชุดควบคุม จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า ปริมาณของกรดไขมัน n-3 HUFA สามารถเพิ่มความต้านทานของลูกกุ้งต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้

ทาริกา (2543) ศึกษาผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ω -3HUFA ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ โดยใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสม HUFA ในอัตรา 5 และ 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาร์วา 15 เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เสริม HUFA ในถังจุน้ำ 700 ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า การเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกกุ้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าอาหารเสริม HUFA 10 มิลลิลิตร ให้น้ำหนักและอัตราการรอดของกุ้งดีกว่าอาหารเสริม HUFA 5 มิลลิลิตร และอาหารที่ไม่เสริม HUFA ตามลำดับ เมื่อนำอาหารที่เสริม HUFA 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มาเลี้ยงกุ้งในบ่อดินเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เสริม HUFA เป็นเวลา 120 วัน ปรากฏว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม HUFA มีการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และให้ผลผลิตสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่เสริม HUFA แต่จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปปริมาณที่เหมาะสมของ HUFA ที่ใช้เสริมในอาหารได้

Leger and Sorgeloose (1992) รายงานว่า อาหารที่ลูกกุ้งวัยอ่อนได้รับจากโรงเพาะฟักมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว n-3 HUFA น้อย ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัว n-3 HUFA เป็นกรดไขมันที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) การรักษาสมดุลของน้ำและเกลือในร่างกาย (osmoregulation) การสังเคราะห์ prostaglandin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ เช่น การหดและขยายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ การขยายตัวของเส้นเลือด และการควบคุมการทำงานของระบบ osmoregulation นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ดีขึ้น

Rees *et al.* (1994) ศึกษาปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (highly unsaturated fatty acid; HUFA) ที่จำเป็นสำหรับกุ้งกุลาดำ โดยการเสริม HUFA ให้อาร์ทีเมียในอัตรา 100, 200, 300

และ 400 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนนำไปอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาาร์ว่า 5 จนถึงระยะโพสลาาร์ว่า 15 ปรากฏว่าปริมาณ HUFA ในอาร์ทีเมียเพิ่มขึ้นจาก 2.65 มิลลิกรัมต่อกรัม (น้ำหนักแห้ง) เป็น 5.30, 12.55, 22.35 และ 31.20 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ กุ้งที่เลี้ยงด้วย อาร์ทีเมียเสริม HUFA 100 ส่วนในล้าน ส่วน มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 200 ส่วนในล้านส่วน แต่เติบโตดีกว่ากลุ่มอื่น กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 200 ส่วนในล้านส่วน มีอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 100 ส่วนในล้าน ส่วน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 300 ส่วนในล้านส่วน มีอัตราการรอดสูงแต่เติบโตช้า และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 400 ส่วนในล้านส่วน เติบโตช้าและอัตราการรอดตายต่ำ จากผลการศึกษาดูพบว่า กุ้งเจริญเติบโตดีและมีอัตราการรอดสูงเมื่อเลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียเสริม HUFA 200 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งมีปริมาณ HUFA 12.55 มิลลิกรัมต่อกรัม

Suwanich *et al.* (1996) ทำการศึกษาผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (HUFA) และอัตราส่วนระหว่าง EPA และ DHA ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาาร์ว่า 20 โดยใช้อาหารเสริมกรดไขมันที่มีปริมาณกรดไขมัน 2 ระดับ คือ 1 เปอร์เซ็นต์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ละระดับมีอัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 1:1, 1:2 และ 1:3 ส่วนอาหารกลุ่มควบคุมมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว 0.35 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 1:3 ผลการศึกษพบว่า ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวและอัตราส่วนของ EPA/DHA ไม่มีผลต่ออัตราการรอดแต่มีผลต่อการเจริญเติบโตและความทนทานต่อแรงดันออสโมติก อาหารที่ช่วยให้กุ้งเติบโตดีมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว 1 เปอร์เซ็นต์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 1:1 และ 1:2 ส่วนอาหารที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว 1 เปอร์เซ็นต์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 1:2 และ 1:3 ช่วยเพิ่มความทนทานต่อแรงดันออสโมติก ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมต่อกุ้งระยะโพสลาาร์ว่า 20 ในด้านการเติบโตและเพิ่มความทนทานต่อแรงดันออสโมติกคืออาหารที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว 1 เปอร์เซ็นต์ และ มีอัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 1:2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของอาหารที่เสริมด้วย *Schizochytrium* sp. และ ARA ต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ

1.1 วางแผนการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design)

เลี้ยงลูกกุ้งด้วยน้ำความเค็มปกติ 25 พีพีที มี 8 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (replication)

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 9 มาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วัน นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตรในน้ำความเค็ม 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น. มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 3 วัน เมื่อกุ้งได้ระยะโพสลาร์วา 12 คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกันแล้วนำมาชั่งน้ำหนักก่อนการทดลอง นำกุ้งขาวแวนนาไม มาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร ด้วยน้ำความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 200 ลิตร จำนวน 24 ถัง และ ใส่กุ้งจำนวนถึงละ 50 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 10 วัน

1.3 การให้อาหาร

ให้อาหารวันละ 4 ครั้งที่เวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น. ปรับอาหารตามน้ำหนักของกุ้งตามวิธีของชลอและพรเลิศ (2547) ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 70 วัน โดยในแต่ละชุดการทดลองจะให้อาหารสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นโดยบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารจำกัดโดยใช้วัตถุดิบดังแสดงในตารางที่ตารางที่ 6 โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง A ไม่มีการเสริมด้วย *Schizochytrium* sp. ในขณะที่กลุ่มทดลอง B และ C มีการเสริมด้วย *Schizochytrium* sp. ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า AG-GOLD กลุ่มทดลอง D และ E มีการเสริมด้วย ARA ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า

AG-ARA ส่วนในกลุ่ม F และ G มีการเสริมด้วย *Schizochytrium* sp. และ ARA โดยผลิตภัณฑ์จาก *Schizochytrium* sp. และ ARA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Advanced Bio Nutrition จำกัด มลรัฐแมริแลนด์ (Maryland) ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 6 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง

| วัตถุดิบ | กลุ่มควบคุม | A | B | C | D | E | F | G |
|----------------------|-------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| กากถั่วเหลือง 48% CP | 15 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| รำข้าวสาคู | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| โปรตีนข้าวโพด | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| แป้งสาลี | 26.6 | 18.8 | 18.3 | 18.55 | 18.55 | 18.68 | 18.18 | 18.49 |
| น้ำมันถั่วเหลือง | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| น้ำมันปลา | 1.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dicalcium phosphate | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| น้ำนึ่งปลา | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| เลซิติน | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| โปรตีนแป้งสาลี | 4 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| แร่ธาตุ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| วิตามิน | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| ปลาป่น 60% CP | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Choline chloride 75% | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| AG-GOLD | 0 | 0 | 0.5 | 0.25 | 0 | 0 | 0.5 | 0.25 |
| AG-ARA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.25 | 0.12 | 0.12 | 0.06 |
| รวม | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

1.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำในระหว่างการเลี้ยง

ในระหว่างทำการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์โดยค่าพารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้

1. วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง YSIDO200-4M
2. วัดพีเอชของน้ำโดยใช้ pH meter ORION Model Sa520
3. วัดความเค็มโดย Salinometer
4. แอมโมเนียรวม (total ammonia nitrogen: TAN) ใช้วิธี phenol-hypochloride ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)
5. ไนไตรท์ (nitrite -nitrogen) ใช้วิธี Colorimetric Method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)
6. ความกระด้างรวม (total hardness) ใช้วิธี Titration Method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)
7. ความเป็นด่างรวม (total alkalinity) ใช้วิธี Titration Method ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995)

1.5 การศึกษาการเจริญเติบโตและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นับจำนวนกุ้งที่เหลือในถังทดลองทุก 10 วัน นำข้อมูลมาคำนวณอัตราการรอดตาย เมื่อครบ 70 วันชั่งน้ำหนักกุ้งในถังทดลองโดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอล เพื่อหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกุ้งแต่ละตัว นำข้อมูลมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโต วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

2. ศึกษาผลของอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ต่อลักษณะภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi*

2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยมี 8 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน

การทดลองส่วนที่ 1 ใช้สำหรับการศึกษาทางด้านตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ที่ระดับต่างๆ กัน ในระยะเวลา 70 วัน

การทดลองส่วนที่ 2 ใช้กุ้งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยง 70 วันมาทดสอบ ทำให้ติดเชื้อ *V. harveyi* โดยจะทำการศึกษาถึงอัตราการรอดตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองต่างๆ ที่มีการให้อาหาร *Schizochytrium* sp. และ ARA ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง การให้อาหาร และการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

การเตรียมกุ้งขาวแวนนาไมการให้อาหารและการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองส่วนที่ 1 ใช้สำหรับการศึกษาทางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหาร *Schizochytrium* sp. และ ARA ที่ระดับต่างๆ กัน ในระยะเวลา 70 วัน

การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลอง สุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 3 ตัว หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 70 วัน โดยระหว่างที่ทำการทดลองมีการให้อาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA โดยดูดเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของ

เม็ดเลือดกึ่ง (phagocytic activity) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activating system) และ การผลิต superoxide dismutase โดยระบบภูมิคุ้มกันที่ทำการศึกษามี ดังนี้

1. การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกึ่ง

1.1 คูดเลือดกึ่งจากแองเลือด โดยในหลอดชนิดยابرจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

1.2 ใช้ micropipette คูดสารละลายเลือดกึ่งจำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

1.3 คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็น จำนวนเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยหาค่าได้จาก

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

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือด} / \text{ลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้}$$

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือด} / \text{ลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \times 10^4 \times \text{ค่า dilution}$$

2. กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งตามวิธีของ กิจการ และคณะ (2543 ฉ)

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

2.2 เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่เป็น colony เดี่ยวละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอ สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้นๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08 - 0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้ สำหรับการศึกษานี้วัดค่า OD ได้ 0.1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.6×10^6 CFU/มิลลิลิตร

2.3 เจาะเลือดจากแองเงเลือดกึ่ง โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกึ่ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดนิตยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2.4 นำมาแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดกึ่ง โดยหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm. นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสด้านบนมาใช้

2.5 นำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางใน ระดับ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

2.6 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2 มาเติมในหลอดทดลองที่ทำการเจือจาง ซีรัม ในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว ทำการเติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่ม ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.7 นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละ หลอด โดยใช้ น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าของการเจือจาง ซีรัม ที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรรวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

3. กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง โดยมีวิธีการ ดังต่อไปนี้ ตามวิธีของ Itami *et al.* (1994)

3.1 เจาะเลือดจากกึ่งจากแองเงเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (anticoagulant : เลือดกึ่ง) 2:1 โดยดูดเลือดกึ่ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดนิตยาที่มีสารป้องกันการ แข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อ แยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

3.3 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

3.4 ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และ ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

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

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

3.7 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.8 หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.9 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

3.10 หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

3.11 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

3.12 ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที

3.13 ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

3.14 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

3.15 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

3.16 ปิดสไลด์ด้วย permout

นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยทำการสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป จำนวนค่าได้จาก

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

4. กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกึ่งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของ กิจการและคณะ (2543 จ)

4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแองเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

4.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm. เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลาย K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4

4.4 ทำให้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

4.5 นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.6 แยกส่วนใสด้านบนซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase โดยดัดแปลงจากวิธีการที่รายงานของ Söderhäll and Hall (1984)

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

2. เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารป้องกันเลือดแข็งตัวสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับทริปซิน L-dihydroxyphenylalanine และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

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

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta \text{OD}_{490} / \text{นาที} / \text{มิลลิกรัม โปรตีน}$$

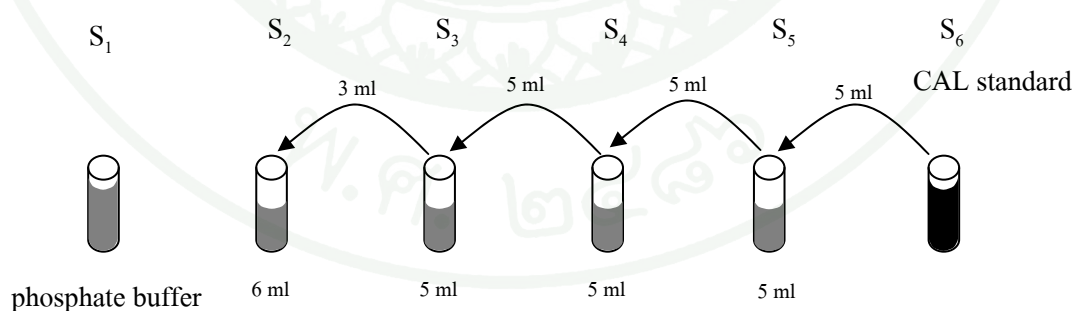
5. การศึกษาการผลิต superoxide dismutase

ศึกษาโดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD[®] Superoxide dismutase

ทำการเตรียมชุดมาตรฐาน โดยใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

5.1 เตรียมสารมาตรฐาน S1-S6 จากสารละลาย CAL standard และ สารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 3

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



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD[®] superoxide dismutase

ที่มา: ชยพร (2552)

วิธีการหาปริมาณ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร
2. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ
4. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง (ทำซ้ำข้อ 3-4) นำสารละลายละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง
6. ละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
7. นำสารละลายเม็ดเลือดที่เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R2 250 ไมโครลิตร
8. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A2 ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank
9. นำค่า A1 และ A2 ที่ได้มาคำนวณหาค่า เปอร์เซ็นต์ inhibition โดยคำนวณหาว่า
ดังนี้

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

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

10. นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของสารมาตรฐาน S1-S6 มาสร้างกราฟ log ฐาน 10 เพื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของตัวอย่างเลือดกึ่งมาหาค่าปริมาณ superoxide dismutase ในหน่วย superoxide dismutase units ต่อมิลลิลิตร (SOD units/ml)

การทดลองส่วนที่ 2 ใช้กึ่งจากการทดลองที่ 1 เมื่อสิ้นสุดจากการเลี้ยง 70 วันมาทดสอบทำให้ติดเชื้อ *V. harveyi* โดยจะทำการศึกษาถึงอัตราการรอดตายของกึ่งในแต่ละชุดการทดลองต่างๆ 8 ชุดการทดลองที่มีการให้อาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน

ทำการทดลองดังนี้

1. ปรับสภาพกึ่งที่จะใช้ในการทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกเป็นเวลา 3 วัน เลี้ยงกึ่งทดลองชุดการทดลองละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยการใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อาหารตลอดเวลา ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

2. ทำให้กึ่งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กึ่งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ได้ 0.034 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.0×10^6 CFU/มิลลิลิตร

3. ฉีดสารละลายเชื้อในกึ่งชุดการทดลองทุกตัว โดยฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุมซึ่งใส่กึ่งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ จำนวน 1 ตู้ ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณและตำแหน่งที่ฉีดเท่ากับชุดการทดลองอื่นๆ (เพื่อเปรียบเทียบระหว่างทำการทดลองว่ากึ่งในชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการฉีด) ไม่มีการให้อาหารแก่กึ่งในชุดการทดลองหลังจากการฉีดเชื้อ

4. จดบันทึกการตายของกึ่งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน และเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกึ่งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar เพื่อเป็นการยืนยันว่ากึ่งที่แสดงอาการป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

5. นำตัวอย่างกึ่งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ตรวจสอบยืนยันผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ โดยการเก็บตัวอย่างกึ่งมาตรึงด้วยน้ำยา Davidson's fixative โดยฉีดน้ำยาเข้าบริเวณ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ แช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative ที่มีปริมาตรประมาณ 10 เท่าของตัวอย่างกึ่ง

นานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bell and Lightner (1988)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่มีการให้อาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 8 ชุด ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase การผลิต superoxide dismutase และการรอดตายของกุ้งเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2551 – กันยายน 2552

แหล่งทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท Advanced BioNutrition จำกัด



ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของอาหารเสริม *Schizochytrium* sp. และ ARA ต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้ง ขาวแวนนาในระยะเวลาโพสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วันพบว่า กุ้งในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด (7.67 ± 0.07 กรัม) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มการทดลอง A, B, C, D, E, F และ G ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 7.51 ± 0.06 , 7.54 ± 0.05 , 7.58 ± 0.05 , 7.57 ± 0.07 , 7.57 ± 0.05 , 7.60 ± 0.06 และ 7.64 ± 0.05 กรัมตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งต่ำที่สุด (7.51 ± 0.06 กรัม) (ตารางที่ 7)

อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในการศึกษาครั้งนี้อยู่ที่ 83 ถึง 91 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร E ซึ่งได้รับอาหารเสริม ARA ในอัตรา 0.12 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงสุด (90.67 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งในการทดลอง A, B, C, D, F, G และ กลุ่มควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 83.33 ± 3.06 , 85.33 ± 1.15 , 86.67 ± 1.15 , 88.67 ± 3.06 , 88.67 ± 2.31 , 88.67 ± 3.06 และ 84.00 ± 2.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีอัตราการรอดตายของกุ้งต่ำที่สุด (83.33 ± 3.06 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) |
|---------------|----------------------|
| กลุ่มควบคุม | 7.67 ± 0.07^a |
| A | 7.51 ± 0.06^a |
| B | 7.54 ± 0.05^a |
| C | 7.58 ± 0.05^a |
| D | 7.57 ± 0.07^a |
| E | 7.57 ± 0.05^a |
| F | 7.60 ± 0.06^a |
| G | 7.64 ± 0.05^a |

ตารางที่ 8 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) |
|---------------|------------------------------|
| กลุ่มควบคุม | 84.00 ± 2.00^a |
| A | 83.33 ± 3.06^a |
| B | 85.33 ± 1.15^a |
| C | 86.67 ± 1.15^a |
| D | 88.67 ± 3.06^a |
| E | 90.67 ± 2.31^a |
| F | 88.67 ± 2.31^a |
| G | 88.67 ± 3.06^a |

1.2 การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ได้ผลการทดลองดังนี้

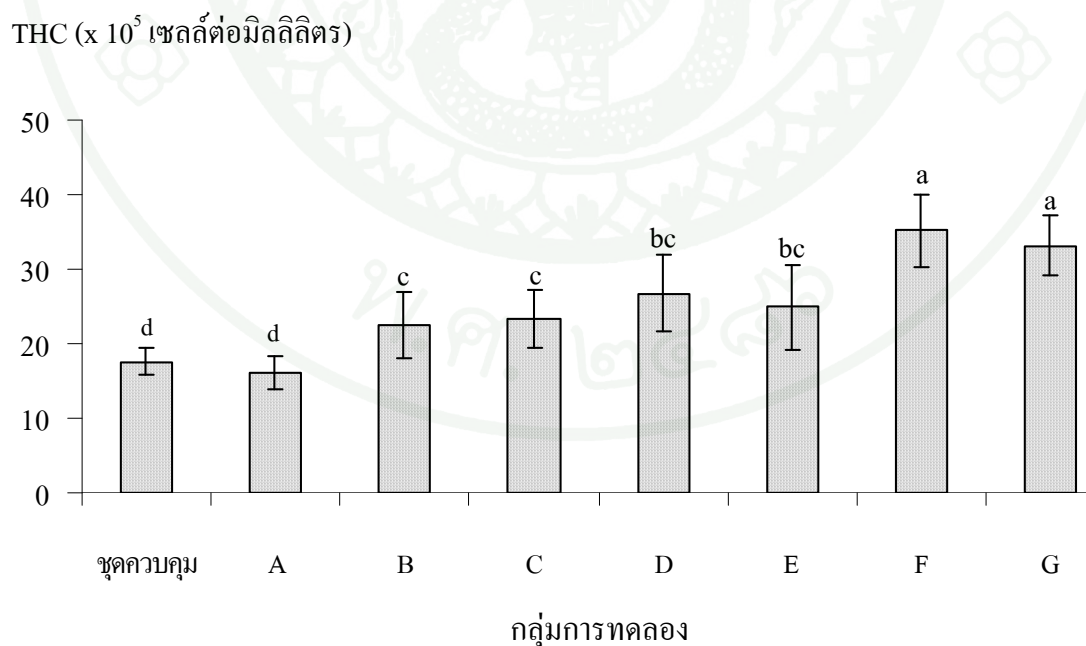
1) การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง

หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งสูงที่สุด ($35.22 \pm 4.82 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ $33.19 \pm 3.91 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ 16.16 ± 2.26 , 22.44 ± 4.42 , 23.25 ± 3.88 , 26.80 ± 5.25 , 24.89 ± 5.79 และ $17.63 \pm 1.18 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งต่ำที่สุด ($16.16 \pm 2.26 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุม ($17.63 \pm 1.18 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งใช้อาหารกุ้งสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (ตารางที่ 9 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | THC ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) |
|---------------|--|
| กลุ่มควบคุม | 17.63 ± 1.18^d |
| A | 16.16 ± 2.26^d |
| B | 22.44 ± 4.42^c |
| C | 23.25 ± 3.88^c |
| D | 26.80 ± 5.25^{bc} |
| E | 24.89 ± 5.79^{bc} |
| F | 35.22 ± 4.82^a |
| G | 33.19 ± 3.91^a |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

2) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง

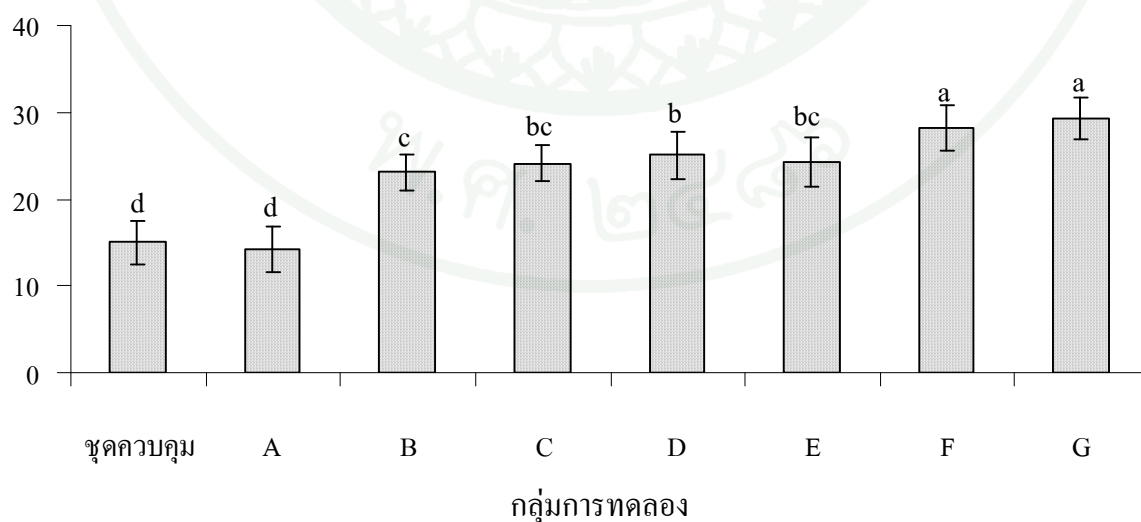
หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่ากึ่งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด (29.33 ± 2.41) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งที่ได้รับอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 28.17 ± 2.70 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 14.17 ± 2.57 , 23.08 ± 2.12 , 23.50 ± 2.30 , 25.08 ± 2.70 , 24.25 ± 2.79 และ 15.00 ± 2.50 ตามลำดับ ในขณะที่กึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทน โปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมต่ำที่สุด (14.17 ± 2.57) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งในกลุ่มควบคุม (15.00 ± 2.50) ซึ่งใช้อาหารกึ่งสำเร็จรูปสำหรับกึ่งขาวแวนนาไม (ตารางที่ 10 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 10 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | ร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม |
|---------------|---|
| กลุ่มควบคุม | 15.00 ± 2.50 ^d |
| A | 14.17 ± 2.57 ^d |
| B | 23.08 ± 2.12 ^c |
| C | 23.50 ± 2.30 ^{bc} |
| D | 25.08 ± 2.70 ^b |
| E | 24.25 ± 2.79 ^{bc} |
| F | 28.17 ± 2.70 ^a |
| G | 29.33 ± 2.41 ^a |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกิน
สิ่งแปลกปลอมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม



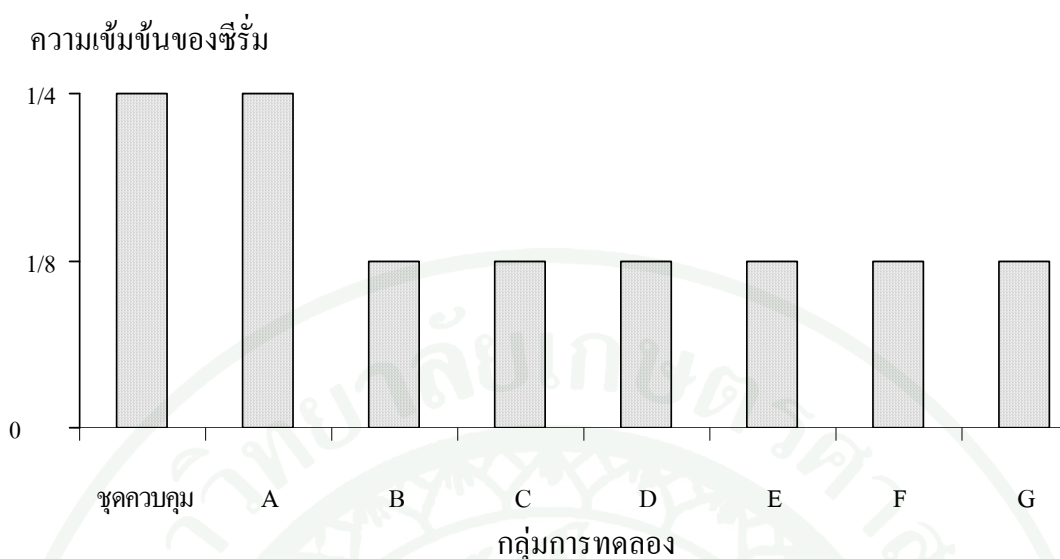
ภาพที่ 5 ร้อยละของเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

3) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง

หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร B, C, D, E, F และ G มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1 : 8 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร A ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 : 4 (ตารางที่ 11 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง |
|---------------|---|
| กลุ่มควบคุม | 1:4 |
| A | 1:4 |
| B | 1:8 |
| C | 1:8 |
| D | 1:8 |
| E | 1:8 |
| F | 1:8 |
| G | 1:8 |



ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกัน ทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

4) กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase

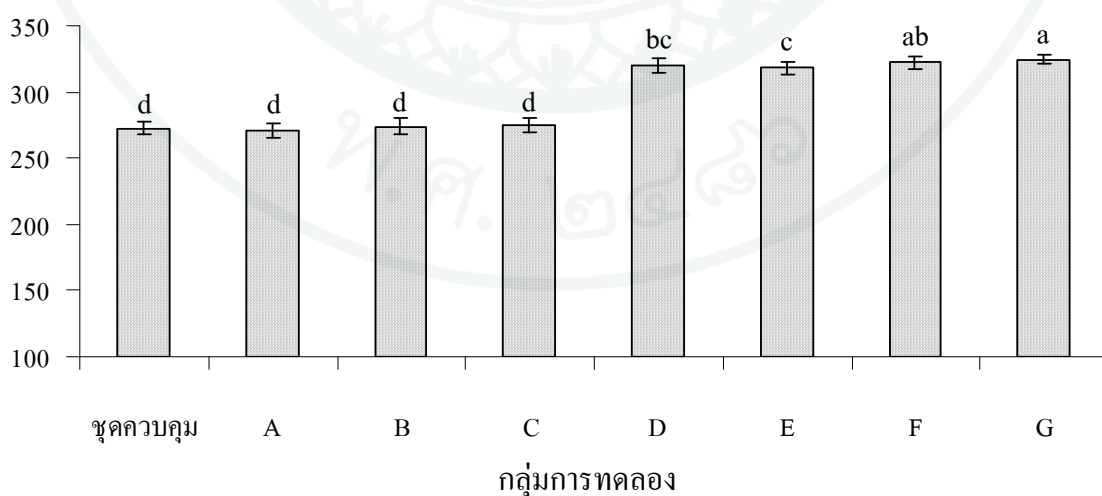
หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase สูงที่สุด (324.51 ± 3.43 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 322.21 ± 5.15 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 271.29 ± 5.50 , 274.00 ± 6.01 , 274.49 ± 5.63 , 320.30 ± 5.18 , 318.11 ± 5.02 และ 272.77 ± 5.37 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำที่สุด (271.29 ± 5.50 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุม (272.77 ± 5.37 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน) ซึ่งใช้อาหารกุ้งสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (ตารางที่ 12 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มี ส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | Phenoloxidase activity หน่วย/นาที่/มิลลิกรัม โปรตีน |
|---------------|--|
| กลุ่มควบคุม | 272.77 ± 5.37 ^d |
| A | 271.29 ± 5.50 ^d |
| B | 274.00 ± 6.01 ^d |
| C | 274.49 ± 5.63 ^d |
| D | 320.30 ± 5.18 ^{bc} |
| E | 318.11 ± 5.02 ^c |
| F | 322.21 ± 5.15 ^{ab} |
| G | 324.51 ± 3.43 ^a |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase
(หน่วย/นาที่/มิลลิกรัม โปรตีน)



ภาพที่ 7 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มี ส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

5) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

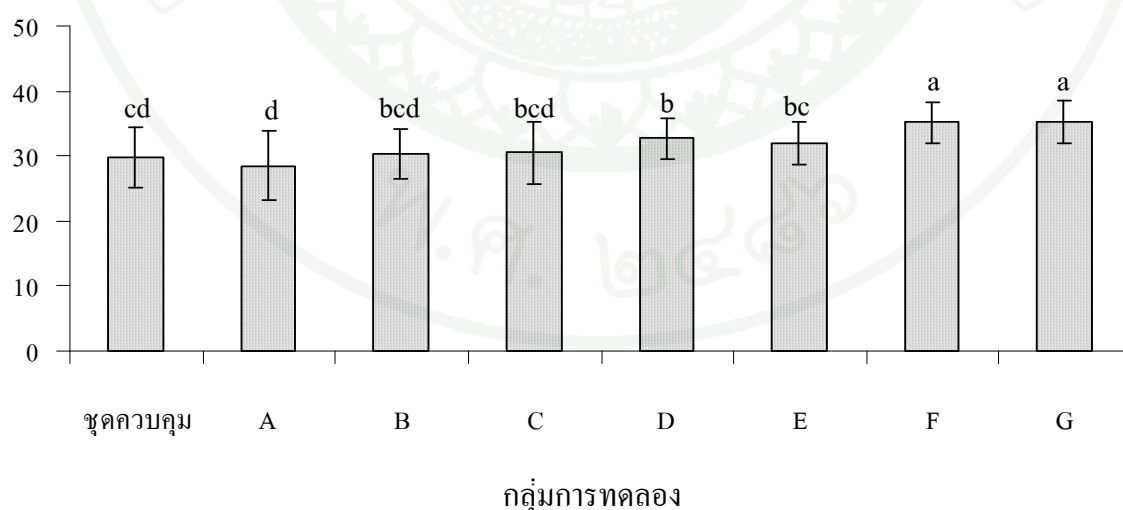
หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่ากึ่งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase สูงที่สุด (35.22 ± 3.20 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งที่ได้รับอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 35.13 ± 3.08 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 28.54 ± 5.45 , 30.35 ± 3.87 , 30.54 ± 4.82 , 32.71 ± 3.21 , 31.95 ± 3.17 และ 29.70 ± 4.59 หน่วย SOD/ มิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่กึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ต่ำที่สุด (28.54 ± 5.45 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งในกลุ่มควบคุม (29.70 ± 4.59 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) ซึ่งใช้อาหารกึ่งสำเร็จรูปสำหรับกึ่งขาวแวนนาไม (ตารางที่ 13 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 13 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| กลุ่มการทดลอง | หน่วย SOD/ มิลลิลิตร |
| กลุ่มควบคุม | 29.70 ± 4.59 ^{cd} |
| A | 28.54 ± 5.45 ^d |
| B | 30.35 ± 3.87 ^{bcd} |
| C | 30.54 ± 4.82 ^{bcd} |
| D | 32.71 ± 3.21 ^b |
| E | 31.95 ± 3.17 ^{bc} |
| F | 35.13 ± 3.08 ^a |
| G | 35.22 ± 3.20 ^a |

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 8 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

6) การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

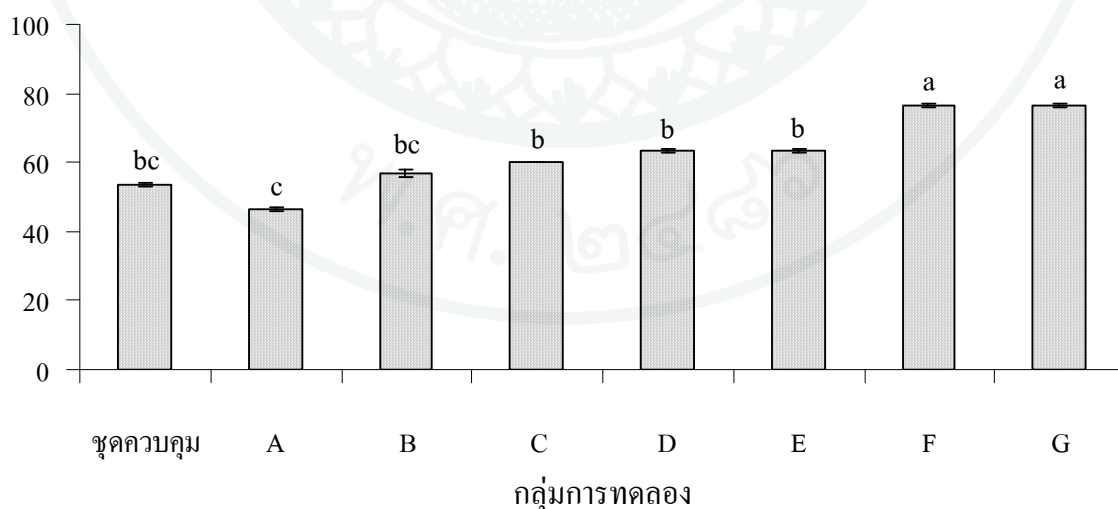
หลังจากให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร แก่กุ้งขาวแวนนาไม่เป็นระยะเวลา 70 วัน นำกุ้งทั้งหมดมาฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้ากล้ามเนื้อปล้องที่ 2 ของตัวกุ้งในอัตราตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละกลุ่มการทดลองซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไม่ตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 4.0×10^6 CFU/ มิลลิลิตร บันทึกอัตราการรอดตายเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของอัตราการรอดตายสูงที่สุดเท่ากันที่ 76.67 ± 0.58 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีร้อยละของอัตราการรอดตายเท่ากับ 46.67 ± 0.58 , 56.67 ± 1.15 , 60.00 ± 0.00 , 63.33 ± 0.58 , 63.33 ± 0.58 และ 53.33 ± 0.58 ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีร้อยละของอัตราการรอดตายต่ำที่สุด (46.67 ± 0.58) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุม (53.33 ± 0.58) ซึ่งใช้อาหารกุ้งสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม่ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 14 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 4.0×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| กลุ่มการทดลอง | ร้อยละของอัตราการรอดตาย |
|---------------|-------------------------|
| กลุ่มควบคุม | 53.33 ± 0.58^{bc} |
| A | 46.67 ± 0.58^c |
| B | 56.67 ± 1.15^{bc} |
| C | 60.00 ± 0.00^b |
| D | 63.33 ± 0.58^b |
| E | 63.33 ± 0.58^b |
| F | 76.67 ± 0.58^a |
| G | 76.67 ± 0.58^a |

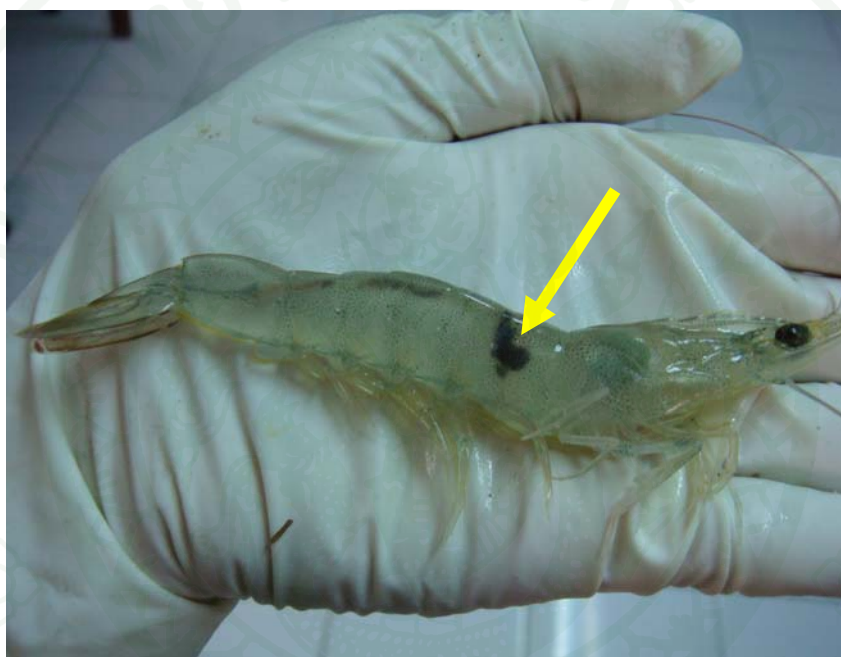
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ร้อยละของอัตราการรอดตาย

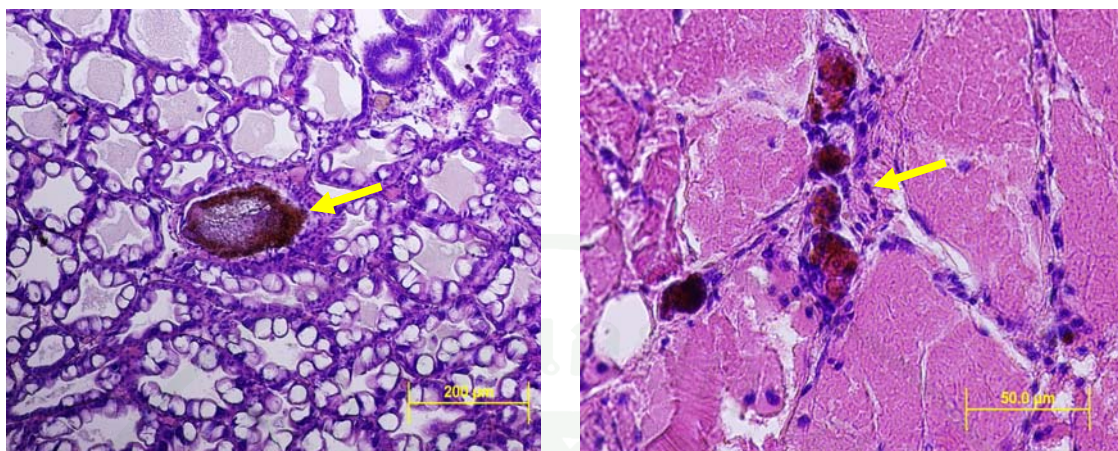


ภาพที่ 9 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 4.0×10^6 CFU/ มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

การศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* กุ้งจะเริ่มแสดงอาการป่วยเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกุ้งป่วยมีสีเข้มขึ้นกว่าปกติ และไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ ไม่ว่ายน้ำ และตายในที่สุด โดยจะสังเกตเห็นการเกิด melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไป (ภาพที่ 10) และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อที่เกิด melanin สีดำแทรกอยู่มาศึกษาทางด้านพยาธิสภาพ พบการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดล้อมรอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 ลักษณะของเม็ดสี melanin ที่ล้อมรอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริเวณที่ลูกศรชี้เกิดที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวปล้องที่ 2



(ก)

(ข)

ภาพที่ 11 บริเวณที่ถูกครีซี คือ เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดกระบวนการ melanization ภาพ (ก) เนื้อเยื่อบริเวณ hepatopancreas (H&E, bar = 200 µm)
ภาพ (ข) เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อ (H&E, bar = 50 µm)

ระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 70 วัน มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 31 ± 1 องศาเซลเซียส โดยใช้ heater รักษาระดับพีเอชของน้ำที่ 7.5 – 8.2 และความเค็มของน้ำประมาณ 25 พีพีที ผลการศึกษาการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำแสดงไว้ในตารางที่ 15 โดยทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทุกสัปดาห์ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ความเค็ม ค่าความเป็นด่างรวม ความกระด้าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ พบว่าคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในทุกกลุ่มการทดลองอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ และ พรเลิศ 2547)

ตารางที่ 15 แสดงคุณสมบัติของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกุ้งขาวแวนนาไม
ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน

| คุณสมบัติของน้ำ | ชุดการทดลอง | | | |
|--------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | กลุ่มควบคุม | | A | |
| | พิสัย | ค่าเฉลี่ย | พิสัย | ค่าเฉลี่ย |
| อุณหภูมิน้ำ | | | | |
| เช้า | 30.10-30.97 | 30.52±0.22 | 30.17-30.93 | 30.54±0.23 |
| (องศาเซลเซียส) | | | | |
| บ่าย | 31.30-32.10 | 31.68±0.22 | 31.30-32.10 | 31.65±0.20 |
| พีเอช | | | | |
| เช้า | 7.50-7.90 | 7.69±0.12 | 7.50-7.90 | 7.69±0.11 |
| บ่าย | 7.80-8.10 | 7.97±0.10 | 7.70-8.20 | 7.96±0.13 |
| ออกซิเจนละลายน้ำ | | | | |
| เช้า | 7.00-10.50 | 8.68±0.76 | 7.00-9.70 | 8.52±0.77 |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
| บ่าย | 7.00-10.50 | 8.68±0.75 | 7.00-9.70 | 8.52±0.77 |
| ความเค็ม (พีพีที) | 24.50-25.60 | 25.09±0.22 | 24.20-25.70 | 25.06±0.41 |
| ความเป็นด่างรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 112.00-136.00 | 119.52±4.98 | 114.00-130.00 | 119.64±3.95 |
| ความกระด้างรวม | | | | |
| | 5,376.00- | | 5,412.00- | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 5676.00 | 5,568.00±90.32 | 5708.00 | 5,567.64±88.48 |
| แอมโมเนียรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0.30-0.80 | 0.52±0.10 | 0.27-0.80 | 0.55±0.17 |
| ไนโตรเจน | 0.01-0.05 | 0.03±0.02 | 0.01-0.05 | 0.03±0.02 |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |

ตารางที่ 15 (ต่อ)

| คุณสมบัติของน้ำ | ชุดการทดลอง | | | |
|--------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| | B | | C | |
| | พิสัย | ค่าเฉลี่ย | พิสัย | ค่าเฉลี่ย |
| อุณหภูมิน้ำ | | | | |
| เช้า | 30.20-30.97 | 30.56±0.24 | 30.20-32.30 | 30.54±0.38 |
| (องศาเซลเซียส) | | | | |
| บ่าย | 31.20-32.00 | 31.65±0.20 | 31.20-31.90 | 31.64±0.19 |
| พีเอช | | | | |
| เช้า | 7.50-7.80 | 7.68±0.07 | 7.50-7.90 | 7.70±0.08 |
| บ่าย | 7.80-8.10 | 7.96±0.07 | 7.80-8.10 | 7.96±0.07 |
| ออกซิเจนละลายน้ำ | | | | |
| เช้า | 6.50-10.50 | 8.65±0.87 | 7.00-10.50 | 8.50±0.79 |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
| บ่าย | 6.50-10.50 | 8.65±0.87 | 7.00-10.50 | 8.50±0.79 |
| ความเค็ม (พีพีที) | 24.50-25.70 | 25.08±0.31 | 24.30-25.70 | 25.08±0.31 |
| ความเป็นค่ารวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 110.00-126.00 | 119.21±3.46 | 112.00-126.00 | 118.61±3.98 |
| ความกระด้างรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 5,376.00-5676.00 | 5,562.30±98.86 | 5,376.00-5676.00 | 5,571.39±79.88 |
| แอมโมเนียรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0.27-0.80 | 0.48±0.16 | 0.27-0.73 | 0.51±0.10 |
| ไนไตรท์ | 0.01-0.09 | 0.03±0.02 | 0.01-0.09 | 0.03±0.02 |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |

ตารางที่ 15 (ต่อ)

| คุณสมบัติของน้ำ | ชุดการทดลอง | | | |
|--------------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| | D | | E | |
| | พิสัย | ค่าเฉลี่ย | พิสัย | ค่าเฉลี่ย |
| อุณหภูมิน้ำ | | | | |
| เช้า | 30.17-30.97 | 30.54±0.21 | 30.17-30.97 | 30.54±0.21 |
| (องศาเซลเซียส) | | | | |
| บ่าย | 31.30-32.10 | 31.67±0.19 | 31.30-32.10 | 31.67±0.19 |
| พีเอช | | | | |
| เช้า | 7.50-7.75 | 7.65±0.07 | 7.50-7.75 | 7.65±0.07 |
| บ่าย | 7.87-8.10 | 7.95±0.06 | 7.87-8.10 | 7.95±0.06 |
| ออกซิเจนละลายน้ำ | | | | |
| เช้า | 7.00-9.60 | 8.49±0.62 | 7.00-9.60 | 8.49±0.62 |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
| บ่าย | 7.00-9.60 | 8.50±0.63 | 7.00-9.60 | 8.50±0.63 |
| ความเค็ม (พีพีที) | 24.50-25.60 | 25.06±0.27 | 24.50-25.60 | 25.06±0.27 |
| ความเป็นด่างรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 114.00-128.00 | 119.39±3.72 | 114.00-128.00 | 119.39±3.72 |
| ความกระด้างรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 5,412.00-5676.00 | 5,561.82±83.69 | 5,412.00-5676.00 | 5,561.82±83.69 |
| แอมโมเนียรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0.27-0.77 | 0.51±0.16 | 0.27-0.77 | 0.51±0.16 |
| ไนไตรท์ | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0.01-0.05 | 0.03±0.01 | 0.01-0.05 | 0.03±0.01 |

ตารางที่ 15 (ต่อ)

| คุณสมบัติของน้ำ | ชุดการทดลอง | | | |
|--------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|
| | F | | G | |
| | พิสัย | ค่าเฉลี่ย | พิสัย | ค่าเฉลี่ย |
| อุณหภูมิน้ำ | | | | |
| เช้า | 30.00-31.00 | 30.49±0.29 | 30.00-30.90 | 30.46±0.26 |
| (องศาเซลเซียส) | | | | |
| บ่าย | 31.30-32.10 | 31.66±0.18 | 31.20-32.70 | 31.66±0.29 |
| พีเอช | | | | |
| เช้า | 7.50-7.90 | 7.69±0.13 | 7.50-7.90 | 7.69±0.11 |
| บ่าย | 7.70-8.10 | 7.95±0.12 | 7.80-8.19 | 7.96±0.09 |
| ออกซิเจนละลายน้ำ | | | | |
| เช้า | 7.00-9.60 | 8.29±0.69 | 7.00-9.50 | 8.34±0.70 |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
| บ่าย | 7.00-9.60 | 8.31±0.69 | 7.00-9.60 | 8.36±0.70 |
| ความเค็ม (พีพีที) | 24.30-25.70 | 25.10±0.27 | 24.30-25.70 | 25.06±0.32 |
| ความเป็นค่าจรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 112.00-128.00 | 119.27±4.41 | 114.00-126.00 | 119.09±3.78 |
| ความกระด้างรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 5,336.00-5676.00 | 5,563.15±103.29 | 5,412.00-5676.00 | 5,573.45±82.19 |
| แอมโมเนียรวม | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0.04-0.77 | 0.53±0.21 | 0.23-0.80 | 0.55±0.17 |
| ไนไตรท์ | | | | |
| (มิลลิกรัมต่อลิตร) | 0.01-0.05 | 0.03±0.01 | 0.01-0.05 | 0.03±0.01 |

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA จะมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายที่ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Patnaik *et al.* (2006) ที่แสดงให้เห็นว่า อาหารที่ใช้โปรตีนจากถั่วเหลือง และไขมันจากสาหร่ายขนาดเล็กซึ่งมี DHA และ ARA (*Schizochytrium* sp. และ *Mortierella* sp.) ในปริมาณสูง เพื่อทดแทนโปรตีนและไขมันจากปลา จะไม่ส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโต และการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมภายใต้สภาพการทดลอง

น้ำมันปลาในอาหารสัตว์น้ำถือเป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันที่จำเป็นเช่น EPA, DHA และ ARA แต่ระดับของกรดไขมันที่จำเป็นในน้ำมันปลาจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ขบวนการในการสกัด และการเก็บรักษา (Harel *et al.*, 2002) โดยน้ำมันปลาที่สกัดได้จากปลาทะเลในกลุ่ม menhaden, anchovy และ herring) ถือเป็นวัตถุดิบชั้นดี มีกรดไขมันจำเป็นที่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์และการพัฒนาของตัวอ่อน แต่ปัจจุบันวัตถุดิบปลาชนิดดังกล่าวมีราคาแพงทำให้มีการใช้ปลาชนิดอื่นซึ่งมีระดับ DHA และสัดส่วนของ DHA/EPA ไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำมาใช้แทน (Harel *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1997; Harel *et al.*, 2000) นอกจากนี้ น้ำมันปลาจะมีปริมาณ ARA ต่ำทั้งๆที่ ARA เป็นกรดไขมันอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญของสัตว์น้ำ (Castell *et al.*, 1994; Koven *et al.*, 2001) กุ้งในกลุ่ม penaeid ต้องการอาหารที่มี linoleic acid , linolenic acid, ARA, EPA และ DHA เพื่อการเจริญเติบโต และกรดไขมันเหล่านี้ส่งผลต่ออัตราการรอดของกุ้งด้วย (Merican and Shim, 1996; Glencross and Smith, 1999) การตรวจสอบองค์ประกอบของ กรดไขมันจำเป็นของกุ้ง penaeids ในธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่า กุ้งในธรรมชาติมีระดับกรดไขมัน ARA ในเนื้อเยื่อกุ้งในระดับสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีการรอดอาหาร แสดงว่า ARA มีความจำเป็นต่อกุ้ง อีกทั้งกุ้งที่ได้รับกรดไขมันที่มี ARA สูง จะมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งที่ได้รับกรดไขมันกลุ่มอื่นๆ (Lilly and Bottino, 1981; O'Leary and Matthews, 1990; Dall *et al.*, 1992)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ *Schizochytrium* sp. เป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็นในอาหาร มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งและการต่อต้านเชื้อ *V. harveyi* โดยกุ้งในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของ ARA หรือ DHA และ ARA จะให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สูงกว่าและมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ ARA จะส่งผลต่ออัตราการรอดตายของกุ้ง โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง เนื่องจากกุ้งทุกกลุ่มการทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับผลของ ARA ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

Xu *et al.* (1994) ได้รายงานว่ ARA เป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญในอาหารกุ้ง *Penaeus chinensis* แต่ไม่สามารถช่วยในการเจริญเติบโตได้มากเท่ากับ DHA การศึกษาของ Glencross and Smith (2001) แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม ARA จะมีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม EPA และ DHA ในขณะที่ปลาซึ่งได้รับ ARA พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโต การรอดตาย การเพิ่มเม็ดสีในกล้ามเนื้อ และมีความต้านทานต่อความเครียดสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Izquierdo *et al.*, 2000; Izquierdo, 2005) Harel *et al.* (2000) รายงานว่าการให้อาหารที่มีระดับของ ARA ในปริมาณสูง จะส่งผลต่อการรักษาสมดุลของน้ำและเกลือแร่ในปลา striped bass วัยอ่อนได้ และยังสอดคล้องกับการทดลองในปลา Atlantic salmon ที่พบว่าลูกปลาวัยอ่อนมีความต้องการ ARA มากในช่วงที่ปลามีการเจริญเติบโต โดย ARA จะส่งผลต่อกระบวนการปรับสมดุลเกลือแร่ของปลาทำให้ปลามีอัตราการรอดตายสูงขึ้นด้วย (Bell *et al.*, 1997)

ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างแน่ชัดว่า กลไกใดที่ส่งผลทำให้กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม ARA และ DHA มีอัตราการรอดตายและภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงกว่ากุ้งในกลุ่มอื่นๆ แต่อาจเป็นไปได้ว่า DHA และ ARA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจากสาหร่ายกลุ่ม thraustochytrids ซึ่งนอกจากเป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็นอย่าง DHA และ EPA แล้วยังเป็นแหล่งของ carotenoids ที่สำคัญด้วย เช่น β -carotene และ oxygenated carotenoids เช่น xanthophylls, astaxanthin และ canthaxanthin (Aki *et al.*, 2003) โดยสารสกัดดังกล่าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกายมนุษย์ (Fan and Chen, 2007) โดยมีรายงานว่า thraustochytrids สามารถผลิต carotenoids กลุ่ม astaxanthin ขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดกระบวนการ oxidation ในเซลล์ระหว่างการสะสมไขมัน (Burja *et al.*, 2006)

ที่ผ่านมาการศึกษาพบว่าเม็ดสี carotenoid ซึ่งพบได้ทั่วไปในระบบสีของสัตว์น้ำจะส่งผลต่อกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของสัตว์น้ำด้วย (Estermann, 1994; Hunter, 2000) นอกจากนี้ Supamattaya *et al.* (2005) รายงานว่า astaxanthin ซึ่งสามารถพบได้ในส่วนที่เป็น

สารน้ำในร่างกายของกุ้งโดยจะเป็นส่วนประกอบในซีรัม จะส่งผลต่อกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยเฉพาะการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น phagocytosis และ nonspecific cytotoxicity ของกุ้ง โดยกุ้งที่ได้รับสาร astaxanthin แล้วทำให้ติดเชื้อไวรัสดวงขาวจะมีอัตราการรอดตายที่สูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการทดลองให้อาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร แก่กึ่งขาวแวนนาไมระยะโพสลาาร์ว่า 12 เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่ากึ่งในกลุ่มควบคุม ซึ่งให้อาหารกึ่งสำเร็จรูปสำหรับกึ่งขาวแวนนาไม มีน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการรอดตายสูงสุด (7.67 ± 0.07 กรัม) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งในกลุ่มการทดลอง A, B, C, D, E, F และ G ซึ่งมีอัตราส่วนของ DHA:ARA เท่ากับ 0:0, 0.5:0, 0.25:0, 0:0.25, 0:0.12, 0.5:0.12 และ 0.25:0.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่กึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีน้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งต่ำที่สุด (7.51 ± 0.06 กรัม)

2. กึ่งที่ได้รับอาหารสูตร E ซึ่งได้รับอาหารเสริมARA ในอัตรา 0.12 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดตายสูงสุด (90.67 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งในกลุ่มการทดลอง A, B, C, D, F, G และ กลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราส่วนของ DHA:ARA เท่ากับ 0:0, 0.5:0, 0.25:0, 0:0.25, 0.5:0.12, 0.25:0.06 และ 0:0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่กึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีอัตราการรอดตายของกึ่งต่ำที่สุด (83.33 ± 3.06 เปอร์เซ็นต์)

3. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมแตกต่างกันทั้ง 8 สูตร เป็นระยะเวลา 70 วัน พบว่า

3.1 กึ่งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกึ่งสูงที่สุด ($35.22 \pm 4.82 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิเมตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งที่ได้รับอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีอัตราส่วนของ DHA:ARA เท่ากับ 0:0, 0.5:0, 0.25:0, 0:0.25 และ 0:0.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

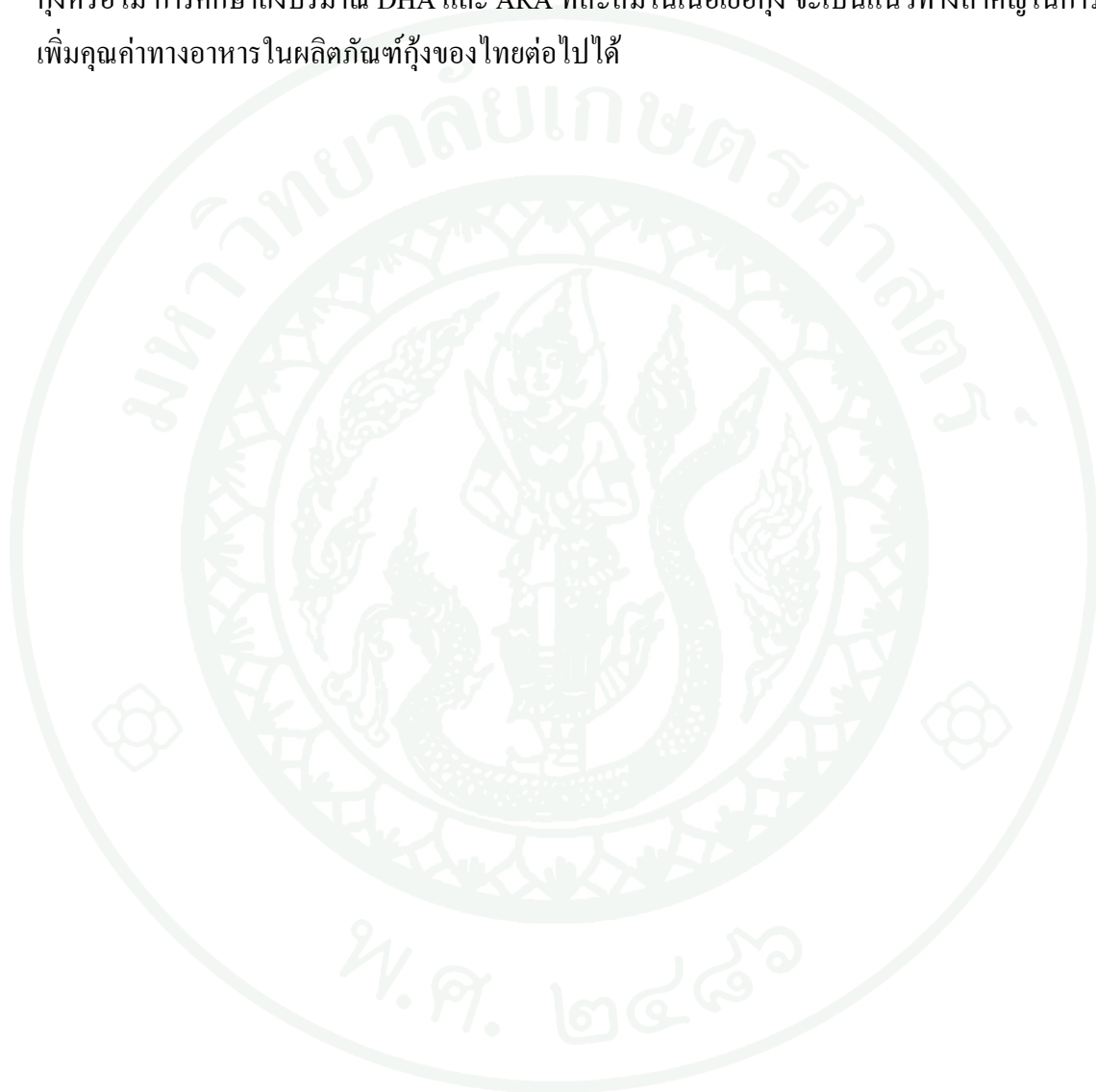
3.2. กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (29.33 ± 2.41), ปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase (324.51 ± 3.43 หน่วย/นาฬิกา/มิลลิกรัมโปรตีน) และมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase (35.22 ± 3.20 หน่วย SOD/มิลลิลิตร) สูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีอัตราส่วนของ DHA:ARA เท่ากับ 0:0, 0.5:0, 0.25:0, 0:0.25, 0:0.12, และ 0:0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.3. กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร B, C, D, E, F และ G ซึ่งมีอัตราส่วนของ DHA:ARA เท่ากับ 0.5:0, 0.25:0, 0:0.25, 0:0.12, 0.5:0.12 และ 0.25:0.06 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราส่วนการเงิองต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 1 : 8 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งใช้อาหารกุ้งสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล โดยมีค่าเท่ากับ 1 : 4

4. จากการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร F ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร G ซึ่งได้รับอาหารที่ผสม AG-GOLD และ AG-ARA ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของอัตราการรอดตายสูงที่สุดเท่ากันที่ 76.67 ± 0.58 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A, B, C, D, E และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีอัตราส่วนของ DHA:ARA เท่ากับ 0:0, 0.5:0, 0.25:0, 0:0.25, 0:0.12, และ 0:0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตร A ซึ่งใช้โปรตีนและน้ำมันจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนและน้ำมันจากปลาทะเล มีร้อยละของอัตราการรอดตายต่ำที่สุด (46.67 ± 0.58)

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการเติมกรดไขมันในกลุ่ม DHA และ ARA ในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำโดยตรงว่ามีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ตลอดจนระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งหรือไม่ การศึกษาถึงปริมาณ DHA และ ARA ที่สะสมในเนื้อเยื่อกุ้ง จะเป็นแนวทางสำคัญในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารในผลิตภัณฑ์กุ้งของไทยต่อไปได้



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ สุกมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudolf Hoffmann. 2543 ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกึ่ง
 ฤดูกาล: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเม็ดเลือดกึ่งฤดูกาล.

ว. **สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.**

กิจการ สุกมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุภฎา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกัน
 โรคในกึ่งฤดูกาล: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่าง
 ของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกึ่งฤดูกาล. ว. **สงขลานครินทร์.
 ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 605-613.**

กิจการ สุกมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุภฎา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกัน
 โรคในกึ่งฤดูกาล: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกึ่งฤดูกาลบนพื้นฐาน
 ของเพศ และวงจรการลอกคราบ. ว. **สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
 22 (ฉบับพิเศษ): 623-632.**

กิจการ สุกมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตติมา ตันตีกิตติ และ Rudlf Hoffmann. 2543 จ. ภูมิคุ้มกัน
 โรคในกึ่งฤดูกาล : II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกึ่งฤดูกาล.
 ว. **สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.**

กิจการ สุกมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จีราพร เกสรจันทร์. 2543 ฉ. ระบบ
 ภูมิคุ้มกันโรคในกึ่งฤดูกาล: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบ
 เลือดในกึ่งฤดูกาล. ว. **สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ):
 567-580.**

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

- กรมประมง. 2547. โครงการประเมินผลกระทบการนำกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เข้าประเทศไทย. หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- คณะแพทยศาสตร์. 2518. หลักโภชนศาสตร์. โรงพยาบาลรามาธิบดี, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- จรีพร เรืองศรี, ไมตรี วรรณเดช, สุนีย์ หวันเหลี่ยม, อนิศา สงนุ้ย, สุพัตรา อรุณรัตน์, นพรัตน์ แทนมาก, จิราพร เพชรรัตน์ และ กิจการ ศุภมาตย์. 2546. การเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* จากตอนใต้ของไทยในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26 (ฉบับที่ 1): 43-54.
- ชนิกา คงสวัสดิ์. 2546. ผลของการใช้สตั๊ดทดแทนปลาป่นบางส่วนในอาหารต่อการเติบโตของ กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชยพร ทิพย์ศรีมงคล. 2552. ผลของ DV AQUA ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ อัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000 สู่อุตสาหกรรมและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม. โรงพิมพ์เจริญรัตน์ การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 260 น.
- ชลอ ลิมสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. บริษัทเมจิก ฟันบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ. 206 น.
- ชลอ ลิมสุวรรณ, นิตี ชูเชิด, ทิม โมที วิลเลียม เฟลเกล, ภิญโญ เกียรติภิญโญ และบริษัท ซายอาคควา สยาม จำกัด. 2548. รายงานการวิจัยการศึกษาการขยายพันธุ์พ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชลอ ลิมสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สุธี วงศ์มณีประทีป, สาธิต ประเสริฐศรี, เกศินี หลายสุทธีสาร, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์, จริยาวดี สุริยพันธ์ และแก้วตา ลิมเฮง. 2552. ผลของอุณหภูมิต่อพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. น. 337-345.

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

คารุณี แซ่อู่ย, อนันต์ ต้นสุตะพานิช และลิลลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus merguensis*) เอกสารวิชาการฉบับที่ 6 กรมประมง, กรุงเทพฯ.

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

ทาริกา ผาใต้. 2543. ผลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ω -3HUFA ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2542. ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 144 น.

- พุทธ ต่อแสงจินดา. 2544. การจัดการสารประกอบไนโตรเจนและออกซิเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด. กลุ่มวิจัยวิศวกรรมการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย กรมประมง, สงขลา. 14 น.
- พรทวี เลาหะมงคลรักษ์. 2549. การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรรณวไล จันทรปาน. 2551. การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของ กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารผสม AQUANIN PLUS (Beta-Cyclodextrin Cyateamine Hydrochloride). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนนาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม่กกาซีน, สมุทรปราการ. 120 น.
- มะลิ บุญรัตน์ผลิน. 2531. อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ. น. 108-141. ใน การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- มยุรา ประยูรพันธ์. 2549. กรดไขมันในทรอสโททริคที่สกัดแยกได้จากใบไม้ป่าชายเลนอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- มาลินี วิชชาวูช และ สมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรมประมง. วารสารการประมง 58(2): 170-171.
- ยนต์ มุสิก. 2539. คุณภาพน้ำและกำลังผลิตของบ่อปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 180 น.

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

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

วัชรียา ภูรีวิโรจน์กุล. 2547. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง, น. 48-64. ใน การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรพจน์ สุนทรสุข. 2541. การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดสายยาวจากจุลินทรีย์. วารสารจารย์พา 5(44): 52-56.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2542. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 255 น.

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

ศิริวรรณ เพชรสมบัติ. 2541. ปริมาณโปรตีน ไขมันชนิด EPA และ DHA ในสาหร่ายเซลล์เดียวบางชนิด. ปัญหาพิเศษภาควิชาวาริชศาสตร์, สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศิริเพ็ญ ตรีไชยาพร. 2543. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 125 น.

สมาคมกุ้งไทย. 2552. งานวันกุ้งจันทะวันออกแฟร์ ครั้งที่ 12. 102 น.

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

สุธีวัฒน์ สมสืบ, พิศมัย สมสืบ, มะลิ บุญยรัตผลิน และอมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2539. การทดสอบปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อกุ้งกุลาดำ, น. 354-366. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

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

อนันตชัย เชื้อนธรรม. 2542. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 350 น.

อัคนิษฐ์ อธิธำภา. 2541. การหาปริมาณไขมันและเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มโอเมก้า-3 ในปลาทะเลโดยเทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโตกราฟี. ปัญหาพิเศษภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์.

Akiyama, D.M., W.G. Dominy and A.L. Lawrence. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: Revised, p. 80-90. In D.M. Akiyama and R.K.H. Tan, eds. **Proceedings of the Aquaculture and Feed Processing and Nutrition Workshop.** Singapore, Republic of Singapore.

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

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

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

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.

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

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

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

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

Bajpai, P., K. Bajpai and P.O. Ward. 1991a. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 35: 706-710.

Bajpai, P., K. Bajpai and P.O. Ward. 1991b. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. **J. Am. Chem. Soc.** 68: 509-514.

- Barclay, W. and S. Zeller. 1996. Nutrition enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. **J. World Aquac Soc.** 27 (3): 314-322.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology.** United states of America by Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas. 114 p.
- Bell, J.G., D.R. Tocher, B.M. Farndale, D.I. Cox, R.W. McKinney and J.R. Sargent. 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*, undergoing parr-smolt transformation. **Lipids.** 32: 515-25.
- Boddeke, R. 1983. Survival strategies of penaeid shrimps and their significance for shrimp culture, pp. 514-523. **In Proceedings of the First International Conference on Warmwater Aquaculture, February 1983.** Honolulu, Hawaii.
- Bowles, R.D. 1997. **Production of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid by Thraustochytrids.** Doctoral Dissertation, Physiology and Optimization, University of Portsmouth. UK.
- Bowles, R.D., A.E. Hunt, G.B. Bremer, M.G. Duchars and R.A. Eaton. 1999. Longchain n-3 Polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the Thraustochytrid: screening of isolates and optimization of docosahexaenoic acid production. **J. of Biology** 70: 193-202.
- Boyd, C.E. 1982. **Water Quality Management for Pond Fish Culture.** Elsevier Sci. Publ. CO., Amsterdam.
- Boyd, C.E. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming.** Fisheries and Allied Aquacultures Departmental Series No. 2. Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama.

- Boyd, C.E. 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.
- Boyd, C.E. and C.S. Tucker. 1998. **Pond Aquaculture Water Quality Management**. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts.
- Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei***. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA.
- Buchanan, R.E., N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Rawlin and R.Y. Stanier. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. The William and Wikins Co., Baltimore.
- Burja A.M., H. Radianingtyas, A. Windust and C.J. Barrow. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. **App Microbiol Biotechnol**. 72:1161–9.
- Castell, J.D., J.G. Bell, D.R. Tocher and J.R. Sargent. 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*. **Aquaculture** 128: 315–33.
- Chen, H.C. 1985. Water Quality Criteria for Farming the Grass Shrimp *Penaeus monodon*, p. 165. *In* **Proceeding of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawn/Shrimps. 4-7 December 1981**, SEAFDEC, Iloilo, Philippines.

- Chen, S.N., S.L. Huang and G.H. Kou. 1992. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan, p. 195-205. In W. Fulks and K.L. main , eds. **Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States Hawaii.**
- Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.
- Cousin, M., G. Cuzon., E. Blanchet. and F. Ruelle. 1993. Protein requirement following an optimum dietary energy to protein ration for *Penaeus vannamei* juvenile. **Fish Nutr. Feed.** 6: 599-606.
- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics** 54: 442-445.
- Cuzon , G., A. Lawrence., G. Gaxiola. , C. Rosas and J. Guillaume. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture** 235: 513-551.
- Dall, W., A. Chandumpai and D.M. Smith. 1992. Fatty acid composition of organs and tissues of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during the moulting cycle and during starvation. **Mar Biol.** 113:45-55.
- Davis, D.A. and C.R. Arnold. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 185:291-8.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A.V. Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.** 272: 28398-28406.

- Dieguez-uribeondo, J. and J. Cerenius. 1998. The inhibition of extracellular proteinase from *Aphanomyces* spp. by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. **Mycol. Res.** 120: 820-824.
- Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). **Comp. Biochem. Physiol.** 32: 709-731.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrates Guide to Shrimp of the World.** Osprey Books, Huntington, New York.
- Estermann R. 1994. Biological functions of carotenoids. **Aquaculture** 124:219–22.
- Fan, K.W., F.J. Chen, E.B.G. Jones and L.P. Vrijmoed. 2001. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. **J. Ind. Biotechnol.** 27: 199-202.
- Fieber, L.A. and P.L. Lutz. 1982. Calcium requirements for molting in *Macrobrachium rosenbergii*. **J. World Maricul. Soc.** 13: 21-27.
- Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp, *Penaeus setiferus*. **J. Invertebr. Pathol.** 24: 141-148.
- Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-19.
- Flicker, J. 2002. Fish meal: High protein does not stand for high quality. **Feed Int.** 23: 13-16.

- Freire Marques, M.R. and M.A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture** 191: 23–44.
- Ganuza, E., T. Benítez-Santann, E. Atalah, O. Vega-Orellana, R. Ganga and M.S. Izquierdo. 2008. *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. **Aquaculture** 277: 109-116.
- Glencross, B.D. and D.M. Smith. 1999. The dietary linoleic and linolenic fatty acid requirements of the prawn *Penaeus monodon*. **Aquac Nutr.** 5: 53–63.
- Glencross, B.D. and D.M. Smith. 2001. A study of the arachidonic acid requirements of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Aquac Nutr.** 7, 59–69.
- Halver, J.E. 1972. **Fish Nutrition**. Academic Press, New York.
- Harel, M., A. Tandler, G.W. Kissil, S.W. Applebaum. 1994. The kinetics of nutrients incorporation into body tissues of gilthead seabream, *Sparus aurata* females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. **Br J. Nutr** 72:45–58.
- Harel, M., E. Lund, S. Gavasso, R. Herbert, A.R. Place. 2000. Modulation of arachidonate and docosahexaenoate in *Morone chryops* larval tissues and the effect on growth and survival. **Lipids**. 35:1269–80.
- Harel, M., W. Koven, I. Lein, Y. Bar, P. Bahrens, J. Stubblefield, Y. Zohar and A.R. Place. 2002. Advanced DHA, EPA and ArA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. **Aquaculture** 213: 347-362.

- Hikima, S., J.I. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. **Gene**. 316: 187-195.
- Honda, D., T. Yokochi, T. Nakahkura, M. Erata and T. Higashihara. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. Nov., a new thraustochytrids from a mangrove area in the west pacific ocean, **Mycol. Res.** 102 (4): 439-448.
- Honda, D. 2001. Phylogeny and taxonomy of Labyrinthulid. **Aquabiology** 23(1), 7-17.
- Hose, J.E., G.E. Matin, V.A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.
- Huang, C.C., K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll and Y.L. Song. 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 279-294.
- Hunter B. 2000. Physiological Function of Astaxanthin and Other Carotenoids in Marine Organisms. In P. Sungpuag. editor. **First South East Asia and Pacific Regional Meeting on Carotenoids**, 2-5 August. 2000. Mahidol University Bangkok 2000. 19 p.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of Disease Resistance of Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* and Increase in Phagocytic Activity of Prawn Hemocytes After Oral Administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). In **Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992**. The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.
- Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. **Curr. Opin. Immunol.** 5: 74-82.

- Izquierdo, M.S., J. Socorro, L. Arantzamendi and C.M. Hernandez-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. **Fish Physiol Biochem.** 22:97–107.
- Izquierdo, M.S. 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. **Opt Cah Mediterr.** 63:91–102.
- Jaritkhuan, S. 2001. **Thrauschytrids as a Food Source in Aquaculture.** Doctoral Dissertation, Biology Science, University of Portsmouth.
- Jiang, Y., K. W. Fan, R. T. Y. Wong and F. Chen. 2004. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalgae *Schizochytrium mangrovei*. **J. Agric. Food Chem.** 52: 1196-1200.
- Jiravanichpaisan, P., T. Miyazaki and C. Limsuwan. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **J. Aquat. Anim. Health.** 6: 27-35.
- Jiravanichpaisan, P., B.L. Lee and K. Soderhall. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunology** 211: 213-236.
- Johansson, M.W. and K. Söderhäll. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cell. **Insect. Biochem.** 19: 183-190.
- Johansson, M.W., T. Holmblad, P.O. Thornqvist, M. Cammarata, N. Parrinello and K. Söderhäll. 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell adhesive peroxidase in crayfish. **J. Cell Sci.** 112: 917–925.
- Johnson, P. T. 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 11: 679-704.

- Kamlungdee, N. and K.W. Fan. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium sp.* isolated from mangrove. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 25(5): 643 – 650.
- Kendrick, A. and C. Ratledge. 1992. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid. **Lipids.** 27: 15-20.
- Keyser, P. 1999. **Crustacean immunity: Characterization of some crayfish blood proteins.** Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.
- Kinsella, A. 1986. Numerical methods for error evaluation. **Am. J. Phys.** 54: 6-464.
- Klein, J. 1982. **Immunology: The Science of Self-nonsel Discrimination.** USA: A Wiley interscience publication.
- Koven, W., Y. Barr, S. Lutzky, I. Ben-Atia, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens and A. Tandler. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae. **Aquaculture** 193: 107–22.
- Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology** 80: 393-412.
- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda, and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.

- Lavilla-Pitogo, C. R., L.J. Albright, M.G. Paner and N.A. Sunaz. 1992. Studies on the sources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries, p. 157-164. In I.M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur, eds. **Disease in Asian Aquaculture**. Fish Health Section. Asian Fish Soc. Manila, Philippines.
- Lee, K.K., F.R. Chen and P.C. Lui. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunol.** 5(5): 385-387.
- Leger, P. and P. Sorgeloose. 1992. Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries, p. 225-244. In A.W. Fast and L.J. Leste, eds. **Marine Shrimp Culture Principles and Practice**. Elsevier Science Publishers, New York.
- Lewis, T., P.D. Nichols, P.R. Hart, D.S. Nichols and T.A. McMeekin. 1998. Enrichment of rotifers *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid produced by bacteria. **J. World Aquac Soc.** 29:313-8.
- Liang, Z., P. Lindblad, A. Beauvais, M.W. Johansson, J.P. Latge', M. Hall, L. Cerenius and K. Söderhäll. 1992. Crayfish a-macroglobulin and 76 kD protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kD protein. **J. Insect Physiol.** 38: 987-995.
- Lightner, D.V. 1988. Disease of cultured penaeid shrimp and prawns, p. 8-127. In C.S. Sinderman and D.V. Lightner, eds. **Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture**, Elsevier, Amsterdam
- Lilly, M.L. and N.R. Bottino. 1981. Identification of arachidonic acid in Gulf of Mexico shrimp and degree of biosynthesis in *Penaeus setiferus*. **Lipids.** 16:871-875.
- Lim, C. and W. Dominy. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** 87:53-63.

- Lim, C. 1996. Substitution of cottonseed meal for marine animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. **J. World Aquacult Soc.** 27: 402–409.
- Lim, C., H. Ako, C. L. Brown and K. Hahn. 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. **Aquaculture** 151: 143-153.
- Liu, C.-H., W. Cheng, C.-M. Kuo, J.-C. Chen. 2004. Molecular cloning and characterization of a cell adhesion molecule, Peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 13–26.
- Luo, R. 1996. Study on the contents of serum protein and glucose in the hemolymph of the shrimp *Penaeus chinensis*. *Oceanol. Limnol.* **Sin Haiyang Yu Huzhao.** 27: 476-480.
- Magarelli, P.C., B. Hunter, D.V. Lightner and L.B. Colvin. 1979. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. **Comp. Biochem. Physiol.** 63: 103-108.
- Martin, G.G. and L.B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocyte. **J. Morphol.** 185: 339-349.
- Martin, G. G., D. Poole, C. Poole, J. E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Invertebr. Pathol.** 62: 308-315.
- Martinez-Palacios, C.A., L.G. Ross and V.L. Jimenez. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vanamei* Boone, 1931. **J. Aquacult. Trop.** 11(1): 59-65.
- Maynard, L.A. and J.K. Loosli. 1969. **Animal Nutrition.** McGraw-Hill Book Company, New York. 613 p.

- Metz, J.G., P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine and K. Lardizabal. 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. **Science**. 293: 290–3.
- Merican, Z.O. and K.F. Shim. 1996. Qualitative requirements of essential fatty acids for juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture** 147: 275–91.
- Miller, M.R., P.D. Nichols and C.G. Carter. 2007. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. **Comp.Biochem. Physiol. A**. 148: 382-392.
- Moss, S.T. 1986. The biology of the Thraustochytriales and Labyrinthulids, p. 105-129. In S.T. Moss, eds. **The Biology of Marine Fungi**.
- Moullac, G.L., C. Soyeux, D. Sauliner, D. Ansquer, J. Avarre and P. Levy. 1998. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish & Shellfish Immunol**. 8: 621 - 629.
- Nakamura, T., T. Morita and S. Iwanaga. 1989. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. Isolation and characterization. **Eur. J. Biochem**. 154: 511-21.
- Naganuma, T., H. Takasugi and H. Kimura. 1998. Abundance of thraustochytrids in coastal plankton. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 162: 105-110.
- Nakahara, T., T. Yokochi, T. Higashihara, S.Tanaka, T. Yaguchi and D. Honda. 1996. Production of decosahezaenoic acid and decosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. **J. Am. Chem. Soc.** 73(11): 1421-1426.

- Nettleton, J.A. 1985. **Seafood Nutrition: Facts Issues and Marketing of Nutrition in Fish and Shellfish**. Osprey Book, New York. 280 p.
- O'Leary, C.D. and A.D. Matthews. 1990. Lipid class distribution and fatty acid composition of wild and farmed prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture** 89: 65–81.
- Patnaik, S., T.M. Samocha, D.A. Davis, R.A. Bullis and C.L. Browdy. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition** 12:395–401.
- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxiase activating system of the shrimp *penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Peter, V.W. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems, p. 125-139. *In Farming Marine Shrimp in Recirculation Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Service.
- Prosser, J.I., K. Killham, L.A. Glove and E.A.S. Rattray. 1996. Luminescence-base system for detection of bacteria in the environment. **Critical Rev. Biotechnology**. 16(2): 157-163.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. RHODES. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology**. 97: 183-350.
- Rees, J.F., K. Cure, S. Piyatirattivorakul, P. Sorgeloos and P. Menasveta. 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. **Aquaculture** 122: 193-207.
- Ruangpan, L., R. Tabkaew and K. Sangrungruang. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp *Penaeus monodon*, p. 141-149. *In Fisheries Health Section Asian, Fisheries Soc.* Manila, Philippines.

- Samocha, T.M., D.A. Davis, I.P. Saoud and K. DeBault. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 231: 197–203.
- Santos, E.A. and L.E.M. Nary. 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.** 87A(4): 1033-1035.
- Sargent, J.R., L.A. McEvoy and J.G. Bell. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture** 155: 117–27.
- Schnutt, A.S.C. and E.A. Santos. 1999. Haemolymph nitrogenous constituents and nitrogen efflux rates of juvenile shrimp, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante), exposed to ambient ammonia N. **Aquaculture** 30: 1-11.
- Seidman, E.R. and A.L. Lawrence. 1986. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. **J. World Maricult. Soc.** 16: 333-346.
- Seki, N., T. Mata, T. Oda, D. Iwaki, K.I. Kma, T. Miyata and S. Iwanaga. 1994. Horseshoe crab (1, 3)- β -D-glucan-sensitive coagulation factor G. **J. Biol. Chem.** 269: 1370-1374.
- Sequeira, T., D. Tavares and M. Arala-Chaves. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 97–104.
- Singh, A and O.P. Ward. 1996. Production of high yields of docosaheptaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. **J. Ind. Microbiol.** 16: 370-373.

- Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. **Cell Tissue Res.** 233: 295–303.
- Smith, V.J. and J.R.S Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunol.** 2(1): 1-31.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. J. Fish. Dis.* 2: 3–23.
- Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10: 23-28.
- Söderhäll, K. and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.
- Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983 a. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 229–239.
- Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1983 b. The prophenoloxidase activating system a complement-like pathway in arthropod, p. 160 - 167. *In* J. Asit and D.W. Roberts, eds. **Infection Processes of Fungi.** Rockefeller Foundation, New York.
- Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition in arthropod, p. 251-258. *In* A. P. Gupta, eds. **Hemolytic and Humoral Immune Response in Arthropod.** John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Söderhäll, K., L. Cerenius and M.W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating system in Invertebrates, p. 229-253. *In* **New directions in invertebrate immunology.** SOS publications, Fair Harven.

- Song, Y.L. and Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 201-209.
- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23(3): 179 - 186.
- Stansby, M.E., H. Schlenk and E.H. Gruger. 1990. Fatty acid composition of Fish, p. 6–39. In. M.E. Stansby, eds. **Fish Oils in Nutrition**. AVI Books, New York.
- Sung, H.H. and Y.L. Song. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 145: 41-45.
- Suwanich, R., S. Piyatirattivorakul, P. Kittakoop and P. Menasveta. 1996. Effects of highly unsaturated fatty acid and ratio of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acids on growth and survival of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) postlarvae. **Thai J. Aqua. Sc.** 2(2): 81-95.
- Tacon, A.G.J. and M. Metian. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. **Aquaculture** 285: 146–58.
- Tidwell, J.H., C.D. Webster, D.H. Yancey and L.R. D’Abramo. 1993. Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and distillers’ by-products in diets for pond culture of the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Aquaculture** 118: 119–30.
- Tseng, W.Y. 1987. **Shrimp Mariculture, A Practical Manual**. Department of Fisheries, The university of Papua New Guinea, Port Moresby, Papua New Guinea. 299 p.

- Vasta, G.R., H. Ahmed, N.E. Fink, M.T. Elola, A.G. Marsh, A. Snowden and E. W. Odom. 1994. Animal lectin as self/non-self recognition molecules. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 712: 55-73.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.
- Vargas-Albores, F., P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark and F. Magallon-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp *Penaeus californis* Holmes, phenoloxidase system. **Aquaculture** 29(8): 549-553.
- Wang, Y.C., P.S. Chang and H.Y. Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunol.** 20: 414-418.
- Webster, C.D. and C.E. Lim. 2002. **Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture.** New York, CAB International. 416 p.
- Xu, X.L., W.J. Ji, J.D. Castell and R.K. O'Dor. 1994. Essential fatty acid requirements of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. **Aquaculture** 127:29-40.
- Yamasaki, T., T. Aki, Y. Mori, T. Yamamoto, M. Shinozaki, S. Kawamoto and K. Ono. 2007. Nutritional of enrichment of larval fish feed with Thraustochytrid producing polyunsaturated fatty acid and xanthophylls. **J. Biosci. Bioeng** 104(3): 200-206.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable protein of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 121: 169-176.
- Yu, J. 1993. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Ocean-Univ.** 23(1): 107-114.



ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

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

| | |
|---------------------------------------|--------------|
| M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน | 50 มิลลิลิตร |
| Salt mixture | 10 มิลลิลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 10 มิลลิลิตร |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 10 มิลลิลิตร |
| L-glutamine | 1 มิลลิลิตร |
| Hepes | 0.238 กรัม |
| L-cystein | 5 กรัม |

De-ionized water ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายสาร (ทุกตัวที่ใช้เตรียมสารเคมี)

วิธีการเตรียมสารเคมีแต่ละตัว คือ

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

1.2 Salt mixture ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

| | |
|---|-----------|
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.4 กรัม |
| MgCl . 6 H ₂ O | 3.3 กรัม |
| MgSO ₄ . 7 H ₂ O | 3.0 กรัม |
| NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O | 0.05 กรัม |

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 11 กรัม ในน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

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

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

1.5 L-glutamine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

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

1.6 HEPES จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cysteine จำนวน 5 กรัม

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

2. Shrimp saline

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

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

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker's yeast

0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์

shrimp saline

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

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

KH_2PO_4 1.3609 กรัม

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

5. การเตรียมสารในชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD[®] Superoxide dismutase

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

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

5.3) สารละลายมาตรฐาน CAL standard (S_0) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร